



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

**CARTA PATENTE N° PI 0914871-0**

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 0914871-0

**(22) Data do Depósito:** 15/06/2009

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 23/12/2009

**(51) Classificação Internacional:** A23L 27/40; A23J 3/34; A23L 27/24; A23L 27/00.

**(52) Classificação CPC:** A23L 27/45; A23J 3/346; A23L 27/24; A23L 27/88; A23L 27/00; C12Y 304/11; C12Y 302/01058; C12Y 304/00; C12Y 305/01002; A23V 2002/00.

**(30) Prioridade Unionista:** US 61/074,167 de 20/06/2008.

**(54) Título:** INGREDIENTE DE AUMENTO DE SAL, SEU PROCESSO DE FORMAÇÃO A PARTIR DO HIDROLISADO DE MATERIAL DE PLANTA DE ESPINAFRE, PRODUTO ALIMENTÍCIO, COMPOSIÇÃO FLAVORIZANTE PARA PRODUTOS ALIMENTÍCIOS E MÉTODO DE PROVISÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO COM SALINIDADE AUMENTADA

**(73) Titular:** GIVAUDAN SA, Sociedade Suíça. Endereço: Chemin de La Parfumerie 5, CH-1214 Vernier-Geneve, SUIÇA(CH)

**(72) Inventor:** TARUN BHOWMIK; STEFKA IVANOVA MYAKA; JOHAN PETER VAN LEERSUM; ROY WADE SMITH.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 15/06/2009, observadas as condições legais

**Expedida em:** 11/12/2018

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
"INGREDIENTE DE AUMENTO DE SAL, SEU PROCESSO DE  
FORMAÇÃO A PARTIR DO HIDROLISADO DE MATERIAL DE  
PLANTA DE ESPINAFRE, PRODUTO ALIMENTÍCIO, COMPOSIÇÃO  
FLAVORIZANTE PARA PRODUTOS ALIMENTÍCIOS E MÉTODO DE  
PROVISÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO COM SALINIDADE  
AUMENTADA".

#### CAMPO DA TÉCNICA

[001] A presente invenção refere-se a um ingrediente e a um processo enzimático para formar o dito ingrediente para aumentar a salinidade em produtos alimentícios, em particular em produtos alimentícios com um teor de sódio baixo ou reduzido, para aprimorar seu gosto.

#### ANTECEDENTES

[002] Uma grande quantidade de ingestão de sódio é considerada ser prejudicial para a saúde e então há um desejo em reduzir a quantidade de cloreto de sódio (NaCl) em produtos alimentícios, sem redução do gosto salgado desejado ao mesmo tempo. O gosto salgado é muito importante para a intensidade e o perfil de sabor percebido, especialmente para produtos alimentícios condimentados.

[003] Há uma necessidade na indústria alimentícia de prover ingredientes que aumentem o gosto salgado de produtos alimentícios de maneira que sódio/NaCl possa ser reduzido.

[004] Cloreto de potássio (KCl) é usado para substituir outros sais, particularmente NaCl. Se KCl for usado na concentração desejada para reduzir NaCl, um gosto amargo e metálico indesejável é percebido pelo consumidor. Ainda, certos indivíduos desejam evitar KCl por questões de saúde. Seria então interessante encontrar um produto que fosse capaz de aumentar o gosto salgado de NaCl de maneira que KCl possa ser parcialmente ou completamente substituído.

[005] Espinafre ou seus hidrolisatos não eram conhecidos quanto a um efeito de aumento de sal.

## SUMÁRIO

[006] Vários aspectos da invenção compreendem o que segue:

(1) um processo de formação de um ingrediente de aumento de sal compreendendo as etapas de

(i) formação de uma pasta fluida aquosa de material de planta de espinafre, e

(ii) formação de um hidrolisato de material de planta de espinafre submetendo-o a uma hidrólise enzimática usando uma ou mais enzimas proteolíticas.

(2) o processo descrito sob o item (1), em que o ingrediente de aumento de sal formado é inativado por aquecimento.

(3) o processo conforme descrito sob qualquer um dos itens (1) a (2) em que a uma ou mais enzimas proteolíticas são selecionadas do grupo consistindo em proteinase, peptidase e glutaminase.

(4) o processo conforme descrito sob qualquer um dos itens (1) a (3), em que uma ou mais enzimas proteolíticas compreendem ambas as enzimas proteinase e peptidase.

