



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0922737-7 B1



(22) Data do Depósito: 24/12/2009

(45) Data de Concessão: 27/09/2022

(54) Título: MÉTODO DE PREPARO DE UM PRODUTO FERMENTADO À BASE DE SOJA

(51) Int.Cl.: A23L 7/104.

(52) CPC: A23L 7/104.

(30) Prioridade Unionista: 30/01/2009 EP 09151775.5.

(73) Titular(es): THE COCA-COLA COMPANY.

(72) Inventor(es): CHISTOPH HENDRICK BECKMANN; CORNÉLIS VAN VLIET; FRANCISCUS JOHANNES HENRICUS MARIA JANSEN; MICHEL MELLEMA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009067922 de 24/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/086078 de 05/08/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/07/2011

(57) Resumo: MÉTODO DE PREPARO DE UM PRODUTO FERMENTADO À BASE DE SOJA E PRODUTO À BASE DE SOJA. A presente invenção refere-se a um método de preparo de um produto fermentado à base de soja, o dito método compreendendo: a. fornecer um líquido aquoso que contém 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja; b. pasteurizar ou esterilizar o líquido aquoso; c. inocular o líquido pasteurizado ou esterilizado com uma cultura iniciadora que contém bactéria ácido-láctica; d. fermentar o líquido aquoso inoculado através da incubação a uma temperatura na faixa de 15 a 48 °C durante 0,5 a 24 horas para obter um produto fermentado, em que fitase é incorporada no líquido aquoso antes da pasteurização do dito líquido aquoso na etapa b. ou em que a fitase é adicionada ao líquido pasteurizado ou esterilizado não mais do que 10 minutos antes do término da etapa de fermentação d, dita fitase sendo incorporada no líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade de não mais do que 11 FTU por grama de proteína de soja; e sendo que a etapa de fermentação d. é concluída através de pasteurização, resfriamento ou ajuste de pH. Constatouse que através da condução da fermentação e do tratamento com fitase de uma (...).

“MÉTODO DE PREPARO DE UM PRODUTO FERMENTADO À BASE DE SOJA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção diz respeito ao uso de fitase em um método para preparação de produtos fermentados à base de soja e a um produto fermentado à base de soja que tenha sido sujeito a tratamento com fitase.

[002] Produtos derivados de soja, como proteína de soja concentradas e isoladas, naturalmente contém quantidades consideráveis de ácido fítico (hexafosfato de inositol). O ácido fítico é um quelante potente indigerível que liga fortemente cátions de metal multivalentes como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} . Uma vez que alguns destes minerais ocorrem naturalmente em produtos derivados de soja, o ácido fítico contido nestes produtos afeta adversamente a biodisponibilidade desses minerais. Portanto, embora a soja contenha níveis apreciáveis dos minerais acima mencionados, esses minerais de soja têm uma relevância nutricional limitada devido ao fato de que sua biodisponibilidade é baixa. Além do mais, o ácido fítico naturalmente presente em produtos derivados de soja também afeta adversamente a biodisponibilidade de minerais suplementados como em Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} .

[003] A fitase pode ser usada para quebrar o ácido fítico em componentes digestíveis. Portanto, o tratamento com fitase pode ser usado para melhorar a biodisponibilidade de cátions de metal multivalentes que estão contidos em produtos derivados de soja.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] O tratamento com fitase de produtos derivados de soja é apresentado no documento WO 2006/098721. Esse pedido de patente internacional descreve um processo para a preparação de um material de proteína tendo um conteúdo reduzido de ácido fítico, o dito processo

compreendendo:

- a. a preparar um extrato aquoso do material de origem vegetal contendo proteína,
- b. ajustar do pH do extrato para precipitar o material de proteína,
- c. separar o material precipitado de proteína e formação de uma suspensão do material precipitado de proteína em água,
- d. aumentar do pH da suspensão para formar um material de proteína (parcialmente) solubilizado em água, e
- e. secar do material de proteína;

em que a fitase é incorporada no extrato aquoso antes do ajuste do pH ou no material de proteína (parcialmente) solubilizado antes da secagem. O documento WO 2006/098721 também descreve uma composição de bebida ácida tendo um pH de 3,0 a 4,5 compreendendo um material de proteína hidratada obtido pelo processo mencionado acima, um agente estabilizador de proteína hidratada e um ácido comestível.

[005] O documento US 2007/0014910 descreve uma bebida ácida contendo proteína compreendendo 0,6 a 4,6 % em peso de um produto de proteína de soja, em que o produto de proteína de soja é preparado por um processo compreendendo a precipitação ácida da proteína:

- preparar do extrato de proteína de soja de um material de origem vegetal contendo proteína de soja;
- conectar o extrato de proteína de soja com um ácido para formar a proteína de soja precipitante;
- conectar a proteína de soja precipitante com uma solução hidratante para formar uma suspensão da proteína de soja;
- introduzir de uma enzima degradante de ácido fítico na suspensão da proteína de soja e reação da suspensão da proteína de soja com a enzima degradante de ácido fítico por 30 segundos a 50 minutos para formar

um material modificado de proteína de soja;

- ajustar o pH do material modificado de proteína de soja para o pH de 6,5 a 8,0 para formar um material de proteína de soja neutralizada;

- aquecer o material de proteína de soja neutralizada para uma temperatura de 132 a 160 °C a 1 a 30 segundos para formar um material de proteína de soja tratado com calor; e

- secar o material de proteína de soja tratado com calor para formar o produto de proteína de soja.

[006] Realizações alternativas deste processo, em que a enzima degradante de ácido fítico é introduzida antes da precipitação do ácido ou depois da neutralização, são também descritos.

[007] O documento WO 2006/043478 descreve um método de preparação de um leite de soja fermentado tendo sabor excelente com gosto esverdeado (parecido com capim) e paladar áspero reduzidos, uma textura macia e um sentimento favorável ao paladar, o dito método compreendendo a execução da fermentação do ácido láctico começando com leite de soja que foi tratado com uma enzima tendo o ácido fítico decompondo a atividade da enzima. O documento WO 2006/043478 ensina a desativar a fitase pela esterilização depois que o ácido fítico foi decomposto.

