



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

(11) PI 0908699-4 B1



(22) Data do Depósito: 14/05/2009

(45) Data de Concessão: 19/10/2021

(54) Título: MÉTODO ENZIMÁTICO PARA MODIFICAR A MORDIDA CURTA DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO CROCANTES

(51) Int.Cl.: A21D 13/00; A21D 8/04.

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2008 EP 08156398.3.

(73) Titular(es): PURATOS N.V..

(72) Inventor(es): BRUNO VAN WINCKEL; FABIENNE VERTE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009055819 de 14/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/138447 de 19/11/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/11/2010

(57) Resumo: MÉTODO DE APERFEIÇOAMENTO DA MORDIDA CURTA DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO E OTIMIZADOR PARA A MORDIDA CURTA PARA PRODUTOS ESTALADIÇOS. A presente invenção refere-se a um método para melhorar a mordida curta e parâmetros de textura de produtos de panificação ao se adicionar aos mesmos, pelo menos, um intermediário termoestável ou serina termoestável ou matelo-protease.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO ENZIMÁTICO PARA MODIFICAR A MORDIDA CURTA DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO CROCANTES**"

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um método para modificar a mordida curta e parâmetros de textura de produtos de panificação.

Antecedentes da invenção

[002] Os consumidores preferem comprar pão fresco e pretendem que este se mantenha fresco durante um período de tempo considerável. Os consumidores preferem igualmente comprar pão com o mínimo de aditivos possível (rotulados).

[003] Os aditivos que melhoram o pão e/ou a massa são, no processo de produção de pão, adicionados à massa de modo a melhorar a textura, volume, aroma e frescura do pão assim como a melhorar a maleabilidade e estabilidade da massa.

Estado da técnica

[004] Os emulsionantes têm o objetivo de melhorar a extensibilidade da massa e podem igualmente ser de algum valor para a consistência do pão daí resultante.

[005] A patente EP0776604 descreve a utilização de monoglicerídeos insaturados para produzir pãezinhos crocantes, passíveis de cozimento em micro-ondas, de mordida curta. No entanto, não se verifica qualquer quantificação de

mordida curta no referido documento.

[006] Uma das desvantagens de tais produtos é que, na Europa, a adição de emulsionantes e de outros aditivos, tais como monoglicerídeos, implicam a rotulagem específica dos produtos de panificação com um número E. Contrariamente aos monoglicerídeos e/ou emulsionantes, a adição de protease no pão não requer tal marcação específica.

[007] Proteases podem ser adicionadas em quantidade baixa comparativamente aos aditivos, preservando o sabor e outras propriedades organolépticas do pão.

[008] Proteases possuem já uma longa história em termos de utilização no setor de panificação. Estas são principalmente utilizadas pelo panificador para reduzir as exigências do desenvolvimento mecânico da massa de glúten excepcionalmente forte e resistente. As proteases reduzem a consistência da massa, reduzindo assim o valor farinográfico. As proteases reduzem a viscosidade e aumentam a extensibilidade da massa. Em termos de produto final, melhoram o volume do pão e respectiva cor. Também o aroma pode ser intensificado pela produção de determinados peptídeos. As proteases amolecem enzimaticamente o glúten e não mecanicamente. Após o cozimento do pão, pretende-se que as proteases fiquem inativadas.

[009] As proteases mais utilizadas na panificação provêm do *Aspergillus oryzae* e do *Bacillus subtilis*. As

proteases bacterianas neutras são, de longe, mais ativas em glúten do que as proteases alcalinas. Papaína, bromelina e ficina são tiol-proteases (cisteína) extraídas da papaia, abacaxi e figos. A papaína é altamente reativa no que se refere às proteínas. As proteases bacterianas e papaína, principalmente proteases neutras, são utilizadas em bolachas, *grissini* e bolachas salgadas onde se pretende um enfraquecimento pronunciado da massa. No entanto, na produção de pão, prefere-se uma hidrólise mais suave por meio de proteases de fungos. Patente EP-B-1496748 divulga a utilização uma protease termoestável intermediária ou uma protease termoestável para a prevenção ou retardamento do azedamento durante o processo de cozimento de produtos de panificação. Este efeito é principalmente notado em combinação com outras enzimas antienvelhecimento (como amilases termoestáveis produzidas pelo *Bacillus licheniformis* ou pelo *Bacillus stearothermophilus* e amilases termoestáveis maltogênicas).

[010] Proteases têm igualmente algumas desvantagens quando utilizadas na panificação. A ação das proteases não se limita em termos de tempo, uma vez que a ação pode ter continuidade após o processo de mistura. Esta situação pode dar lugar a um risco aumentado de enfraquecimento da massa e aumento da viscosidade da massa. Por vezes a ação das proteases pode ainda ser intensificada pela diminuição do pH

durante o processo de fermentação.

[011] A utilização de proteases na panificação requer um controle rígido no que respeita à fermentação da massa e às condições de controle da mesma. As proteases são inativadas durante a panificação (Kruger, J. E. (1987) *Enzymes and their role in cereal technology* AACC 290- 304). Principalmente as proteases de Bacilos neutras e a papaína deverão ser cuidadosamente doseadas, pois uma sobredosagem das mesmas poderá enfraquecer demasiadamente a massa. O enfraquecimento da massa poderá dar lugar ao colapso da massa antes de ir ao forno ou a um volume mais baixo do pão e a uma estrutura mais aberta de miolo. Na Europa, onde as farinhas são mais fracas do que nos EUA ou Canadá, o risco de sobredosagem da protease é particularmente presente.

[012] Mais ainda, as proteases aumentam igualmente a viscosidade da massa porque a ação hidrolítica provoca a libertação da água do glúten (Schwimmer, S. (1981) *Source book of food enzymology* - AVI Publishing, 583-584). Isto significa que, na prática, as proteases não são assim tão utilizadas na produção do pão, na Europa.

[013] As proteases de fungos são sensíveis a temperaturas altas. Algumas proteases bacterianas neutras e alcalinas são resistentes a tratamentos térmicos mais intensos. As proteases termoestáveis neutras produzidas pelo *Bacillus*, os quais podem ser tolerantes a agentes oxidantes,

são preferidas em formulações de detergentes. Também as proteases alcalinas termoestáveis produzidas por *Bacillus* são utilizadas em lavagens e formulações de detergentes.

[014] A papaína é muito estável ao calor e requer um aquecimento prolongado a 90 - 100°C para desativação. A bromelina é menos estável e é desativada a aproximadamente 70°C. Outras proteases estáveis ao calor são produzidas pelo *Bacillus licheniformis* NS70 (Chemical Abstracts, 127, 4144 CA), *Bacillus licheniformis* MIR 29 (Chemical Abstracts, 116, 146805 CA), *Bacillus stearothermophilus* (Chemical Abstracts, 124, 224587 CA), *Nocardiopsis* (Chemical Abstracts, 114, 162444 CA) e *Thermobacteroides* (Chemical Abstracts, 116, 146805 CA). Esta não é uma lista exaustiva, mas ilustra a importância das proteases termoestáveis e respectiva aplicação, principalmente em detergentes.