(5) processo conforme descrito sob qualquer um dos itens (1) a (4) em que uma ou mais enzimas proteolíticas compreendem uma preparação de enzima de *Aspergillus oryzae* (Umamizyme®) e a hidrólise é realizada a 40°C a 60°C.

(6) processo conforme descrito sob qualquer um dos itens (1) a (5), em que o hidrolisato é formado submetendo o material de planta de espinafre a uma hidrólise enzimática usando uma ou mais enzimas carboidrase em paralelo ou subsequente à hidrólise enzimática por uma ou mais enzimas proteolíticas.

(7) processo conforme descrito sob qualquer um dos itens (1) a (6) em que o hidrolisato é submetido à fermentação usando um

*Lactobacillus.*

(8) processo conforme descrito sob o item (7) em que o micro-organismo *Lactobacillus* é selecionado do grupo consistindo em *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis* e *L. helveticus*.

(9) ingrediente de aumento de sal formado através do processo conforme descrito sob qualquer um dos itens (1) a (8).

(10) o ingrediente de aumento de sal conforme descrito sob o item (9) que é concentrado pelo menos 1,5 vez através da remoção de água.

(11) o ingrediente de aumento de sal conforme descrito sob qualquer um dos itens (9) a (10) onde o ingrediente de aumento de sal é seco por pulverização.

(12) uma composição de sabor para produtos alimentícios compreendendo o ingrediente de aumento de sal conforme descrito sob qualquer um dos itens (9) a (11) e um ou mais de um excipiente de grau alimentício.

(13) a composição de sabor conforme descrito sob o item (12) em que a concentração do ingrediente de aumento de sal da reivindicação 9 é 0,25 a 400 ppm com base no uso do ingrediente de aumento de sal não-concentrado. Concentrações úteis para o ingrediente de aumento de sal (não-concentrado) em composições de sabor ou produtos alimentícios incluem 0,25 a 300 ppm, 0,25 a 200 ppm, 0,5 a 100 ppm e 0,5 a 20 ppm.

(14) um produto alimentício compreendendo o ingrediente de aumento de sal conforme descrito sob qualquer um dos itens (9) a (11).

(15) o produto alimentício conforme descrito sob o item (14) em que a concentração do ingrediente de aumento de sal conforme descrito sob qualquer um dos itens (9) a (11) é 0,25 a 400 ppm com base no uso do ingrediente de aumento de sal não concentrado.

(16) o produto alimentício conforme descrito sob qualquer um dos itens (14) a (15), o qual é um produto alimentício com teor de sódio reduzido ou baixo.

(17) o produto alimentício conforme descrito sob o item (16) em que a concentração de cloreto de sódio é 0,15% (p/p) a 3% (p/p).

(18) o produto alimentício conforme descrito sob o item (16) em que a concentração de cloreto de sódio é 0,15% (p/p) a 1,5% (p/p).

(19) produto alimentício com teor de sódio reduzido ou baixo conforme descrito sob qualquer um dos itens (16) a (18) compreendendo ainda KCl, opcionalmente em uma concentração de 0,1% a 2% (p/p) de KCl.

(20) um método de provisão de um produto alimentício com aumento de salinidade em que o ingrediente de aumento de sal conforme definido sob qualquer um dos itens (9) a (11) é misturado com um produto alimentício.

(21) o método conforme descrito sob o item (16) em que o produto alimentício é um produto alimentício com teor de sódio reduzido ou baixo opcionalmente contendo KCl, opcionalmente em uma concentração de 0,1% a 2% (p/p) de KCl.

#### DESCRÍÇÃO DETALHADA

[007] Surpreendentemente, foi constatado que quando espinafre é tratado enzimaticamente com uma ou mais enzimas proteolíticas incluindo, sem limitação, as classes de enzima de protease, peptidase e glutaminase, um ingrediente pode ser formado, o qual tem um efeito de aumento sobre a percepção do gosto salgado em produtos alimentícios e exibe um gosto salgado de intensidade maior.

[008] Por aumento de sal quer dizer o efeito de um ingrediente sobre o gosto salgado em alimento que é verificado mais acentuado (mais forte, aumentado) em sua intensidade de gosto e/ou mais tempo em sua duração conforme analisado por integrantes de painel treinado.

dos sensíveis ao gosto salgado, quando comparando alimento compreendendo um ingrediente com um efeito de aumento de sal com alimento sem um ingrediente de aumento de sal adicionado.