[008] Uma desvantagem dos métodos mencionados acima reside no fato que as composições de proteína de soja tratada com fitase exibem uma estabilidade oxidante fortemente reduzida. Esta estabilidade oxidante reduzida, conforme evidenciado por uma predisposição aumentada para desenvolver sabores indesejados de oxidação, resultantes do fato que o tratamento com fitase nega o efeito sequestrante do ácido fítico em, por exemplo, cátions de ferro e cobre. Tanto o ferro e o cobre são pró-oxidantes bem conhecidos que catalisam a oxidação de lipídio, notavelmente a oxidação de ácidos graxos poli-

insaturados que produzem aldeídos de forte odor. Desde que os ácidos graxos poli-insaturados sensíveis à oxidação são geralmente abundantemente presentes em materiais derivados de soja, a degradação enzimática do ácido fítico irá diminuir a estabilidade oxidante dos ditos materiais derivados de soja. Essa estabilidade oxidante diminuída se torna manifesta em uma tendência aumentada de tais materiais derivados de soja para desenvolver sabores indesejados durante a armazenagem, processamento ou na aplicação final do produto.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[009] Os inventores descobriram que nos produtos baseados em soja fermentados por bactéria ácido-láctica é possível realizar os benefícios do tratamento com fitase, por exemplo, o.

[010] Mais especialmente, os presentes inventores verificaram de modo inesperado que se o tratamento com fitase e a fermentação são conduzidos ao mesmo tempo, o efeito negativo da degradação do ácido fítico na oxidação do lipídio e especialmente em uma formação de sabor indesejado pode ser minimizada mui efetivamente. Os inventores também verificaram que uma formação de sabor indesejado pode ser ainda mais minimizada pelo encerramento da fermentação do substrato baseado em soja usando pasteurização, resfriamento e/ou ajuste de pH.

[011] Portanto, a invenção presente diz respeito a um método de preparo de um produto fermentado à base de soja, o dito método compreendendo:

- a. fornecer um líquido aquoso contendo 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja;
- b. pasteurizar ou esterilizar o líquido aquoso;
- c. inocular o líquido pasteurizado ou esterilizado com uma cultura iniciadora que contém bactéria ácido-láctica;

d. fermentar o líquido aquoso inoculado através de incubação em uma temperatura na faixa de 15 a 48 °C durante 0,5 a 24 horas para obter um produto fermentado;

em que fitase é adicionada ao líquido pasteurizado ou esterilizado não mais de 10 minutos antes do término da etapa de fermentação d, em que a etapa de fermentação d. é terminada por um ou mais das seguintes ações:

- pasteurização do produto fermentado;
- resfriamento do produto fermentado a uma temperatura menor do que 10°C;
- ajuste do pH do produto fermentado a um pH menor do que 4,5.

[012] Embora os inventores não desejem estar presos pela teoria, acredita-se que no presente método o efeito sequestrante do ácido fítico é gradualmente diminuído enquanto que ao mesmo tempo a oxidação aumentada dos ácidos graxos insaturados resultantes da “liberação” de cátions de ferro e/ou cobre previamente sequestrados é anulada pela habilidade da bactéria ácido-láctica para digerir produtos de oxidação indutores de sabor indesejado. Portanto, o presente método é capaz de gerar um produto fermentado compreendendo minerais metálicos, como ferro, que são altamente biodisponíveis e que tem pouco ou nenhum sabor indesejado. Em contraste, se um material de proteína de soja é submetido ao tratamento com fitase e, subsequentemente, aplicado em um método que produz produtos fermentados à base de soja, um ou mais sabores indesejados acentuados irão se desenvolver como pró-oxidantes metálicos não sequestrados podem exercer seu efeito pró-oxidante total durante a preparação do substrato de fermentação e a fermentação subsequente.

[013] A formação de sabor indesejado é ainda mais minimizada pelo término da fermentação pela pasteurização, resfriamento ou ajuste de pH. Os inventores acharam que, por exemplo, a esterilização de produtos

fermentados a base de soja faz surgir à formação de notas de sabores indesejados acentuados. Em contraste, tal nota de sabor indesejado é dificilmente formada se a fermentação é encerrada por pasteurização, resfriamento ou ajuste de pH.

[014] Os inventores descobriram adicionalmente que produtos fermentados à base de soja contendo quantidades consideráveis de ferro e/ou magnésio biodisponível e exibindo uma estabilidade oxidante surpreendentemente alta pode ser obtida garantindo que a quebra enzimática do ácido fítico progride apenas até o ponto que o número médio de resíduos de fosfato nos fosfatos de inositol (isto é, mono- a hexafosfatos de inositol) contidos no produto fermentado é dentro da faixa de 1,5 a 4,0.

[015] Consequentemente, outro aspecto da invenção diz respeito a um produto fermentado contendo:

- 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja;
 - 0,1 a 20 % em peso de óleo que tem um teor de ácido graxo poli-insaturado de pelo menos 0,1% em peso do produto fermentado;
 - 0,01 a 7,5 mmol/L de ferro e/ou 0,5-375 mmol/L de magnésio;
 - pelo menos 3 μ mol/L de fosfatos de inositol seleccionados a partir de monofosfato de inositol, difosfato de inositol, trifosfato de inositol, tetrafosfato de inositol, pentafosfato de inositol, hexafosfato de inositol e combinações dos mesmos; e
 - 20 a 99 % em peso de água;
- em que o número médio de resíduos de fosfato dos fosfatos de inositol contidos no produto fermentado está na faixa de 1,5 a 4,0.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[016] Um primeiro aspecto da invenção presente diz respeito a um método de preparo de um produto fermentado à base de soja, sendo que o dito método compreende:

a. fornecer um líquido aquoso que contém 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja;

b. pasteurizar ou esterilizar o líquido aquoso;

c. inocular o líquido pasteurizado ou esterilizado com uma cultura iniciadora que contém bactéria ácido-láctica;

d. fermentar o líquido aquoso inoculado através da incubação a uma temperatura na faixa de 15 a 48°C durante 0,5 a 24 horas para obter um produto fermentado;

em que fitase é incorporada no líquido aquoso seguido pela pasteurização do dito líquido aquoso na etapa b, ou em que fitase é adicionada ao líquido pasteurizado ou esterilizado não mais que 10 minutos antes do término da etapa de fermentação d, dita fitase sendo incorporada no líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade de não mais que 11 FTU por grama de proteína de soja; um FTU sendo a atividade de fitase que gera 1 µmol de fósforo inorgânico por minuto a partir de um excesso de fitato de sódio a um pH 5,5 e 37 °C; e em que a etapa de fermentação d. é terminada por uma ou mais das seguintes ações:

- pasteurização do produto fermentado;

- resfriamento do produto fermentado a uma temperatura menor do que 10 °C;

- ajuste do pH do produto fermentado a um pH menor do que 4,5.