Objetivos da invenção

[015] A presente invenção refere-se a um método para melhorar a mordida curta em produtos de panificação sem as desvantagens das proteases acima mencionadas. Por exemplo, as proteases que possuem uma temperatura ótima próxima da temperatura ambiente proporcionam o enfraquecimento do glúten durante o amassar e o crescimento da massa e/ou alterações nas propriedades da reologia da massa.

[016] A invenção está igualmente relacionada com um melhoramento para a mordida curta de produtos de panificação.

Resumo da invenção

[017] A invenção refere-se a um método para o modificar a mordida curta de produtos de panificação, que inclui a fase de adição de, pelo menos, uma serina ou metalo-protease termoestável intermediária ou termoestável no referido produto de panificação.

[018] De acordo com a presente invenção, os parâmetros de textura que consistem na força (g) e o trabalho total (g. seg), necessários para partir uma amostra idêntica de produto de panificação podem igualmente ser medidos, por exemplo, por um dispositivo que analisa a textura, utilizado para partir o referido produto de panificação.

[019] De modo vantajoso, ambos os parâmetros de textura são medidos simultaneamente por um analisador de textura tal como classicamente utilizado na medição do pão, tal como, por exemplo, um analisador de textura (texturômetro) TA-XT2™.

[020] No método da presente invenção, a força (g) e o trabalho total (g. seg) são ambos preferencialmente melhorados por, pelo menos, 10% quando comparado a uma amostra idêntica, mas que não contém, pelo menos, uma serina ou metalo-protease termoestável intermediária ou termoestável.

[021] A invenção refere-se também a um método em que a mordida curta através de uma amostra de produto de

panificação é avaliada, por um grupo de pessoas, em um teste sensorial.

[022] De modo vantajoso, no método da presente invenção, a protease termoestável e/ou protease termoestável intermediária possui uma temperatura ótima de atividade superior a 60 °C, de preferência superior a 70 °C e ainda preferencialmente superior a 80 °C.

[023] Preferencialmente, a variação entre a atividade da protease a uma temperatura ótima e a atividade da protease a 25 °C é superior a 10 e preferencialmente superior a 15.

[024] De modo vantajoso, as proteases, de acordo com a invenção, não apresentam qualquer efeito adverso na reologia da massa, na estrutura do miolo e no volume do produto de panificação resultante.

[025] No método da invenção, as proteases são preferencialmente obtidas a partir da extração de organismos eucariontes ou procariontes que ocorrem naturalmente, por síntese ou por produção genética.

[026] Preferencialmente, a protease é uma protease neutra ou uma protease alcalina.

[027] A protease pode ser uma protease de *Thermus aquaticus*, preferencialmente isolada do *Thermus aquaticus* LMG8924, preferencialmente aqualisina I, termitase, isolada de *Termonoactinomyces vulgaris*, termolisina, isolada do

Bacillus termoproteoliticus ou subtilisina, isolada do *Bacillus licheniformis*.

[028] A presente invenção pode ser aplicada a produtos de panificação macios tais como pão, pãezinhos, donuts, pães-de-leite, bolos para micro-ondas, pastelaria dinamarquesa, pães para hambúrgueres, pizza, pão sírio e bolos.

[029] Proteases são preferencialmente adicionadas à farinha em 5000 a 7500 unidades /100 kg de farinha de Termitase, em 0,35 a 0,7 unidades /100 kg de farinha de Termolisina, em 0,35 a 0,7 unidades /100 kg de farinha de Subtilina ou em 230 a 10400 unidades /100 kg de farinha de protease de *Thermus aquaticus*, preferencialmente em 350 a 700 unidades de protease de *Thermus aquaticus* /100 kg de farinha.

[030] A presente invenção pode igualmente ser aplicada a produtos crocantes como baguetes e brioches.

[031] A protease de *Thermus aquaticus* é preferencialmente adicionada à farinha de produtos crocantes em 1300 a 10400 unidades de protease de *Thermus aquaticus* /100 kg de farinha.

De modo vantajoso, as proteases para utilização desta invenção são adicionadas ao produto de panificação antes de se formar a massa; preferencialmente as proteases são adicionadas à farinha; mais preferencialmente, as proteases

são adicionadas à mistura que inclui condutores apropriados normalmente utilizados em aplicações de panificação e/ou ingredientes ativos e/ou aditivos de panificação convencionalmente utilizados.

[032] Outro aspecto da invenção é um otimizador para melhorar a sensação na boca, principalmente a mordida curta nos produtos de panificação macios que contêm 230 a 1600 unidades de protease de *Thermus aquaticus* /100 kg de farinha, mais preferencialmente 350 a 700 unidades protease de *Thermus aquaticus* /100 kg de farinha, de preferência isolada de *Thermus aquaticus* LMG8924, preferencialmente *Aqualisina I*, ou 5000 a 7500 unidades /100 kg de farinha de Termitase, isolada de *Termonoactinomyces vulgaris* ou 0,35 a 0,7 unidades de *Termolisina*, isolada do *Bacillus termoproteoliticus* ou 0,35 a 0,7 unidades de Subtilisina, isolada do *Bacillus licheniformis*, /100 kg de farinha.

[033] O otimizador para melhorar a sensação na boca, em particular, a mordida curta nos produtos crocantes pode conter 1300 a 10400 unidades de protease de *Thermus aquaticus*/100 kg de farinha.

[034] Outro aspecto é a possível adição à protease da invenção de uma ou mais enzimas como amilase, xilanase, lipase, glucose oxidase, lipoxigenase, peroxidase e oxidase de hidratos de carbono.

[035] Para a protease da presente invenção, podem

ser adicionados um ou mais ingredientes de panificação como oxidantes (vitamina C ou azodicarbonamida), emulsionantes (mono ou diglicerídeos, ésteres de diacetil tartarato de monoglicerídeos, estearoil-lactilato de sódio), ésteres de açúcar ou ácidos graxos, lecitina; açúcar e/ou sal, gordura e/ou óleo.

Breve descrição das figuras

[036] As figuras 1a e 1b ilustram o analisador de textura TA-XT2™ (Stable Micro Systems UK). A figura 1a é um gráfico típico que apresenta a força aplicada ao analisador sobre uma amostra de produto de panificação em função do tempo, e a figura 1b apresenta o dispositivo e respectiva ação ao partir um pão; e

[037] As figuras 2a, 2b e 2c apresentam a atividade relativa de diversas proteases em função da temperatura. A figura 2a; protease de *Thermus aquaticus*, a figura 2b, Subtilisina, a figura 2c, termitase.