[009] A intensidade aumentada da percepção de gosto salgado pelo ingrediente de aumento de sal pode ser aumentada adicionalmente usando uma enzima carboidrase, ou em paralelo ou consecutivamente, em sua formação.

[0010] Para evitar gostos desagradáveis que podem ficar notáveis em alguns produtos alimentícios quando usando concentrações maiores do ingrediente de aumento de sal (uma concentração maior pode ser, por exemplo, cerca de 50 ppm ou mais, cerca de 100 ppm ou mais, cerca de 200 ppm ou mais ou cerca de 300 ppm ou mais), é vantajoso incluir glutaminase no tratamento enzimático.

[0011] A intensidade aumentada da percepção de gosto salgado pode ser aumentada mais através de uma etapa de fermentação opcional empregando bactérias *Lactobacillus*, por exemplo, *Lactobacillus plantarum*.

### Espinafre

[0012] “Espinafre” conforme aqui usado refere-se às folhas e/ou caules verdes de uma planta de flor na família de *Amaranthaceae* (antes conhecida como *Chenopodiaceae*), incluindo *Spinacia oleracea*, e a espécie próxima *Beta vulgaris* (também conhecida como folhas de beterraba, beterraba de espinafre, *silverbeet* ou espinafre perpétuo); *Atriplex spec.*, incluindo *A. hortensis* (também conhecida como *orache*, espinafre Francês ou espinafre da montanha); e *Chenopodium spec.*, incluindo *C. bonus-henricus* e *C. album* (também conhecido como espinafre selvagem, espinafre Galinha gorda, *Good King Henry* ou *Lincolnshire*).

[0013] O espinafre inclui três a quatro tipos, Savoy, espinafre de folhas Lisas/Macias, Semi-savoy e Baby.

[0014] O Savoy tem folhas verde-escuro, enrugadas e crespas. O Bloomsdale e o Tyee as variedades do tipo Savoy populares. Espinafre de folha lisa/macia tem folhas macias grandes que são mais fáceis de limpar e é cultivado para alimentos enlatados, congelados ou processados. Semi-savoy é uma variedade híbrida com folhas ligeiramente enrugadas. Semi-savoy inclui Five Star, uma variedade amplamente cultivada. Baby é do tipo folha lisa e suas folhas geralmente não têm mais do que 7,62 cm (três polegadas). Exemplos de variedades de espinafre incluem, sem limitação, *America, Bloomsdale ou Bloomsdale Long Standing, Dominant, Giant Winter, Horenso, Medania, Sigmaleaf, Space, Trinidad, Tyee (tipo savoy), Olympia, Melody, Winter Bloomsdale, Bordeaux, Koto, Lazio, Vienna, Marathon, Seve R., Baker, Cascade, Olympia, Polka, Rainier, Shasta, Wolter, Bossanova, Bolero, Coho, Ambassador, Rainier, Rhythm 9, Hybrid #7, Skookum, Bejo 1369, Splendor, Indian Summer, Avon, Correnta, Nordic IV, Savoy Supreme, Space, Spokane, Springfield, Steadfast, Unipak 12, Mazurka, Chinook II, Hybrid 424, St. Helens, Baker, Imperial Express e Imperial Star.*

### **Enzimas**

[0015] Classes de enzima úteis exemplares incluem enzimas proteolíticas que hidrolisam ligações em uma proteína e, opcionalmente, uma carboidratase.

[0016] Preparações de enzima proteolítica geralmente contêm proteinases, que hidrolisam proteínas para formar peptídeos pequenos, e peptidases, que hidrolisam proteínas ou peptídeos pequenos, geralmente para liberar aminoácidos de suas extremidades terminais. Frequentemente, proteinases e peptidases com atividade de ambas a endopeptidase e exopeptidase estão incluídas em tais preparações, para quebrar eficientemente uma proteína de dentro e das extremidades de cada proteína e peptídeo resultante.

[0017] Enzimas proteolíticas úteis incluem, sem limitação, uma enzima com uma ou mais das atividades que seguem: protease, peptidase, glutaminase (incluindo, sem limitação, L-glutamino-amido-hidrolase (EC 3.5.1.2)), endoprotease, serina endopeptidase, subtilisina peptidase (EC 3.4.21.62).