[017] O termo "bactéria ácido-láctica" é usado neste se referindo a um bacilo ou coco em formato de bastonete Gram positivo, tolerante a ácido, que não esporule, que não respire, que produz ácido láctico como o maior produto final metabólico da fermentação de carboidrato. Conforme usado neste, o termo "bactéria ácido-láctica" não abrange bactérias bífidas.

[018] O termo "lactato" conforme usado neste abrange o ácido láctico assim como sais comestíveis do ácido láctico.

[019] O termo "fitase" conforme usado neste se refere a uma enzima que é capaz de quebrar o ácido fítico (hexafosfato de inositol), por exemplo, pela hidrolização do ácido fítico de forma que libere um ou mais fosfatos a partir deste ponto. Preferivelmente, a fitase é capaz da remoção pelo menos de 3 grupos de fosfato do ácido fítico.

[020] A fitase pode adequadamente ser incorporada no líquido aquoso contendo proteína de soja primeiramente pela adição de proteína de soja e Subsequentemente da fitase. A fitase pode também ser incorporada no líquido aquoso pela adição primeiramente da fitase e subsequentemente a proteína de soja, ou por adicionar fitase e proteína de soja simultaneamente.

[021] No presente método a fitase é tipicamente incorporada no líquido aquoso ou o líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade de pelo menos 0,1 FTU por grama de proteína de soja; um FTU sendo a atividade da fitase que gera 1 μ mol de fósforo inorgânico por minuto a partir de um excesso de fitato de sódio em pH 5,5 e 37 °C. Uma metodologia adequada para determinar a atividade da fitase é descrita em M. Wyss *et al.*; Biophysical Characterisation of fungal fitases (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) : Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. Appl . Envir. Micr., 65 (2), 359 a 366, 1999.

[022] Preferivelmente, a fitase é adicionada em uma quantidade de pelo menos 0,2 FTU por g de proteína de soja, mais preferivelmente de pelo menos 1 FTU por grama de proteína de soja e mais preferivelmente pelo menos 1,5 FTU por grama de proteína de soja. Os inventores acharam que é vantajoso empregar uma quantidade relativamente pequena de fitase para evitar a degradação completa do ácido fítico em ácido inositol e fosfórico. Consequentemente, in uma realização preferida, a quantidade de atividade da fitase adicionada não excede 5 FTU por grama de proteína de soja e mais preferivelmente não excedendo 2,3 FTU por grama de proteína de soja.

[023] É preferível adicionar a fitase bem antes do término da etapa de fermentação d. de forma a realizar todos os benefícios associados com a fermentação concorrente. De acordo com uma realização preferida, a fitase é adicionada pelo menos 30 minutos antes, e preferivelmente pelo menos 1 hora antes do término da etapa de fermentação d.

[024] Dependendo da dosagem da fitase usada e as condições de fermentação empregadas é geralmente livre de problemas atingirem uma degradação suficiente de ácido fítico dentro de 12 horas, ou até mesmo dentro de 6 horas. Portanto, vantajosamente a fitase é adicionada não mais que 12 horas, até mais preferivelmente não mais do que 6 horas antes do término da etapa de fermentação d e mais preferivelmente não mais que 4 horas antes do término da etapa de fermentação d.

[025] Desde que algumas fitases disponíveis comercialmente exibam termoestabilidade muito alta, é possível adicionar fitase ao presente líquido aquoso antes da pasteurização conforme a atividade da fitase suficiente irá permanecer depois da pasteurização para atingir degradação adequada do ácido fítico dentro de, por exemplo, 12 horas. De forma a minimizar a perda de atividade da fitase, porém, é preferível adicionar a fitase ao líquido pasteurizado ou esterilizado aquoso.

[026] De acordo com uma realização especialmente preferida, a fitase é adicionada dentro de 15 minutos da inoculação do líquido pasteurizado ou esterilizado. Até mais preferivelmente, a fitase é adicionada dentro de 10 minutos, ou até mesmo de 5 minutos do momento da inoculação. Aqui a expressão "dentro de X minutos de" significa que a fitase é adicionada menos que X minutos antes da inoculação e menos que X minutos depois da inoculação.

[027] Pela combinação de adição de fitase com a inoculação, pode-se garantir que a atividade da fitase no produto final fermentado é

minimizada, especialmente se tal produto fermentado é pasteurizado ou esterilizado. Os inventores acharam que a degradação suficiente do ácido fítico para aumentar consideravelmente a biodisponibilidade de minerais que são presos pelo ácido pode ser atingida adicionando uma dose pequena de fitase ao líquido pasteurizado ou esterilizado simultaneamente com a inoculação do dito líquido. Vantajosamente, o presente método compreende a adição de fitase para o líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade que é equivalente a 0,0005 a 5,75 FTU/ml, mais preferivelmente em uma quantidade de 0,005 a 0,58 FTU/ml e mais preferivelmente em uma quantidade de 0,0075 a 0,23 FTU/ml.

[028] Pela adição de fitase em uma dose pequena, a atividade da fitase no produto final fermentado pode ser mantida baixa, e a pasteurização irá reduzir a dita atividade para um nível insignificante, mesmo se uma fitase estável ao calor for usada. Será entendido que é vantajoso não ter atividade da fitase no produto final, pois tal atividade residual pode afetar adversamente a estabilidade do produto. Tipicamente, a atividade da fitase no produto fermentado não excede 0,12 FTU/ml. Até mais preferivelmente, a atividade da fitase no produto fermentado não excede 0,06 FTU/ml, mais preferivelmente não excede 0,01 FTU/ml.

[029] De acordo com uma realização especialmente preferida, o presente método compreende a pasteurização do produto fermentado, e a dita pasteurização causa uma redução na atividade da fitase de pelo menos 90%, mais preferivelmente de pelo menos 95% e mais preferivelmente de pelo menos 99%.

[030] O nível de dosagem no qual a fitase deveria ser adicionada de forma a atingir um produto final em que o ácido fítico foi degradado suficientemente para fazer minerais presos biodisponíveis assim como o produto final que contém pouca ou nenhuma atividade da fitase, especialmente

se o produto é pasteurizado e/ou se uma fitase estável ao calor é usada, depende de vários fatores como a duração da enzimólise, o pH, a temperatura, a concentração de ácido fítico etc. A relação entre a atividade da fitase e a temperatura e o pH foram estudados e podem ser descritos conforme segue:

$$10^{-(T+5)/15} \times 10^{(pH-11,5)/2} \leq \text{Dosagem (em FTU/ml)} \leq 10^{-(T-25)/15} \times 10^{(pH-7,5)/2}$$

em que T está dentro da faixa de 25 e 50°C e representa a temperatura de fermentação em °C e o pH está dentro da faixa de 3,5 a 7,5 e representa o pH do líquido aquoso quando a fitase é adicionada.