Descrição detalhada da invenção

[038] Os produtos macios da invenção apresentam uma crosta macia, incluindo, entre outros, todos os produtos de panificação embalados e produtos doces (embalados ou não embalados). O seu prazo de validade pode variar entre 2 a vários meses. O seu teor de gordura e açúcar varia entre 0 % a mais de 30 % cada. Exemplos não limitativos de produtos macios incluem pão, pãezinhos, *donuts*, pães-de-leite, bolos

para micro-ondas, pastelaria dinamarquesa, pães para hambúrgueres, pizza, pão sírio e bolos.

[039] Produtos crocantes possuem uma crosta estaladiça. Tanto o seu teor de gordura como de açúcar é inferior a 2 %. Estes produtos não são normalmente embalados ou embrulhados em papel. O seu prazo de validade é, no máximo, de aproximadamente 2 dias. Exemplos não limitativos de produtos crocantes são as baguetes e brioches ("rolls").

[040] As escolhas dos consumidores são ditadas por propriedades organolépticas, as quais incluem características tais como sensação na boca e rigidez.

[041] A sensação na boca pode influenciar a percepção do consumidor relativamente à frescura e se encontra fortemente relacionada com parâmetros como umidade, o derreter e a mordida curta.

[042] A sensação de umidade encontra-se fortemente correlacionada com o frescor e secura do miolo. No entanto, a umidade excessiva resulta em viscosidade.

[043] O processo de derretimento reflete o tempo e facilidade com que o bolo do pão pode ser engolido. O processo de derretimento é melhorado por uma umidade inicial suficiente, seguida por uma mordida curta e ausência de formação de bola na mastigação.

[044] Mordida curta, por vezes também referida como o oposto à mastigação e/ou dureza, é utilizada para designar

a força e trabalho total necessário para partir uma amostra de produto de panificação e/ou o número de mastigações necessárias para mastigar uma amostra semelhante até se obter uma consistência possível de engolir. A mordida curta pode ser facilmente medida pela formação de painéis de teste sensorial, sendo estes painéis formados por um número de indivíduos, e que podem ser razoavelmente quantificados utilizando uma escala arbitrária de mordida curta. Estas técnicas são bem conhecidas na indústria alimentícia e são normalmente referidos como testes organolépticos.

[045] É organizada uma sessão de formação inicial para familiarizar os participantes do teste com a variedade de produtos que serão avaliados. Nesta sessão, são apresentados modelos de referência para formar a opinião dos participantes que fazem parte do teste sensorial, para reconhecer as diferenças existentes entre os atributos do produto que serão avaliados.

[046] A mordida curta a ser estimada pelos testes sensoriais para formação dos indivíduos pode ser comparada com valores medidos por um analisador de textura.

[047] Um analisador de textura preferido é o TA-XT2™ (Stable Micro Systems UK; Figura 1).

[048] As proteases termoestáveis e/ou proteases intermediárias termoestáveis possuem uma atividade baixa a uma temperatura de 25 °C a 40 °C e uma temperatura ótima de

60-80 °C ou superior (vide Figura 2). A enzima pode precisar ou não de ativação durante o processo de panificação e, preferencialmente, perde a sua atividade no final do processo de panificação.

[049] As proteases termoestáveis e/ou intermediários termoestáveis podem ser produzidas por microrganismos, podendo estes serem: procarióticos (bactérias, archaeas) e eucariontes (fungos), ou extratos de plantas.

[050] As proteases, de acordo com a invenção, são de tal modo que a um pH em que a enzima é estável, as proteases possuem uma temperatura ótima que é superior a 60°C, preferencialmente maior que a 70°C e ainda mais preferencialmente maior que 80°C.

[051] A variação entre a atividade das proteases a temperatura ótima e a 25°C é, pelo menos, maior que a 10.

[052] As proteases apresentam uma ausência de efeito adverso na reologia da massa (tal como enfraquecimento da estrutura da massa), na estrutura do miolo (tal como aparecimento de uma estrutura de miolo aberto) e no volume (tal como uma redução no volume) no produto resultante.

[053] A escolha da protease é de extrema importância. A protease não deve exercer qualquer efeito adverso tal como enfraquecimento da massa durante a mistura dos ingredientes da mesma e, subsequente resistência da

massa. Efetivamente, neste caso, a dosagem permitida de proteases não adequadas seria demasiado baixa para possuir um efeito pronunciado na sensação na boca.

[054] A(s) protease(s) pode(m) ser adicionada(s) em uma composição que contenha outras enzimas como amilase e/ou xilanase e/ou lipase e/ou glucose oxidase e/ou lipoxigenase e/ou peroxidase e/ou oxidase de hidratos de carbono.

[055] A composição que melhora a massa e/ou pão é uma combinação de aditivos convencionalmente utilizados como: glúten e/ou oxidantes como vitamina C ou azodicarbonamida e/ou emulsionantes como mono ou diglicerídeos, ésteres diacetil tartarato de monoglicerídeos, estearoil-lactilato de sódio, ésteres de açúcar ou ácidos graxos, lecitina e/ou açúcar e/ou sal, gordura e/ou óleo.

[056] Estas misturas de ingredientes ativos, incluindo a protease, de acordo com a invenção, e/ou outras enzimas para além da protease, de acordo com a invenção, e/ou aditivos de panificação, podem ser diluídas por veículos apropriados normalmente utilizados em aplicações de panificação, como farinha de trigo, farinha de centeio, amido, água ou óleo, para se obter um nível de dosagem adequado para a mistura em massas para as propriedades de panificação.

[057] As misturas podem ser em pó, granuladas,

aglomeradas ou em forma líquida.

[058] Tipicamente, a protease é adicionada ao produto de panificação antes de se formar a massa. Preferencialmente, a protease é adicionada à farinha. Mais preferencialmente, a protease é adicionada a uma mistura que inclui condutores apropriados normalmente utilizados em aplicações de panificação e/ou ingredientes ativos e/ou aditivos de panificação convencionalmente utilizados.

Exemplos

Exemplo 1: Perspectiva de proteases termoestáveis ou proteases termoestáveis intermediárias e respectiva origem

[059] As proteases podem ser obtidas a partir de espécies produzidas (eucariontes ou procariontes) por meio da utilização de qualquer técnica adequada. Por exemplo, a preparação da protease pode ser obtida por fermentação de um microrganismo e isolamento subsequente da preparação que contém a protease a partir do caldo resultante por métodos conhecidos na técnica, tais como a centrifugação, a ultrafiltração ou cromatografia. As proteases podem ser igualmente obtidas pela clonagem da sequência ADN codificadora para uma protease adequada em um organismo hospedeiro, que expressa a protease intracelularmente ou extracelularmente e que colhe a enzima produzida.