[0018] Outras enzimas proteolíticas são úteis também, e uma grande variedade é conhecida e está disponível; alguns tipos e exemplos adicionais são dados abaixo.

[0019] Enzimas proteolíticas (também chamadas proteases, proteinases ou peptidases) são atualmente classificadas em seis grupos incluindo serina protease, treonina protease, cisteína protease, protease do ácido aspártico, metaloprotease e protease do ácido glutâmico. Enzimas proteolíticas podem cortar na extremidade de uma proteína (exopeptidase) ou atacar ligações de peptídeo internas de uma proteína (endopeptidase). Exopeptidases incluem, sem limitação, aminopeptidases, carboxipeptidases e carboxipeptidase A. Endopeptidases incluem, sem limitação, tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína e elastase.

[0020] Enzimas proteolíticas (EC 3.4 e EC 3.5) são classificadas por um número EC (número de comissão de enzima), cada classe compreendendo várias enzimas conhecidas de um certo tipo de reação.

[0021] EC 3.4 comprehende enzimas que agem em ligações de peptídeo (peptidases/proteinases) e EC 3.5 comprehende enzimas que agem sobre ligações de carbono-nitrogênio outras que não ligações de peptídeo.

[0022] Exemplos para EC 3.4 incluem, sem limitação, o que segue: aminopeptidase (EC 3.4.11), dipeptidase (3.4.13), dipeptidil-peptidase (3.4.14), peptidil-dipeptidase (3.4.15), serina-carboxipeptidase (3.4.16), metalocarboxipeptidase (3.4.17), cisteína-

carboxipeptidase (3.4.18), omegapeptidase (3.4.19), serina-endopeptidase (3.4.21), cisteína-endopeptidase (3.4.22), aspartato-endopeptidase (3.4.23), metaloendopeptidase (3.4.24), treonina-endopeptidase (3.4.25).

[0023] Exemplos para EC 35 incluem, sem limitação, enzimas proteolíticas que clivam em amidas lineares (3.5.1), por exemplo, sem limitação, glutaminase (EC 3.5.1.2).

[0024] Várias enzimas proteolíticas estão comercialmente disponíveis: as enzimas proteolíticas que seguem estão disponíveis da Sigma-Aldrich: Acromopeptidase, Aminopeptidase, Ancrod, Enzima de Conversão de Angiotensina, Bromelaína, Calpaína, Calpaína I , Calpaína II, Carboxipeptidase A, Carboxipeptidase B, Carboxipeptidase G, Carboxipeptidase P, Carboxipeptidase W, Carboxipeptidase Y, Caspase, Caspase 1, Caspase 2, Caspase 3, Caspase 4, Caspase 5, Caspase 6, Caspase 7,Caspase 8, Caspase 9, Caspase 10, Caspase 13, Catepsina B, Catepsina C, Catepsina D, Catepsina G, Catepsina H, Catepsina L, Quimiopapaína, Quimase, Quimiotripsina, a-Clostripaína, Colagenase, C1r Complemento , C1s Complemento , Fator D Complemento , Fator I Complemento, Cucumisina, Dipeptidil Peptidase IV, Elastase, leucócito, Elastase, pancreática, Endoproteinase Arg-C, Endoproteinase Asp-N, Endoproteinase Glu-C, Endoproteinase Lys-C, Enterocinase, Factor Xa, Ficina, Furina, Granzime A, Granzime B, HIV Protease, IGase, Tecido de calicreína, Leucina Aminopeptidase (General), Leucina aminopeptidase, citosol, Leucina aminopeptidase, microssomal, Metaloproteinase de matriz, Metionine Aminopeptidase, Neutrase, Papaína, Pepsina, Plasmina, Prolidase, Pronase E, Antígeno Específico da Próstata, Protease, Alcalofílica de Streptomyces griseus, Protease de Aspergillus, Protease de Aspergillus saitoi, Protease de Aspergillus sojae, Protease (B. licheniformis) (Alkaline), Protease (B. licheniformis) (Alcalase), Protease de Bacillus

polymyxina, Protease de *Bacillus* sp, Protease de *Bacillus* sp (Esperase), Protease de *Rhizopus* sp., Protease S, Proteassomas, Proteinase de *Aspergillus oryzae*, Proteinase 3, Proteinase A, Proteinase K, Proteinase C, Piroglutamato aminopeptidase, Renina, Renina, Estreptocinase, Subtilisina, Termolisina, Trombina, Ativador de Plasminogênio de Tecido, Tripsina, Triptase, Urocinase.