[031] De acordo com a realização especialmente preferida, o presente método utiliza uma fitase estável ao calor, o termo "fitase estável ao calor" conforme usado neste se refere a uma fitase que quando presente em 10 nM de acetato de sódio (pH 7) em uma quantidade de 5,75 FTU/ml perde menos que 50 %, preferivelmente menos que 30 % da dita atividade da fitase quando exposta a 80 °C por 30 minutos.

[032] O líquido aquoso empregado no presente método vantajosamente compreende de 0,75 a 6 % em peso, preferivelmente de 2 a 3,5 % em peso de proteína de soja. O conteúdo de proteína de soja do líquido pasteurizado ou esterilizado assim como o do produto fermentado estão preferivelmente dentro dessas mesmas faixas.

[033] A proteína de soja pode adequadamente ser fornecida na forma de leite de soja, pó de leite de soja, concentrado de proteína de soja, isolado de proteína de soja, isolado de proteína de soja hidrolisada ou uma combinação disso. Leite de soja (extratos) adequado, concentrado de proteína de soja, isolados de proteína de soja ou isolados de proteína de soja hidrolisada são comercialmente disponíveis, por exemplo, de fornecedores como Solae, Cargill, Kerry Grupo pic e SunOpta pic. Em uma realização particular preferida da invenção, o leite de soja (extrato), isolado de proteína de soja ou isolado de proteína de soja hidrolisada foi tornado sem sabor usando

quaisquer dos métodos descritos na técnica anterior, como por exemplo, no documento US 7,108,881.

[034] O líquido aquoso contendo proteína de soja é pasteurizado ou esterilizado antes da fermentação de forma a evitar contaminação microbiana. A esterilização e a pasteurização podem ser atingidas usando diferentes técnicas bem conhecidas na técnica, como tratamento de calor, filtragem por membrana, pressão ultra-alta e etc.

[035] Os inventores encontraram que resultados especialmente bons podem ser obtidos com o presente método no caso da etapa de fermentação d. compreende a incubação em uma temperatura na faixa de 25 a 48 °C, até mesmo mais preferivelmente na faixa de 30 a 43 °C. Tipicamente, a dita incubação tem uma duração de 0,5 a 14 horas, preferivelmente de 0,5 a 10 horas e mais preferivelmente de 1 a 8 horas.

[036] A etapa de fermentação d. é encerrada por uma ou mais das seguintes ações:

- pasteurizar o produto fermentado;
- resfriar o produto fermentado para uma temperatura menor que 10 °C, preferivelmente menor que 8 °C;
- ajustar o pH do produto fermentado para um pH menor que 4,5.

[037] Diferente da esterilização, as ações de término citadas anteriormente não resultam em desativação da fitase. Foi descoberto, porém, que não é necessário desativar a fitase de forma a obter um produto estável fermentado com excelentes propriedades organolépticas.

[038] Em uma realização posterior preferida o produto fermentado é homogeneizado para gerar um produto tendo uma viscosidade em 7 °C menor que 50 mPa.s a 100 s⁻¹. A homogeneização produz um produto fermentado muito suave de baixa viscosidade que forma uma base excelente para uma bebida.

[039] Exemplos de bactérias ácido-lácticas que podem ser usadas no presente método incluem: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus easei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis*. Naturalmente, a invenção presente também abrange o uso combinado de dois ou mais das bactérias ácido-lácticas acima mencionadas.

[040] De acordo com uma realização do presente método, a bactéria ácido-láctica preferivelmente produz uma quantidade significativa de ácido láctico durante a etapa de fermentação d. Conseqüentemente, durante a etapa de fermentação d. a produção fermentativa de lactato preferivelmente faz o pH diminuir por pelo menos 1,2 unidades de pH, mais preferivelmente por pelo menos 1,5 unidades de pH.

[041] De acordo com outra realização do presente método, apenas uma quantidade limitada de ácido láctico é produzida durante a etapa de fermentação d., significando que durante a dita etapa de fermentação a produção de lactato causa uma diminuição do pH de menos que 1,2 unidades de pH, preferivelmente menos que 1,0 unidades de pH. A bactéria mesofílica ácido-láctica é especialmente adequada para o uso de acordo com essa realização.

[042] De forma a produzir um produto fermentado sem notas de sabor indesejado, as condições de fermentação no presente método são controladas de forma a promover uma metabolização do C₅-C₉ n-alcanóis e/ou trans-2-hexenal. Conseqüentemente, em uma realização especialmente preferida do presente método, durante a etapa de fermentação d. uma concentração de pelo menos um C₅-C₉ n-alcanol, e preferivelmente de pelo

menos 3 C5-Cg n-alcanóis não aumenta. Ainda mais preferivelmente, durante a etapa de fermentação d. a concentração de pelo menos um C5-Cg n-alcanol diminui por pelo menos 30%, e preferivelmente por pelo menos 50%.

[043] De acordo com outra realização preferida, durante a etapa de fermentação d. a concentração de trans-2-hexenal não aumenta. Ainda mais preferivelmente, durante a etapa de fermentação d. a concentração de trans-2-hexenal diminui por pelo menos 30%, e preferivelmente por pelo menos 50%.

[044] Uma diminuição na concentração de uma particular substância por X% significa que se a concentração inicial era de Y PPM, a concentração diminuída é igual a $Y(100-X) / 100$ PPM.

[045] As concentrações de álcool e alquenal referidas neste documento são determinadas pela metodologia analítica descrita nos exemplos.

[046] Usando os acima mencionados métodos analíticos está bem dentro da habilidade de uma pessoa versada na técnica de fermentação de alimentos para selecionar adequada de cepas LAB e para aperfeiçoar as condições do processo de tal maneira que a digestão desejada de aldeídos não desejados é realizada.