[060] As proteases podem ser igualmente obtidas por evolução direcionada ou recombinação genética de proteases

termoestáveis ou não termoestáveis ou genes enzimáticos e expressão subsequente tal como acima mencionado. Enquanto estas mantiverem uma atividade de clivagem de ligação peptídica, são considerados como proteases no âmbito desta invenção. Encontram-se mencionados abaixo exemplos não limitativos de proteases para utilização nos exemplos seguintes e respectiva origem preferida.

Protease	Espécie	Origem	Temp.
Protease de <i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	Fermentação tal como acima descrito	80 °C
Termitase	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Fermentação tal como descrito em EP1496748	70 °C
Termolisina	<i>Bacillus termoproteoliticus</i>	Sigma-Aldrich	70 °C
Subtilisina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma-Aldrich	65 °C
Papaína ^(*)	Papaia	Sigma-Aldrich	70 °C

(*) não de acordo com a presente invenção.

Exemplo 2: Efeito de protease de *Thermus aquaticus*, Termitase, Termolisina, Papaína e Subtilisina no Tempo de Prova, Umidade do Pão e Volume Específico do Pão

[061] A adição de qualquer enzima à massa na dosagem especificada nos exemplos seguintes não altera o tempo de prova, umidade do pão e volume específico do pão. A

percentagem de umidade varia ligeiramente, mas todos os pães-de-leite perdem aproximadamente a mesma quantidade de umidade durante seis dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Exemplo 3: Isolamento da protease de *Thermus aquaticus*

[062] Uma das proteases preferidas utilizada é obtida por meio de cultura da estirpe *Thermus aquaticus* LMG 8924 no meio seguinte (em água destilada): 1 g/l triptona, 1 g/l de extrato de levedura e 100 ml/l solução de sal. O pH é ajustado para 8,2 com NaOH 1 M antes da esterilização a 121°C durante 15 minutos. A solução de sal tem a seguinte composição (em água destilada): 1 g/l ácido nitriloacético; 0,6 g/l CaSO₄. 2H₂O; 1 g/l MgSO₄. 7H₂O; 80 mg/l NaCl, 1,03 g/l KNO₃; 6,89 g/l NaNO₃; 2,8 g/l Na₂HPO₄.12H₂O; solução 10 ml/l FeCl₃.6H₂O (47 mg/100 ml dH₂O); solução de 10 ml/l de elementos vestigiais. A solução de elementos vestigiais tem a seguinte composição (em água destilada): 0,5 ml/l H₂SO₄; 1,7 g/l MnSO₄. H₂O; 0,5 g/l ZnSO₄. 7H₂O; 0,5 g/l H₃BO₃; 25 mg/l CuSO₄. 5H₂O; 25 mg/l Na₂MoO₄.2H₂O; 46 mg/l CoCl₂. 6H₂O. A incubação é realizada a 60 °C com arejamento (pO₂ 60 %, 4 vvm), durante 24 horas após as quais o meio é recolhido para uma outra concentração.

[063] *Thermus aquaticus* LMG 8924 produziu, pelo menos, duas proteases extracelulares. Uma das proteases extracelulares é a aqualisina I e é uma protease alcalina,

a qual é segregada linearmente a partir da primeira fase estacionária, até que as células parem de crescer. A temperatura ótima da atividade proteolítica encontra-se entre 70 e 80 °C. Outra protease extracelular é a aqualisina II e é uma protease neutra, cuja produção aparece a partir do dia 4 e a sua concentração cresce linearmente durante 5 dias. Nesta fase, a atividade máxima é obtida a 95°C (a temperatura mais alta testada).

[064] Para preparar amostras de aqualisina I (de acordo com a presente invenção e na mesma designada como "protease de *Thermus aquaticus*") para testes de panificação, o extrato da fermentação é testado após 1 dia de fermentação, isto é, quando é produzida nenhuma ou pouca aqualisina II. O sobrenadante da fermentação é depois concentrado por meio de ultrafiltração da membrana (*cut off* molecular 10000 Da). Protease de *Thermus aquaticus* é essencialmente *Aqualisina I* e pode incluir quantidades baixas de *Aqualisina II*. A solução em bruto de protease de *Thermus aquaticus* é armazenada em forma congelada até ser utilizada em testes de panificação.

[065] A solução de protease de *Thermus aquaticus* apresenta uma atividade máxima à temperatura de 80°C. Não se verifica quase qualquer perda de atividade enzimática ao se aquecer a solução durante uma hora a 80°C. Aquecer a enzima a 90°C durante 10 minutos reduz a atividade em 60 %.

[066] A atividade da protease é medida em caseína

azurine-reticulada (AZCL-caseína). Esta é preparada por meio de tingimento e cruzamento de caseína para produzir um material o qual hidrata na água, mas é insolúvel em água. Hidrólise por proteases produz fragmentos solúveis tingidos em água e a taxa de liberação destes (aumento da absorbância a 590 nm) pode estar diretamente relacionada com a atividade da enzima (AK Protazyme Tablets, Megazyme, Irlanda). Um comprimido AK protazyme é incubado em 100 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 7,0 pH a 60°C durante 5 minutos. É adicionada uma alíquota de enzima (1,0 ml) permitindo que a reação continue durante exatamente 10 minutos. A reação é concluída com a adição de fosfato de trissódico (10 ml, 2% p/v, pH 12,3). O tubo é deixado em repouso durante aproximadamente 2 minutos à temperatura ambiente e seu conteúdo é filtrado A absorbância do filtrado é medida a 590 nm sobre um substrato branco.

[067] A atividade é expressa em:

$$\text{mU/ml} = (34,2 * (\text{Abs}_{590} \text{ enzima} - \text{Abs}_{590} \text{ branco}) + 0,6) / \text{diluição}$$

[068] A atividade enzimática pode igualmente ser medida por meio de outros ensaios para a atividade da protease conhecidos pelos especialistas na técnica. Entre estes, encontra-se o método colorimétrico que utiliza a caseína como substrato seguido pela detecção dos aminoácidos libertos com o reagente Folin & Ciocalteu's Phenol.