[0025] Uma ou mais das enzimas proteolíticas descritas aqui podem ser combinadas com um carboidrato para aumentar o impacto de sal do ingrediente de aumento de sal formado.

[0026] Combinações de enzima úteis incluem, sem limitação, combinações em que pelo menos uma enzima proteolítica é combinada com pelo menos uma carboidrase.

[0027] Enzimas carboidrase úteis para quebrar material de planta de carboidrato incluem, sem limitação, carboidrases com uma ou mais das atividades que seguem:

[0028] beta-glicanase (incluindo, sem limitação, 1,3-beta-glicano-hidrolase (EC 3.2.1.58)), beta-amilase, celulase, hemicelulase, xilanase.

[0029] Por exemplo, as combinações que seguem são exemplos não-limitantes de enzimas úteis:

| <b>Protease/Peptidase/Glutaminase</b> | <b>Carboidrase</b> |
|---------------------------------------|--------------------|
| Protease                              | beta-glicanase     |
| Protease                              | beta-amilase       |
| Protease                              | celulase           |
| Protease                              | hemicelulase       |
| Protease                              | xilanase           |
| Endoprotease                          | beta-glicanase     |
| Endoprotease                          | beta-amilase       |
| Endoprotease                          | celulase           |
| Endoprotease                          | hemicelulase       |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Endoprotease                | xilanase  |
| Peptidase                   | beta-glicanase  |
| Peptidase                   | beta-amilase  |
| Peptidase                   | celulase  |
| Peptidase                   | hemicelulase  |
| Peptidase                   | xilanase  |
| serina endopeptidase        | beta-glicanase  |
| serina endopeptidase        | beta-amilase  |
| serina endopeptidase        | celulase  |
| serina endopeptidase        | hemicelulase  |
| serina endopeptidase        | xilanase  |
| L-glutamina-amido-hidrolase | beta-glicanase  |
| L-glutamina-amido-hidrolase | beta-amilase  |
| L-glutamina-amido-hidrolase | celulase  |
| L-glutamina-amido-hidrolase | hemicelulase  |
| L-glutamina-amido-hidrolase | xilanase  |
| subtilisina peptidase       | beta-glicanase  |
| subtilisina peptidase       | beta-amilase  |
| subtilisina peptidase       | celulase  |
| subtilisina peptidase       | hemicelulase  |
| subtilisina peptidase       | xilanase  |
| [0030]                      | Uma combinação útil é uma 1,3-beta-glican-glico-hidrolase (EC 3.2.1.58) com protease selecionada de serina endopeptidase, uma peptidase/protease ou uma subtilisina peptidase (EC 3.4.21.62). |
| [0031]                      | Como 1,3-beta-glican-glico-hidrolase, por exemplo, sem limitação, um ou mais de Ceremix® (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) ou Viscozyme® (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) pode ser usada.      |

[0032] Como protease/peptidase/glutaminase, por exemplo, sem limitação, uma ou mais de Alcalase®, uma serina endopeptidase (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), Umamizyme®, a protease/peptidase (Amano, Nagoya, Japão), ou Flavorpro 373®, uma subtilisina peptidase (Biocatalysts, Cardiff, UK), pode ser usada.

[0033] Todas as enzimas devem ser de grau alimentício.

### Hidrólise enzimática

[0034] Hidrólise enzimática é realizada sob condições adequadas para todas as enzimas empregadas. Conforme será compreendido pelo versado na técnica, a temperatura e o pH devem estar dentro de uma faixa para hidrólise acontecer para o grau desejado. A duração da incubação vai variar consequentemente, com incubações mais curtas quando condições estão mais próximas das condições ótimas. Geralmente 1 a 48 horas serão suficientes, por exemplo, 10 a 24 horas. Íons necessários, se desejado ou benéfico para a(s) enzima(s) escolhida(s), devem estar presentes, como o versado na técnica saberá. Agitação da mistura de incubação, por exemplo, 50 a 500 rpm, ou 100 a 200 rpm, geralmente aprimora a hidrólise. Algumas enzimas toleram agitação melhor do que outras. Tolerância a um fator frequentemente depende de outros fatores. Tal informação sobre condições adequadas está prontamente disponível para muitas enzimas e pode de outra maneira ser facilmente determinada.