[047] Conforme explicado anteriormente neste, o tratamento com fitase no presente método oferece a vantagem de que ele aumenta a biodisponibilidade dos cátions de metal multivalentes que estavam complexados pelo ácido fítico. Desde que os isolados e concentrados de proteína de soja tipicamente contenham quantidades apreciáveis de ferro e/ou magnésio, o presente método é especialmente efetivo em caso do líquido aquoso conter pelo menos 0,01 mmol/l de ferro e/ou pelo menos 0,5 mmol/l de magnésio. Preferivelmente, a concentração de ferro no líquido aquoso está dentro da faixa de 0,02 a 7,5 mmol/l, mais preferivelmente dentro de uma faixa de 0,1 a 1 mmol/l. Da mesma maneira, uma concentração de magnésio

preferida no líquido aquoso está dentro da faixa de 1 a 375 mmol/l, mais preferivelmente dentro de uma faixa de 5 a 50 mmol/l.

[048] Será entendido que os benefícios do método presente são mais acentuados no caso do líquido pasteurizado ou esterilizado conter níveis apreciáveis de ácido fítico. Desde que formas de ácido fítico parcialmente hidrolisadas, especialmente pentafofato de inositol, também têm a habilidade de complexar metais multivalentes, também estes fosfatos de inositol podem afetar adversamente a biodisponibilidade de minerais como ferro e magnésio. De acordo com a realização preferida o conteúdo combinado de hexafofato de inositol e pentafofato de inositol do líquido aquoso excede 1 μmol por grama de proteína de soja, e mais preferivelmente excedendo 5 μmol por grama de proteína de soja e mais preferivelmente excedendo 20 μmol por grama de proteína de soja.

[049] Desde que o presente método busca reduzir consideravelmente os níveis de ácido fítico quelante, o conteúdo combinado de hexafofato de inositol e pentafofato de inositol do produto fermentado preferivelmente não excede 5 μmol por grama de proteína de soja. Ainda mais preferivelmente o conteúdo combinado de hexafofato de inositol e pentafofato de inositol do produto fermentado não excede 3 μmol por grama de proteína de soja, mais preferivelmente que não exceda 1 μmol por grama de proteína de soja.

[050] Tipicamente, no método da invenção presente o conteúdo combinado de hexafofato de inositol e pentafofato de inositol expressados em mol é reduzido por pelo menos 80% durante o período começando com a adição de fitase e finalizando com o término da etapa de fermentação d. Ainda mais preferivelmente a redução acima mencionada é de pelo menos 85%, e mais preferivelmente de pelo menos 95%.

[051] Como um resultado do tratamento com fitase, o presente

método produz um produto fermentado em que o número médio de resíduos de fosfato nos ésteres de fosfato de inositol é reduzido consideravelmente. Tipicamente, o hexafosfato de inositol e o pentafofosfato de inositol juntos representam menos que 50 mol%, mais preferivelmente menos que 30 mol%, e mais preferivelmente menos que 15 mol% da quantidade total de inositol e fosfato de inositol que esteja contido no produto fermentado.

[052] Da mesma maneira, difosfato de inositol e trifosfato de inositol juntos, preferivelmente representam pelo menos 30 mol%, e mais preferivelmente pelo menos 50 mol% da quantidade total de fosfato de inositol que está contido no produto fermentado.

[053] Os inventores descobriram que é vantajoso manipular a quebra enzimática do ácido fítico de forma a garantir que, por um lado, uma degradação suficiente de hexafosfato de inositol e pentafofosfato de inositol seja atingida para aumentar a biodisponibilidade dos minerais que foram complexados por estes fosfatos de inositol e por outro lado, não converta completamente os fosfatos de inositol em monofosfato de inositol e ácido fosfórico. Mais especialmente, os inventores têm observado que é vantajoso degradar o ácido fítico para tal nível que o número médio de resíduos de fosfato contidos nos fosfatos de inositol (isto é, mono- a hexafosfatos de inositol) esteja dentro da faixa de 1,5 a 4,0, preferivelmente dentro de uma faixa de 2,0 a 4,0. Embora os inventores não desejem estar presos pela teoria acredita-se que, por exemplo, o difosfato de inositol e o trifosfato de inositol tenham virtualmente nenhum efeito na biodisponibilidade de minerais como cátions de ferro, aonde esses fosfatos de inositol de alguma forma suavizem o efeito pró-oxidante em tais minerais.

[054] O presente método pode adequadamente compreender a adição de um ou mais ingredientes alimentícios e/ou micronutrientes. O método pode, por exemplo, compreender a adição de frutas e/ou vegetais constituintes,

no líquido aquoso, o produto pasteurizado ou esterilizado, ou o produto fermentado. Exemplos de constituintes de fruta que podem ser adicionados incluem pedaços de fruta, suco de fruta e concentrado de fruta. Exemplos de outros ingredientes e aditivos que podem ser adicionados em algum estágio do presente método incluem adoçantes, substâncias flavorizantes, preservativos, vitaminas, minerais, indutores de saciedade ou agentes melhoradores, agentes diminuidores de colesterol, etc.

[055] De acordo com a realização preferida da invenção presente, o método compreende a adição ao produto fermentado de um ou minerais selecionados a partir do grupo consistindo de ferro, cobre, magnésio ou zinco, mais preferivelmente de um ou minerais selecionados do ferro e do magnésio. Mais preferivelmente, o presente método compreende a adição de ferro ao produto fermentado obtido da etapa d. a adição de um ou mais desses minerais torna possível padronizar o nível desses minerais no produto final conforme as concentrações desses minerais nas matérias primas, notavelmente no material de origem da proteína de soja, pode variar consideravelmente. De acordo com uma realização especialmente preferida o ferro é incorporado no produto fermentado em uma quantidade de pelo menos 0,01 mmol/l de forma a atingir uma concentração final de ferro de pelo menos 0,15 mmol/l.

[056] Tipicamente, a etapa de inocular o líquido pasteurizado ou esterilizado, envolve a aplicação de uma cultura iniciadora contendo uma quantidade suficiente de bactérias ácido-lácticas viáveis ao líquido. Preferivelmente, a cultura iniciadora é adicionada em uma quantidade que é adequada para gerar na ordem de 10^4 - 10^9 Cfu/ml de bactéria ácido-láctica justamente no fim da etapa de fermentação d. De acordo com a realização preferida, a cultura iniciadora entrega no fim da fermentação $10^{4,5}$ - 10^8 , ⁵, preferivelmente 10^5 - 10^8 por ml de células de bactéria viáveis ácido-lácticas.