Exemplo 4: Testes em pães-de-leite macios

[069] O teste de panificação modelo para os pães-de-leite macios é realizado da forma abaixo descrita. A receita básica é (em gramas):

Farinha de Trigo (Duo)	2000
Água	940
Fermento fresco (Bruggeman, Bélgica)	160
Cloreto de sódio	34
Óleo de palma parcialmente hidrogenado	65
Açúcar (sacarose)	160
Ácido ascórbico	0,08

[070] Os ingredientes são misturados durante 2 minutos a uma velocidade baixa e 7 minutos a uma velocidade alta em um tipo de misturador espiral Diosna (SP24). A temperatura final da massa é 27°C. 1200 g de massa são arredondados e testados durante 20 minutos à temperatura de panificação (25°C) e umidade (50-55 %). São moldadas 40 g de peças da massa utilizando o modelador Rotamat. Estas peças de massa são testadas a 35°C durante 60 minutos a 95% de umidade relativa numa caixa de teste Koma. Os pães-de-leite são depois cozidos a 215°C durante 9 minutos num forno WP sem vapor. Para os especialistas na técnica é óbvio que se podem obter os mesmos resultados finais utilizando um equipamento de outros fornecedores.

[071] Um painel de pessoas qualificadas registra os produtos, de acordo com uma referência numa escala linear de

0 a 5 pontos, sendo 0 o limite inferior (resistente) e 5 o limite superior (curto). As avaliações dos membros do painel que são significativamente diferentes das de outros membros do painel são removidas.

[072] Mais ainda, analisador de textura TA-XT2™ equipado com um aparelho de tensão para *pizza* utilizado a uma velocidade de 20 mm/seg permite avaliar os parâmetros seguintes. A força (força máxima necessária para partir o pão de leite expresso em gramas (g)) e o trabalho total (trabalho total necessário para partir o pão de leite expresso em (g. seg) e representado pela superfície abaixo da curva no gráfico gerado pelo dispositivo, ver Figura 1). Considerando que fatores, tais como lote de farinha, temperatura ambiente e umidade, tempo entre cozedura e teste podem afetar os parâmetros referidos, as medidas são comparadas a uma referência utilizando os mesmos ingredientes e cozidas e testadas em paralelo. Foram obtidas comparações semelhantes a estas de referência, utilizando diversos lotes de farinha, a temperaturas e umidade diferentes e, obtidos entre um a vários dias após a cozedura, pelo que se pode concluir que as características mencionadas não limitam a invenção.

[073] Para serem eficazes em termos de sensação na boca e principalmente em termos de mordida curta, os aditivos devem, pelo menos, diminuir a força máxima com 10% e o

trabalho total, com 10%. Esta diferença é repetidamente entendida por meio de um teste sensorial.

Exemplo 5: Validação de medidas de mordida curta de acordo com o teste sensorial e relação com parâmetros de textura:

Efeitos dos monoglicerídeos na mordida curta em pães-de-leite macios (de acordo com o estado da técnica)

[074] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com o método acima mencionado com a adição de monoglicerídeos insaturados (Multex Mono 9202 mpw produzido por Beldem; Bélgica). A força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com o analisador de textura e a mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 1.

	Força máx. G	Trabalho total g. seg	Mordida curta
Referência	565	921	0
500 g* monoglicerídeos	491	726	4

*por 100 kg de farinha.

[075] Por comparação à Referência, a adição de monoglicerídeos melhora a mordida curta tal como previsto pelo painel de formação e reduz a força e trabalho total em mais de 10%.

[076] Existe uma relação (inversa) entre a força

máxima e o trabalho total com a percepção sensorial de mordida curta.

Exemplo 6: Efeito de dose de protease de *Thermus aquaticus* na mordida curta em pães-de-leite macios e relação com parâmetros de textura

[077] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com o método acima descrito com adição de concentrações diferentes de protease de *Thermus aquaticus* (0 U = Referência).

[078] O efeito de proteases adicionadas aos produtos de panificação na mordida curta pode ser medido por um painel de avaliação sensorial preferencialmente formado, utilizando pães-de-leite cozidos de acordo com o Exemplo 5 e um analisador de textura.

[079] Mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 2.

	Força máx. g	Trabalho total g.sec.	Mordida curta
Referência (0 U) *	514	924	0
protease de <i>Thermus aquaticus</i> 230 U*	462	831	2
protease de <i>Thermus</i>	445	773	4

<i>aquaticus</i> 690 U*			
protease de <i>Thermus</i>	462	790	4
<i>aquaticus</i> 1150 U*			

*Expressa como unidades adicionadas a 100 kg farinha.

[080] Foi agora surpreendentemente descoberto que, por comparação à Referência pão-de-leite em todas as doses testadas, a adição de protease de *Thermus aquaticus* resulta numa mordida curta otimizada, praticamente como os resultados obtidos com os monoglicerídeos utilizados de acordo com o estado da técnica, e numa redução da força e do trabalho total em, pelo menos, 10 %.

Exemplo 7: Efeito da protease de *Thermus aquaticus* e Termitase na mordida curta em pães-de-leite macios e relação com parâmetros de textura.

[081] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com o método acima descrito com adição de concentrações diferentes de termitase ou protease de *Thermus aquaticus*. Mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3.

	Força	Trabalho total	Mordida curta

	g	g. seg	
Referência (0 U*)	549	825	0
protease de <i>Thermus aquaticus</i> 800 U*	452	693	4
protease de <i>Thermus aquaticus</i> 1600 U*	421	696	4
Termitase 5000*	429	634	5
Termitase 7500*	405	623	5

*expressa como unidades adicionadas a 100 kg farinha.

[082] Por comparação à Referência pão-de-leite em todas as doses testadas, a protease de *Thermus aquaticus* e termitase resultam numa mordida curta otimizada e numa redução da força e do trabalho total em, pelo menos 10 %.

Exemplo 8: Efeito da protease de *Thermus aquaticus*, Termolisina e Subtilisina na mordida curta em pães-de-leite macios e relação com parâmetros de textura.

[083] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com o método acima descrito com adição de concentrações diferentes de protease de *Thermus aquaticus*, Termolisina e Subtilisina. Mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4.

	Máx. Força g	Trabalho total g.seg	Mordida curta
Referência (0 U*)	762	1102	0
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 345 U*	594	765	4
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 690 U*	525	713	4
Termolisina 0,35 U*	595	969	2
Termolisina 0,7 U*	592	920	2
Subtilisina 0,35 U*	558	898	2
Subtilisina 0,7 U*	553	973	2

*expressa como unidades adicionadas a 100 kg farinha.

[084] Por comparação à Referência pão-de-leite em todas as doses testadas, a protease de *Thermus aquaticus*, termolisina e subtilisina resultam numa mordida curta otimizada e numa redução da força e do trabalho total em, pelo menos, 10 %.

Exemplo comparativo 1: Efeito de protease de *Thermus aquaticus* e amilase maltogénica na mordida curta em pães-de-leite macios e relação com parâmetros de textura.

[085] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com o método acima descrito com adição de concentrações diferentes de protease de *Thermus aquaticus* e Novamyl® (Novozymes), uma alfa-amilase maltogénica bem conhecida pelo

seu efeito na maciez no pão. Mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5.