[0035] Várias preparações de enzima, incluindo Ceramix®, Alcalase®, Viscozyme® e Umamizyme® vão funcionar bem em uma pasta fluida liquefeita de espinafre em água em uma temperatura de, a partir de, 40º C a 55ºC, por exemplo, cerca de 45º C a cerca de 55ºC, sem ajuste de pH ou quaisquer cofatores adicionados. Outros podem precisar ou vão se beneficiar do ajuste de pH e temperatura ou aditivos. Umamizyme® vai tolerar temperaturas de a partir de cerca de 40ºC a cerca de 60ºC, com uma ótima em torno de 55ºC. Umamizyme® se

origina de *Aspergylus oryzae* e é rica em atividade de endopeptidase e exopeptidase.

[0036] Unidades suficientes da enzima para obter uma hidrólise substancial até que o grau desejado de gosto salgado seja obtido devem ser usadas.

[0037] A quantidade de enzima é escolhida para assegurar atividade suficiente e evitar desenvolvimento de toques amargos. A quantidade usada depende da atividade da enzima, esta informação é geralmente conhecida ou ela pode ser testada facilmente. A quantidade de enzima também depende da quantidade de substrato (proteína ou carboidrato) e deve haver uma razão de 0,5:20 a 3:20 de enzima:substrato (0,5 a 3 partes de enzima para 20 partes de substrato), por exemplo, 1:20 de enzima:substrato (Ceremix®, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca, tem uma atividade de 300 Unidades Beta-Glicanase (BGU) por grama de enzima; Viscozyme®, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca, tem uma atividade de 100 Unidades de Beta-Glicanase Fúngica FBG por grama de enzima; Alcalase®, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca, tem uma atividade de 2,4 unidades Anson (AU) por grama de enzima; Umamizyme®, Amano, Nagoya, Japão, tem uma atividade de 70 U (método Unidades por LGG = LGG = L-Leucyl-Glycil-Glicina); Flavorpro 373®, uma Glutaminase, Biocatalysts, Cardiff, UK, tem uma atividade de 30 Unidades de Glutaminase (GU)).

[0038] Quantidades úteis de unidades de enzima por grama de material de partida são indicadas para algum tipo de enzimas abaixo.

[0039] Unidades Beta-Glicanase (BGU) por grama de material de partida (pasta fluida de espinafre liquefeita) 0,03 a 15 BGU, por exemplo, 0,1 a 3 BGU.

[0040] Unidades de Beta-Glicanase Fúngica FBG por grama de material de partida, 0,002 a 3 FBG, por exemplo, 0,01 a 1 FBG.

[0041] Unidades Anson (AU) por grama de material de partida

0,0002 a 0,02 AU, por exemplo, 0,0005 a 0,01.

[0042] U (método Unidades por LGG, LGG = L-Leucila-Glicila-Glicina) por grama de material de partida 0,007 a 0,7 U, por exemplo, 0,01 a 0,1 U, é usada.

[0043] Unidades de Glutaminase (GU) por grama de material de partida, 0,00075 a 0,075 GU, por exemplo, 0,01 a 0,02, GU são usadas.

[0044] A quantidade de enzima vai variar dependendo das enzimas e das condições que ela é usada. A quantidade necessária pode ser facilmente determinada experimentando quantidades diferentes e testando o efeito do produto resultante em uma avaliação sensorial conforme aqui descrito.

[0045] O hidrolisato da pasta fluida de espinafre hidrolisada por uma ou mais de enzimas proteolíticas e opcionalmente uma ou mais carboidrases pode ser usado diretamente como um ingrediente de aumento de sal. Geralmente ele será inativado por calor antes do uso por um tratamento com calor final (esterilização ou pasteurização) alto e longo o suficiente para inativar enzimas e opcionalmente micro-organismos, conforme detalhado abaixo.

[0046] Alternativamente, o hidrolisato é submetido à fermentação.

### Fermentação

[0047] Fermentação é realizada com uma bactéria *Lactobacillus*, por exemplo, *Lactobacillus plantarum*. Outra espécie *Lactobacillus* pode ser também útil, por exemplo, *L. casei*, *L. brevis* e *L. helveticus* podem ser também úteis.

[0048] Uma cultura da noite para o dia de *Lactobacillus* pode ser usada, ou o hidrolisato pode ser diretamente inoculado a partir de um clone de *Lactobacillus*, e a fermentação realizada por um tempo um pouco mais longo consequentemente.