[057] Outro aspecto da invenção presente diz respeito a produto à base de soja fermentado por bactéria ácido-láctica, que foi submetido a tratamento com fitase, dito produto fermentado contendo:

- 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja;
 - 0,1 a 20 % em peso de óleo que possui um teor de ácido graxo poli-insaturado de pelo menos 0,1% em peso do produto fermentado;
 - 0,01 a 7,5 mmol/L de ferro e/ou 0,5 a 375 mmol/L de magnésio,
 - pelo menos 3 $\mu\text{mol/L}$ de fosfatos de inositol selecionados a partir de monofosfato de inositol, difosfato de inositol, trifosfato de inositol, tetrafosfato de inositol, pentafofosfato de inositol, hexafofosfato de inositol e combinações dos mesmos; e
 - de 20 a 99 % em peso de água;
- em que o número médio de resíduos de fosfato dos fosfatos de inositol contidos no produto fermentado está dentro da faixa de 1,5 a 4,0.

[058] De acordo com a realização preferida, a atividade da fitase no produto fermentado é reduzida para menos que 0,1 FTU/1, mais preferivelmente menos que 0,05 FTU/1, mais preferivelmente menos que 0,005 FTU/1. A atividade da fitase no produto fermentado pode ser reduzida adequadamente pela pasteurização ou esterilização, especialmente pela esterilização. Conseqüentemente, o produto fermentado à base de soja preferivelmente é um produto pasteurizado ou esterilizado, mais preferivelmente um produto esterilizado.

[059] O produto fermentado da invenção presente tipicamente contém material da bactéria ácido-láctica em uma quantidade equivalente a 10^4 - 10^9 de células da bactéria ácido-láctica por ml, o dito material da bactéria ácido-láctica sendo selecionado a partir de bactérias vivas ácido-lácticas, bactérias mortas ácido-lácticas, resíduos de bactéria ácido-láctica o e combinações disso. Mais preferivelmente, o produto fermentado contém

material da bactéria ácido-láctica, especialmente material da bactéria ácido-láctica selecionado a partir de bactérias vivas ácido-lácticas, bactérias mortas ácido-lácticas e combinações disso, em uma quantidade equivalente a 10^6 - $10^{8,5}$ células da bactéria ácido-láctica por mililitro.

[060] O produto fermentado tipicamente contém pelo menos que 0,1 % em peso de óleo. Vantajosamente, o produto fermentado contém de 0,1 a 20 % em peso de óleo, especialmente óleo de soja.

[061] As concentrações de ferro mencionadas neste preferivelmente dizem respeito ao ferro catiônico, notavelmente o ferro catiônico selecionado a partir de Fe^{2+} , Fe^{3+} e combinações disso. Da mesma maneira, as concentrações de magnésio preferivelmente se referem a magnésio catiônico, notavelmente Mg^{2+} .

[062] A quantidade molar de ácido fítico achado nas fontes de proteína de soja frequentemente excede a quantidade molar de ferro que está presente nessas mesmas fontes de proteína de soja. Conseqüentemente, de forma a tornar o ferro biodisponível, é importante que a taxa molar de ferro para os multifosfatos de inositol excede 1:1. Aqui o termo " multifosfatos de inositol " se refere a fosfatos de inositol selecionados a partir de tetrafosfato de inositol, pentafofato de inositol, hexafofato de inositol e combinações destes. Preferivelmente, de acordo com a invenção presente, a taxa molar do ferro para os multifosfatos de inositol no produto fermentado excede 2:1, mais preferivelmente excedendo 3:1.

[063] A concentração de fosfatos de inositol no produto fermentado vantajosamente está dentro de uma faixa de 0,05 a 8 mmol/l. Expressado diferentemente, a concentração dos fosfatos de inositol preferivelmente está dentro de uma faixa de 5 a 80 μ mol por grama de proteína de soja, mais preferivelmente dentro de uma faixa de 10 a 50 μ mol por grama de proteína de soja.

[064] De acordo com a especialmente realização preferida, o número médio de resíduos de fosfato dos fosfatos de inositol contidos no produto fermentado está dentro da faixa de 1,6 a 3,5.

[065] Conforme explicado anteriormente neste, o conteúdo combinado de hexafosfato de inositol e pentafofosfato de inositol do produto fermentado preferivelmente não excede 5 μmol por grama de proteína de soja. Até mais preferivelmente, o conteúdo do combinado de hexafosfato de inositol e pentafofosfato de inositol do produto fermentado não excede 3 μmol por grama de proteína de soja, mais preferivelmente não excede 1 μmol por grama de proteína de soja.

[066] Vantajosamente, hexafosfato de inositol e pentafofosfato de inositol, juntos, representam menos que 50 mol%, mais preferivelmente menos que 30 mol.%, e mais preferivelmente menos que 15 mol.% da quantidade total de inositol e fosfato de inositol que está contido no produto fermentado.

[067] De acordo, ainda, com outra realização preferencial, o difosfato de inositol e trifosfato de inositol juntos representam pelo menos 20% em mol, mais preferencialmente pelo menos 30% em mol, e com máxima preferência pelo menos 40% em mol do teor total de fosfato de inositol que compõe o produto fermentado.

[068] Os exemplos de produtos fermentados à base de soja que são abrangidos pela presente invenção incluem bebidas fermentadas de soja e iogurte à base de soja. Um produto fermentado particularmente preferencial é uma bebida fermentada de soja, de modo notável, uma bebida fermentada de soja que contém 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja e 20 a 99 % em peso, de preferência 60 a 98 % em peso de água.

[069] A invenção é adicionalmente ilustrada por meio dos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

ANÁLISE DE FÓSFORO

[070] A detecção fotométrica de fósforo hidrolisado proveniente de fitato, conforme descrito por Wyss et al. (Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A, Remy R, Tessier M, Kronenberger A et al. Biophysical characterization of fungal fitases (myo-inositol hexakisfosfato phosphohydrolases): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. Applied and Environmental Microbiology 1999; 65 (2): 359 a 366.).

[071] Uma amostra de 100 µl foi obtida e imediatamente diluída com um volume igual de 15% de ácido tricloroacético para interromper a reação de enzima. Subsequentemente, as amostras foram completamente misturadas durante poucos segundos e foram centrifugadas durante 5 minutos a 15.000 g. Os sobrenadantes foram diluídos 5 vezes em água desmineralizada e íons de fosfato subsequentemente liberados foram quantificados através da mistura de 10 µl dessa amostra diluída com 90 µl de água desmineralizada e 100 µl de 0,6 M de H₂SO₄, 2% de ácido ascórbico e 0,5% de molibdato de amônio. Após 30 minutos de incubação a 45°C, a absorbância a 820 nm foi medida em um leitor de placa de microtitulação (Spectramax). A contribuição do fósforo livre naturalmente presente em soja foi medida com o uso de um branco que contém (soja sem fitase) e que é subtraída dos valores da amostra. As soluções padrão de fosfato de potássio (2 a 400 µM) foram usadas como uma referência.