	Força máx. g	Trabalho total g. seg	Mordida curta
Referência (0 U*)	730	1058	0
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 230 U*	652	839	2
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 460 U*	538	711	4
Novamyl 2,5 g*	571	1051	0
Novamyl 5 g*	573	1067	0
Novamyl 8 g*	579	1100	0
Novamyl 10 g*	568	1052	0

*expressa como unidades adicionadas a 100 kg farinha.

[086] Por comparação à Referência pão-de-leite, apenas a adição de protease de *Thermus aquaticus* resulta numa mordida curta otimizada e numa redução da força e do trabalho total em, pelo menos, 10 %. Foi confirmada a ausência de efeito nos parâmetros de textura e mordida curta de outra amilase, Ban 800 (Novozymes) utilizando o mesmo método.

Exemplo comparativo 2: Efeito da protease de *Thermus aquaticus* e papaína na mordida curta em pães-de-leite macios e relação com parâmetros de textura.

[087] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com o método acima descrito com adição de concentrações diferentes de protease de *Thermus aquaticus* e papaína. Mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6.

	Máx. força g	Trabalho total g. seg	Mordida curta
Referência (0 U*)	549	825	0
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 350 U*	452	693	4
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 700 U*	421	696	4
Papaína 0,3 g*	514	870	0
Papaína 0,5 g*	502	919	0

*expressa como unidades adicionadas a 100 kg farinha.

[088] Por comparação à Referência pão-de-leite, apenas a protease de *Thermus aquaticus* resulta numa mordida curta otimizada e numa redução da força e do trabalho total em, pelo menos, 10 %.

Exemplo 9: Efeito de dose de protease de *Thermus aquaticus* na mordida curta em pães-de-leite passíveis de cozimento em microondas e relação com parâmetros de textura

[089] Os pães-de-leite para microondas foram cozidos de acordo com o método acima descrito com adição de protease de *Thermus aquaticus*. A mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 4 dias após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7.

	Máx. Força g	Trabalho total g.sec	Mordida curta
Referência (0 U*)	275	1246	0
Protease de <i>Thermus aquaticus</i> 780 U*	196	1054	4

*expressa como unidades necessárias para 100 kg farinha.

[090] A protease de *Thermus aquaticus* tem um efeito na mordida curta e reduz a força e o trabalho total em 28%, 7% e 15%, 4% respectivamente.

Exemplo 10: Efeito de protease de *Thermus aquaticus* na mordida curta em pães-de-leite macios, com diferentes tipos de farinha e relação com parâmetros de textura

[091] Os pães-de-leite foram cozidos de acordo com

o método acima descrito com diferentes tipos de farinha e com a adição de protease de *Thermus aquaticus*. Mordida curta foi avaliada por meio de um painel sensorial e a força e o trabalho total foram medidos 1 dia após cozedura com analisador de textura como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 8.

Tabela 8.

	Máx. Força G.	Trabalho total g.sec	Mordida curta
Farinha com alto teor em glúten (HGF)	638	1256	0
pHGF + protease de <i>Thermus aquaticus</i> 460 U*	465	953	4
Farinha com médio teor de glúten (MGF)	671	893	1
MGF + protease de <i>Thermus aquaticus</i> 460 U*	487	688	4
Farinha com baixo teor de glúten (LGF)	580	993	1
LGF + protease de <i>Thermus aquaticus</i> 4 60 U*	489	783	4

*expressa como unidades necessárias para 100 kg farinha.

[092] Por comparação à Referência pão-de-leite em todos os tipos de farinha testados, a adição de protease de

Thermus aquaticus melhora a mordida curta e reduz a força e trabalho total em mais de 10 %.

Exemplo 11: Efeito da protease de *Thermus aquaticus* na mordida curta em produtos crocantes

[093] Os testes de panificação modelo para baguetes (modelo para produtos crocantes) são realizados como segue.

A receita básica é (em gramas):

Farinha (Surbi)	2000
Água	1400
Fermento fresco (Bruggeman, Bélgica)	150
Cloreto de sódio	50
Controlador S-500	75

[094] Os ingredientes são misturados durante 2 minutos a uma velocidade baixa e 10 minutos a uma velocidade alta em um tipo de misturador espiral Diosna (SP24). A temperatura final da massa é 26°C. Após uma fermentação do bolo durante 45 minutos a 25°C são moldados 250 g de peças da massa utilizando um modelador do tipo Alliance (para 50 g de peças da massa). As peças da massa são testadas a 30°C e 95% de umidade relativa durante 150 minutos. Posteriormente os pães são cozidos num forno rotativo durante 25 minutos a 230/200 °C com 7 segundos a vapor com a carga do forno e manípulo do vapor aberto após 10 minutos. Para os especialistas na técnica é óbvio que se podem obter os mesmos resultados finais utilizando um equipamento de outros

fornecedores.

[095] Os efeitos das proteases em produtos crocantes são avaliados por um teste sensorial e utilizando um analisador de textura TA-XT2™, tal como acima descrito para os pães-de-leite.

[096] As baguetes foram cozidas de acordo com o método acima descrito para produtos crocantes com adição de concentrações diferentes de protease de *Thermus aquaticus*.

[097] As baguetes foram analisadas por meio de um teste sensorial e a força e o trabalho total foi medido 2 horas após cozedura com analisador de textura tal como descrito no exemplo 4. Os resultados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10.

	Máx. Força G.	Trabalho total g. seg	Mordida curta
Referência	4885	3297	0
1300 U* protease de <i>Thermus aquaticus</i>	4243	2271	4
2600 U* protease de <i>Thermus aquaticus</i>	4292	2136	4
3900 U* protease de <i>Thermus aquaticus</i>	3942	2167	4

*expressa como unidades adicionadas a 100 kg farinha.

[098] Por comparação à Referência, a adição de

protease de *Thermus aquaticus* melhora a mordida curta e reduz a força e o trabalho total em mais de 10 %.

[099] A invenção não se limita aos exemplos acima e, à luz da descrição, o especialista na técnica será capaz de utilizar outras proteases para além das referidas nos exemplos do texto presente e de aplicar as mesmas de modo a obter as características do método da invenção.