[0049] A cultura de semente/cultura da noite para o dia para a fer-

mentação que segue pode ser preparada através de métodos bem-conhecidos na técnica. Ela pode ser cultivada da noite para o dia, por exemplo, 12 horas, na temperatura apropriada para o micro-organismo. 37° C é uma temperatura adequada para *L. plantarum*. Qualquer meio adequado por ser selecionado, por exemplo, caldo de MRS (Difco, Estados Unidos da América).

[0050] O material inoculado é fermentado por várias horas, por exemplo, 5 horas a 48 horas, 10 horas a 30 horas ou 15 horas a 25 horas.

[0051] A fermentação com *Lactobacillus* é iniciada usando o hidrolisato como caldo de fermentação e adicionando um volume suficiente de uma cultura de semente da noite para o dia em um pH de pelo menos 5 ou mais, por exemplo, um pH de 5 a 7. Fermentação é deixada prosseguir até que o pH tenha diminuído para pelo menos pH 5,5 ou menos, por exemplo, pH 5,5 a pH 4,5.

[0052] A temperatura de fermentação é escolhida para acomodar o micro-organismo. Faixas de temperatura úteis para *Lactobacilli* e em particular *L. plantarum* incluem, por exemplo, de a partir de cerca de 20°C a cerca de 40°C, de a partir de cerca de 30°C a cerca de 40°C ou de a partir de cerca de 35 a cerca de 40°C, com um ótimo de cerca de 36°C a cerca de 38°C. Em uma temperatura baixa a taxa de crescimento será baixa, em uma temperatura alta o micro-organismo será morto ou reduzido em números.

[0053] O recipiente de fermentação deve ser minimamente agitado para assegurar mistura apropriada, mas ao mesmo tempo assegurar que as bactérias possam crescer anaerobicamente (*Lactobacilli* são anaeróbios facultativos, mas geralmente crescem mais rápido sob condições anaeróbicas, aerotolerância pode ser dependente de manganes).

[0054] O produto fermentado pode ser usado diretamente como

um ingrediente de aumento de sal, mas geralmente será seguido por um tratamento com calor final (esterilização ou pasteurização) alto e longo o suficiente para inativar enzimas e micro-organismos.

[0055] Geralmente o produto hidrolisado ou fermentado será inativado por calor antes do uso, por exemplo, através de aquecimento de, a partir de, cerca de 60°C a cerca de 121°C ou mais por duração suficiente para inativar enzimas e bactérias (por exemplo, sem limitação, qualquer método de pasteurização ou esterilização, que sejam bem-conhecidos na técnica, por exemplo, sem limitação, cerca de 70°C, cerca de 90°C ou mais por 30 minutos. Quando aquecendo acima de cerca de 100°C, por exemplo, cerca de 121°C por 30 minutos, aquecimento pode ser realizado sob pressão, geralmente cerca de 82,74-103,42 kPa (12-15 psi).

[0056] O pH durante a fermentação deve ser pH de a partir de cerca de 5 a cerca de pH 7. Se o pH estiver abaixo de 5, *Lactobacillus plantarum* vai crescer muito lentamente e geralmente não suficientemente. Durante a fermentação, o pH será menor para cerca de pH 4 ou menor, por exemplo, cerca de pH 5 a cerca de pH 3,5.

[0057] Em seguida, o caldo de fermentação pasteurizado pode ser filtrado para remover quaisquer partículas grandes e pode ser concentrado, por exemplo, através de evaporação, incluindo fervura em, por exemplo, até cerca de 100°C.

### **Forma de uso**

[0058] O ingrediente de aumento de sal pode ser usado como é ou em forma filtrada e/ou concentrada. Alternativamente, o ingrediente de aumento de sal concentrado pode ser usado como uma pasta ou pó ou seco por pulverização através de métodos bem-conhecidos na técnica. Para o ingrediente de aumento de sal seco por pulverização, veículos e agente antquebra bem-conhecidos podem ser adicionados.