TESTE DE VIDA DE PRATELEIRA ACELERADA

[072] Os frascos *headspace* de 20 ml foram carregados com 2 ml de amostra. Os frascos foram armazenados a 60°C. A temperatura de 60°C foi escolhida para garantir que as amostras não se estragassem durante o período de armazenamento. As amostras foram armazenadas por um período de 28 dias. Durante esse período, as amostras foram analisadas regularmente

em triplicata com análise de voláteis por *headspace* estático em um GC-MS (HP) (coluna DBwax: 20m x 180µm x 0,3µm, J&W scientific) para marcadores de oxidação de lipídio (acetaldeído, 1-penteno-3-ol, 1-penteno-3-ona, 2t-pentenal, pentanal, pentano, 2t-butanal, propenal, propanal, hexanal). O programa de temperatura GC ocorreu como se segue: 2 minutos a 35°C, 35°C/minuto a 200°C, 2 minutos a 200°C. O volume da injeção foi de 250µl, sem divisão.

ANÁLISE DE ALDEÍDO

ANÁLISE DE VOLÁTEIS COM SABOR INDESEJADO ATRAVÉS DE SPME SUCEDIDA

POR GC-MS

[073] Uma quantidade de 2g de amostra foi colocada em um frasco *headspace* de 20 ml e vedada com uma tampa hermética ao ar.

[074] As amostras foram analisadas por meio de uma microextração em fase sólida. Fibra usada: Carboxen/PDMS de 85 µm, por exemplo, Supelco.

[075] As análises foram executadas em um GC/MS da Agilent, equipado com um injetor CIS-4 da Gerstel e um amostrador automático MPS-2 da Gerstel com opção SPME. Coluna: VF-5; 50m * 0,2 mm * 0,33 µm.

[076] Programa GC:

- 40°C(2 minutos) - (3°/minuto) ->160 °C (0 minuto) - (20 °/minuto) ->250°C (2 minutos)

- Gás: Hélio

- Fluxo: 1 ml/minuto, fluxo constante

Tempo de amostragem de SPME: 35 minutos a 40°C

Dessorção: 40 minutos a 170°C

Tempo de não divisão: 2 minutos

BIODISPONIBILIDADE DE FERRO IÔNICO

[077] Todos os artigos de vidro foram incubados durante a noite

em 10 % (v/v) de HNO₃. No dia do experimento, todos os artigos de vidro foram lavados 5 vezes com água milli-Q para remover o HNO₃.

[078] Após uma agitação vigorosa, amostras de 60 g foram obtidas e combinadas com 20 mL de água em 100 mL de vasos de dissolução. Esses vasos foram transferidos para um aparelho de dissolução (tipo II, Vankel VK700). O pH foi ajustado a 2,0. Subsequentemente, a pepsina (0,5 g/L) foi adicionada a cada vaso, produzindo uma solução de 90 mL de suspensão de produto em fluido gástrico simulado a um pH de 2,0. Após 60 minutos de incubação a 37 °C com mistura a 100 rpm, uma amostra da suspensão foi obtida para determinação de ferro total e para uma simulação da fase intestinal em um frasco Erlenmeyer.

[079] Para a simulação da fase intestinal, uma membrana de diálise (Spectra/Por 7 MWCO 8000) carregada com uma solução de água de NaHCO₃ foi posicionada no frasco Erlenmeyer. A quantidade de bicarbonato de sódio presente na membrana de diálise pode ajustar a digestão simulada a um pH de 6,8. Após 30 minutos de incubação em um banho-maria a 37 °C e em agitação contínua (100 rpm), uma mistura de pancreatina (0,4 mg/mL) e solução de ácidos de bile (1,25 mg/mL) foi adicionada ao frasco. O frasco foi adicionalmente incubado com uma membrana de diálise por mais 2 horas no mesmo banho-maria a 37°C com agitação contínua (100 rpm). Em seguida, uma membrana de diálise foi removida e uma amostra do teor do dialisado foi obtida para a determinação da quantidade de ferro dialisável iônico.

[080] O ferro total foi determinado através de espectroscopia de emissão com plasma. O ferro iônico (soma de Fe²⁺ e Fe³⁺) foi determinado com o uso de um Analisador da Roche/Hitachi e reagentes para a análise de ferro em soro humano à base de ferrozina.

EXEMPLO 1

[081] Uma base de soja de 2,5% de teor de proteína foi

preparada através da mistura de 5,6% de pó de leite de soja (pó de feijão de soja Soy Supreme Fibre Reduced disponível junto à SunOpta Grains and Food Group, Hope, MN, Estados Unidos da América) em água quente (90°C). O pó foi hidratado por pelo menos 15 minutos antes da adição de 2% de sacarose, 1% de glicose. Permitiu-se, então, que a mistura resfriasse a 43 °C e fosse dividida em 3 alíquotas iguais e fosse adicionalmente processada como se segue:

- A alíquota 1 foi mantida por 1 hora a 43°C antes da inoculação com 0,02 % de um concentrado de cultura de iogurte congelado comercialmente disponível T-071016 (cultura misturada definida de cepas de *Streptococcus thermophilus*, fornecida por Chr Hansen, Hørsholm, Dinamarca). A mistura foi incubada por um período adicional de 3 horas a 43°C e subsequentemente armazenada a 4°C até que fosse analisada por SPME, sucedida por GC-MS;

- A alíquota 2 foi tratada com 0,01% (p/p) de uma preparação de enzima comercialmente disponível de fitase (líquido de 5000 de fitase da DSM [pelo menos 5750 FTU/g] obtida junto à DSM Food Specialities B. V., Delft, Holanda) e mantida a 43°C por 1 hora. Após aquele período, a mistura foi inoculada com um concentrado de cultura de iogurte congelado comercialmente disponível T-071016 (cultura misturada definida de cepas de *Streptococcus thermophilus*, fornecida por Chr Hansen, Hørsholm, Dinamarca). A incubação foi continuada por um período adicional de 3 horas a 43°C e subsequentemente armazenada a 4°C até que fosse analisada através de SPME, sucedida por GC-MS;

- A alíquota 3 foi mantida por 1 hora a 43°C antes que a mistura fosse inoculada com um concentrado de cultura de iogurte congelado comercialmente disponível T-071016 (cultura misturada definida de cepas de *Streptococcus thermophilus*, fornecida por Chr Hansen, Hørsholm, Dinamarca)

e, ao mesmo tempo, fosse tratada com 0,01 % (p/p) de uma preparação de enzima comercialmente disponível de fitase (líquido de 5000 de fitase da DSM obtido junto à DSM Food Specialities B. V., Delft, Holanda). A incubação foi continuada por um período adicionalmente de 3 horas a 43°C e subsequentemente armazenada a 4°C até que fosse analisada por SPME, sucedida por GC-MS.