[100] Os produtos de panificação foram analisados pelos seus parâmetros de textura como acima descrito, utilizando preferencialmente um analisador de textura TA-XT2TM, sendo que o especialista na técnica pode facilmente encontrar e/ou adaptar outros dispositivos adequados para a invenção sem se afastar do âmbito da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modificar a mordida curta de produtos de panificação **caracterizado** pelo fato de usar pelo menos uma serina protease termoestável intermediária ou serina protease termoestável no referido produto de panificação; em que a serina protease é uma serina protease alcalina termoestável de *Thermus aquaticus*, em que a referida serina protease de *Thermus aquaticus* tem uma temperatura de atividade ideal entre 70 e 80 °C, em que os produtos de panificação são produtos crocantes, tais como baguetes e brioches; em que a serina protease de *Thermus aquaticus* é adicionada à farinha em 1300 a 10400 unidades de serina protease de *Thermus aquaticus* /100 kg de farinha; e em que a relação entre a atividade da serina protease à temperatura ótima e a atividade da serina protease a 25°C é maior que 10.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato em que a relação entre a atividade da serina protease à temperatura ótima e a atividade da serina protease a 25°C é maior que 15.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de a serina protease ser isolada de *Thermus aquaticus* LMG8924, sendo preferencialmente essencialmente *Aqualisina I*.

4. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de a referida serina protease ser adicionada ao referido produto de panificação antes de formar a massa; preferencialmente a referida serina protease é adicionada à farinha; mais preferencialmente, a referida serina protease é adicionada a uma mistura que compreende carreadores apropriados normalmente utilizados em aplicações de panificação, ingredientes ativos, ou aditivos de panificação convencionalmente utilizados.

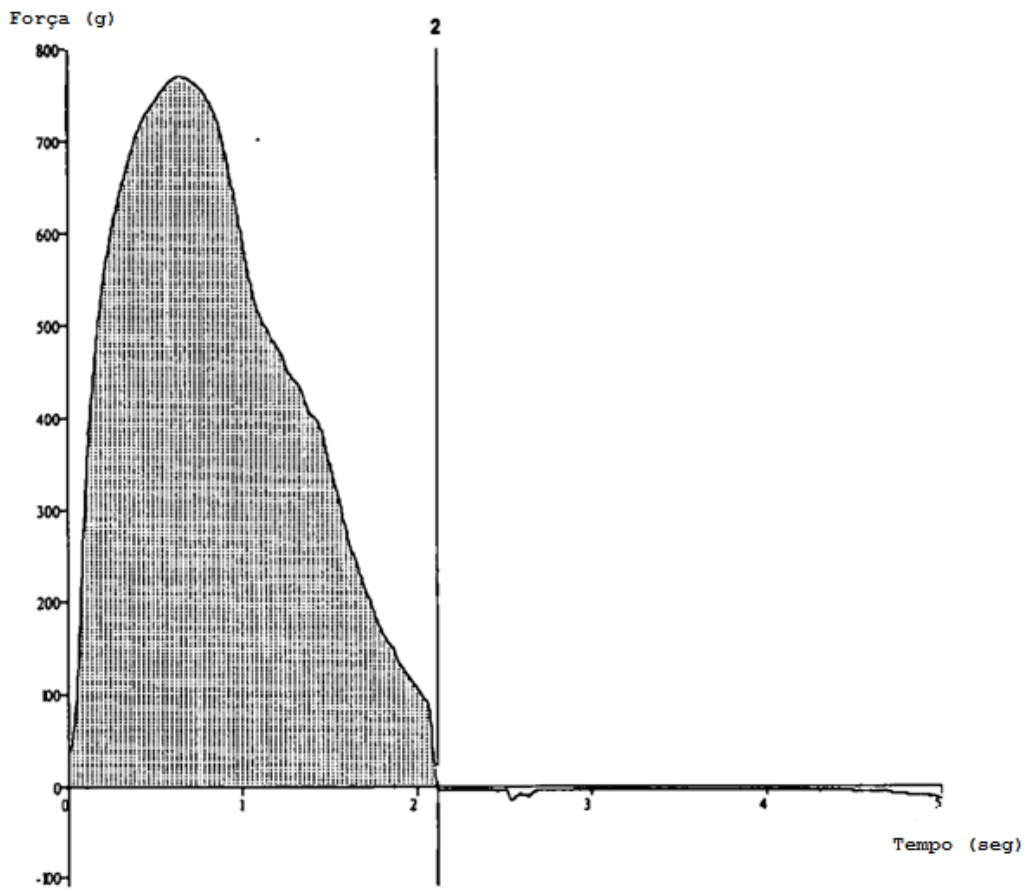
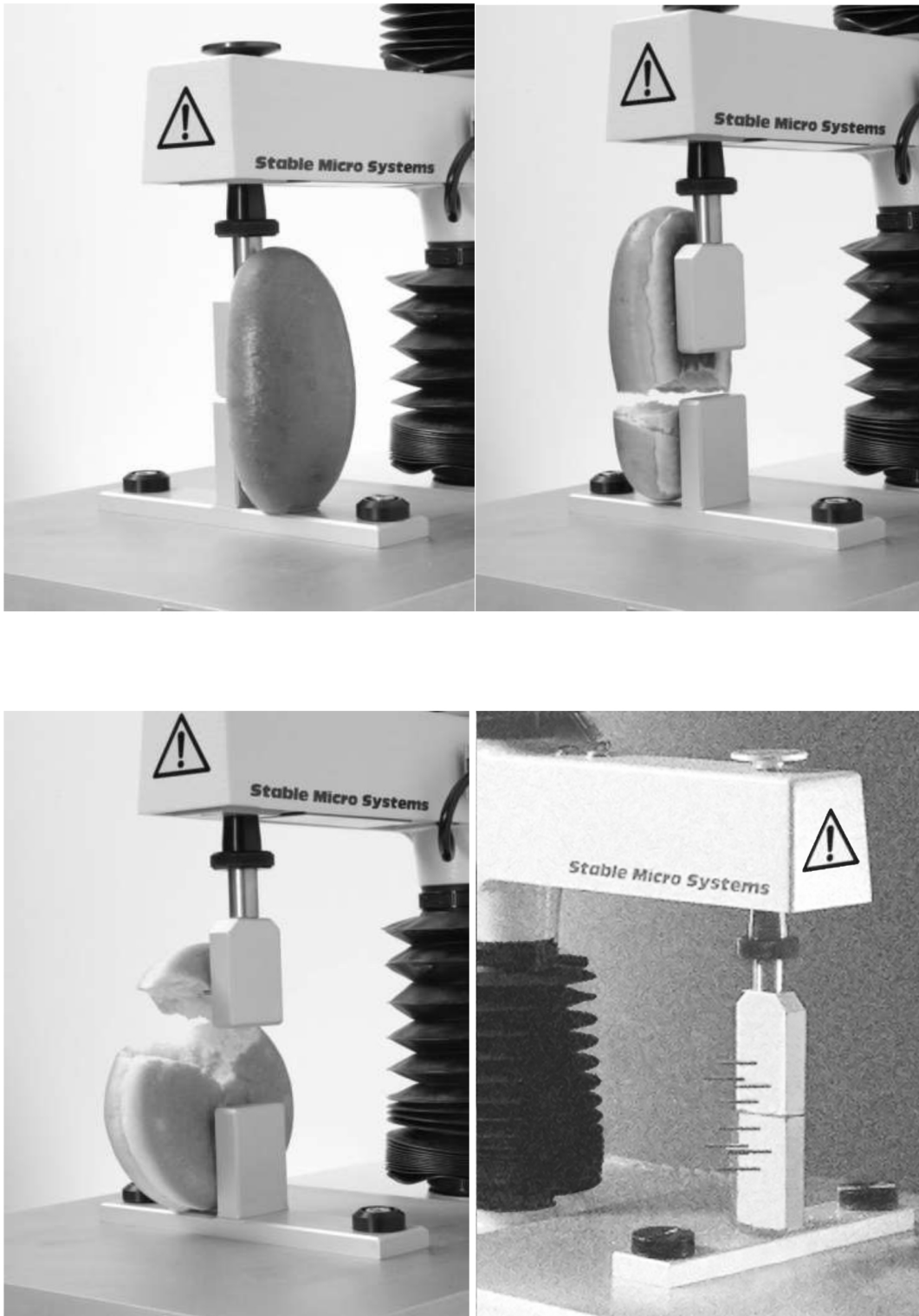


FIG. 1a

Fig. 1b



Protease de *Thermos aquaticus*

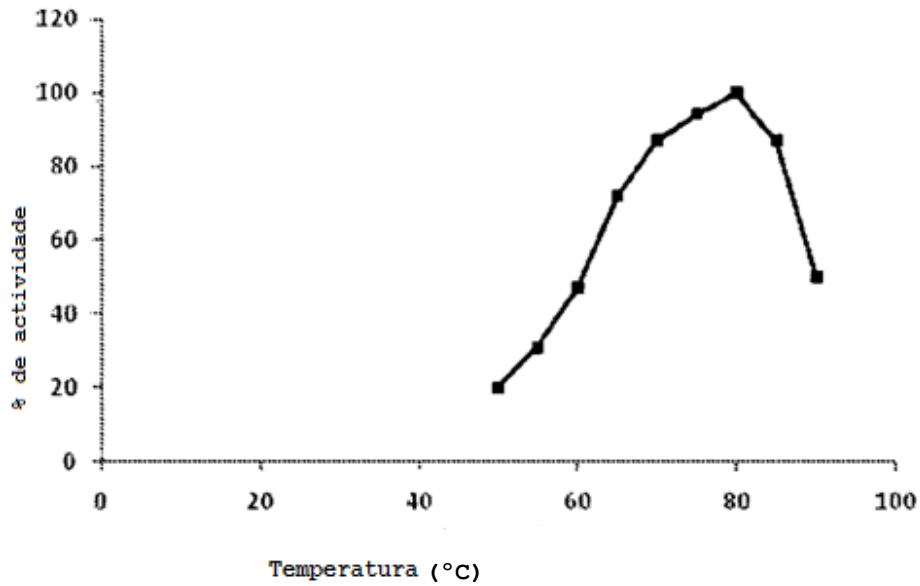


FIG. 2a

Subtilisina

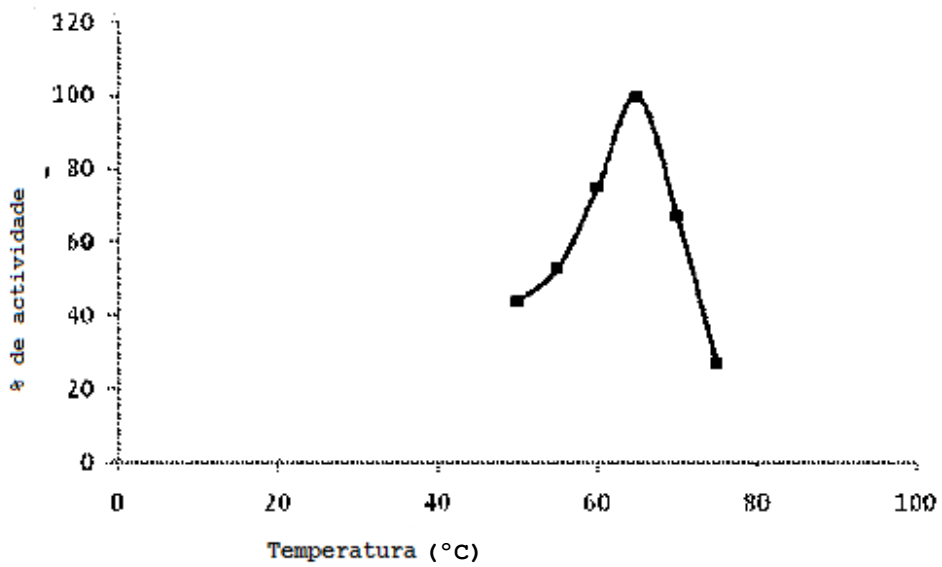


FIG. 2b

Termitase

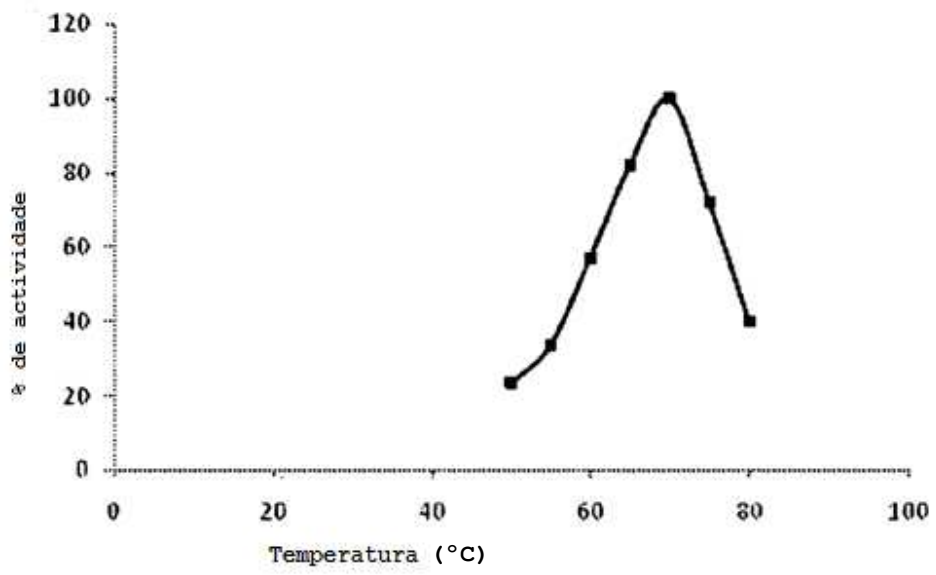


FIG. 2c