ANÁLISE DE HEXANAL

[082] Após a incubação, as alíquotas 1, 2 e 3 foram analisadas quanto aos níveis de hexanal, conforme descrito acima. Os resultados obtidos são descritos na Tabela 1.

TABELA 1

Após 3 horas de fermentação	Teor de hexanal (área abaixo do pico)
Alíquota 1	160.000
Alíquota 2	220.000
Alíquota 3	170.000

[083] Esses resultados indicam claramente que a fermentação e o tratamento com fitase concomitantes produzem menos sabor de oxidação do que o tratamento com fitase sucedido pela fermentação. A diferença observada teria sido maior se a alíquota 2 tivesse sido preparada a partir de um pó de feijão de soja tratado com fitase, sucedida por uma fermentação de 3 horas, conforme descrito anteriormente na presente.

EXEMPLO 2

[084] Uma base de soja de 5% de teor de proteína foi preparada com o uso do procedimento descrito no Exemplo 1. Além disso, uma solução de fitase aquosa foi preparada através da dissolução de fitase (líquido de 500 de fitase da DSM obtido junto à DSM Food Specialities B. V., Delft, Holanda) em água de torneira (diluição de 100X).

[085] A uma quantidade de 5L de base de soja, 5 ml de fitase

diluída foram adicionados (diluição de enzima total = 100.000x), o que antecedeu a incubação a 43°C. A fim de imitar um processo de fermentação de uma maneira reproduzível, a mistura foi gradualmente acidificada com ácido láctico. Portanto, as alíquotas de ácido láctico foram adicionadas em intervalos de 30 minutos para diminuir o pH da mistura gradualmente por 0,5 unidades de pH por vez, alcançando um pH final de 4,5 após 5 horas. As amostras de 750 ml foram obtidas após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas, diluídas 2x com água desmineralizada, ajustadas a um pH de 4,0 com ácido láctico e homogeneizado com Ultraturrax por 10 segundos. Essas amostras foram submetidas imediatamente à homogeneização e pasteurização (a 77°C) a fim de interromper a atividade da fitase.

[086] A composição de fosfato de inositol das amostras pasteurizadas foi determinada pela análise de níveis de fosfato livre nas amostras, com o uso do procedimento de análise de fósforo descrito anteriormente aqui. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

[087] As amostras pasteurizadas também foram submetidas a um teste de oxidação acelerada, conforme aqui descrito anteriormente. Os níveis de hexanal nas amostras foram determinados em intervalos regulares com o uso de análise de *headspace* estático, conforme aqui descrito anteriormente. Constatou-se que o desenvolvimento de níveis de hexanal em todas as amostras segue uma curva em S que alcança seu máximo após 10 a 15 dias. Para cada amostra, o tempo após cada nível de hexanal ter alcançado 50% de seu nível máximo foi determinado ($t_{1/2}$). Os resultados são mostrados na Tabela 2.

[088] A biodisponibilidade de ferro iônico do ferro contido nas amostras pasteurizadas foi determinada com o uso de teste *in vitro* aqui descrito anteriormente.

[089] Os resultados são novamente retratados na Tabela 2.

TABELA 2

Tempo de incubação	Fosfato livre	Oxidação t _{1/2}	Ferro biodisponível iônico
0 hora	3 nM	12 dias	11,9%
1 hora	4 nM	12 dias	14,7%
2 horas	7,5 nM	11 dias	21,4%
3 horas	10 nM	11 dias	37,7%
4 horas	14 nM	9 dias	37,3%
5 horas	14 nM	9 dias	38,1%

[090] Esses resultados mostram que o melhor resultado em termos de sabor e biodisponibilidade de ferro é alcançado através da desfitinização parcial do ácido fítico. Nesse teste, o resultado otimizado foi alcançado após 2 a 3 horas, o que se iguala a um número médio de resíduos de fosfato nos fosfatos de inositol na faixa de 2,5 a 3,8.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE PREPARO DE UM PRODUTO FERMENTADO À BASE DE SOJA, caracterizado pelo dito método compreender:

a) fornecer um líquido aquoso que contém 0,5 a 10 % em peso de proteína de soja;

b) pasteurizar ou esterilizar o líquido aquoso;

c) inocular o líquido pasteurizado ou esterilizado com uma cultura iniciadora que contém uma bactéria ácido-láctica;

d) fermentar o líquido aquoso inoculado através da incubação a uma temperatura na faixa de 15 a 48°C durante 0,5 a 24 horas para obter um produto fermentado;

em que fitase é adicionada ao líquido pasteurizado ou esterilizado tendo um pH de 3,5 a 7,5, de 30 minutos a 12 horas antes do término da etapa de fermentação d), a dita fitase sendo incorporada no líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade de 0,1 a 11 FTU por grama de proteína de soja; um FTU sendo a atividade de fitase que gera 1 μ mol de fósforo inorgânico por minuto a partir de um excesso de fitato de sódio a um pH de 5,5 e 37°C; e em que a etapa de fermentação d) é terminada por uma ou mais das seguintes ações:

- pasteurização do produto fermentado;

- resfriamento do produto fermentado a uma temperatura de 0 a 10°C;

- ajuste do pH do produto fermentado a um pH de 0 a 4,5.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela fitase ser incorporada no líquido aquoso ou no líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade de 0,1 a 5 FTU por grama de proteína de soja.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 2, caracterizado pela fitase ser incorporada no líquido aquoso ou no líquido pasteurizado ou esterilizado em uma quantidade de 0,1 a 2,3 FTU por grama de proteína de soja.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pela fitase ser adicionada 30 minutos, de preferência 1 hora, antes do término da etapa de fermentação d).

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pela fitase ser adicionada 12 horas, de preferência 6 horas, antes do término da etapa de fermentação d).

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pela etapa de fermentação d) compreender incubação a uma temperatura na faixa de 30 a 43 °C durante 0,5 a 10 horas.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pela etapa de fermentação d) ser terminada pela pasteurização do produto fermentado.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo teor combinado de hexafosfato de inositol e pentafosfato de inositol do líquido aquoso exceder de 1 μmol a 20 μmol por grama de proteína de soja.