[0059] Filtragem opcional pode ser realizada através de qualquer

método de filtragem adequado, tais métodos são bem-conhecidos na técnica, por exemplo, através de passagem por uma bolsa de filtro de feltro em uma centrífuga de filtro. A cultura filtrada (sobrenadante contendo os sólidos menores restantes, menos a biomassa que inclui proteínas não digeridas maiores) pode ser concentrada, por exemplo, concentrada 2x através de evaporação/fervura a 100°C. O teor de sólido do concentrado resultante pode ser determinado usando um analisador de umidade e pode ser seco por pulverização, por exemplo, em um veículo adequado. Muitos veículos são conhecidos na técnica, por exemplo, sem limitação, um veículo de maltodextrinas de batata (por exemplo, uma razão de sólidos de cerca de 1:1 do concentrado 2x para veículo pode ser adequada). Opcionalmente um agente antitorta pode ser adicionado, tais agentes são bem-conhecidos. Um agente antitorta adequado é, por exemplo, fosfato de tricálcio (TPC); cerca de 0,5% (p/p) com base no peso total do concentrado 2x seria uma quantidade adequada.

[0060] A forma final do ingrediente de aumento de sal pode ser escolhida de acordo com métodos bem-conhecidos na técnica e vai depender da aplicação alimentícia particular. Para alimentos líquidos, por exemplo, sopas, o ingrediente de aumento de sal pode ser usado sem processamento adicional em sua forma líquida. Para aplicações a seco tais como crackers, o ingrediente de aumento de sal concentrado seco por pulverização pode ser usado.

[0061] O ingrediente de aumento de sal pode ser adicionado diretamente a produtos alimentícios ou pode ser provido como uma parte de uma composição flavorizante para saborização de produtos alimentícios.

[0062] Composições de saborização contêm o ingrediente de aumento de sal e opcionalmente um ou mais excipientes de grau alimentício. Excipientes adequados para composições de saborização são

bem-conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, sem limitação, solventes (incluindo água, álcool, etanol, óleos, gorduras, óleo vegetal e miglyol), ligantes, diluentes, agentes de desintegração, lubrificantes, agentes flavorizantes, agentes colorantes, conservantes, antioxidantes, emulsificantes, estabilizadores, aumentadores de sabor, agentes adoçantes, agentes antitorta e similar. Exemplos de tais veículos ou diluentes para flavorizantes podem ser encontrados, por exemplo, em “Perfume and Flavor Materials of Natural Origin”, S. Arctander, Ed., Elizabeth, N.J., 1960; em “Perfume and Flavor Chemicals”, S. Arctander, Ed., Vol. I & II, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA, 1994; em “Flavourings”, E. Ziegler e H. Ziegler (ed.), Wiley-VCH Weinheim, 1998, e “CTFA Cosmetic Ingredient Handbook”, J.M. Nikitakis (ed.), 1<sup>a</sup> ed., The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, 1988.

[0063] A composição de sabor pode conter ingredientes flavorizantes adicionais incluindo compostos flavorizantes, sabores de fontes naturais incluindo fontes botânicas e incluindo ingredientes feitos através de fermentação. A composição de saborização pode ter qualquer forma adequada, por exemplo, líquida ou sólida, úmida ou seca, ou em forma encapsulada ligada a ou revestida em veículos/partículas ou como um pó.

[0064] Se o ingrediente de aumento de sal for adicionado como um líquido não concentrado, cerca de 0,25 ppm (0,00025% p/p) a cerca de 400 ppm (0,4% p/p) são geralmente suficientes em aplicações de teor de sódio reduzido ou baixo, por exemplo, sem limitação, em sopas e aplicações tópicas de alimento tais como batatas fritas e salgadinhos.

[0065] Notavelmente, concentrações menores do aumentador de sal (por exemplo, abaixo de 25 ppm, abaixo de 50 ppm, abaixo de 100 ppm ou abaixo de 200 ppm) foram constatadas ter um efeito de au-

mento de sal melhor do que concentrações maiores, por exemplo, de cerca de 300 ppm. No entanto, dependendo do produto alimentício, uma concentração maior pode ser necessária, por exemplo, pelo menos 25 ppm, pelo menos 50 ppm, pelo menos 100 ppm, pelo menos 200 ppm ou pelo menos 300 ppm. Em adição a uma diminuição no efeito de aumento de sal, concentrações maiores podem introduzir gostos ruins que dependendo do produto alimentício que o ingrediente de aumento de sal será usado pode não ser aceitável para o consumidor.

[0066] Para a maioria das aplicações alimentícias tópicas, cerca de 0,5 a cerca de 50 ppm são geralmente suficientes.

[0067] Quando usando um concentrado (por exemplo, através de destilação) ou um ingrediente de aumento de sal seco por pulverização, as concentrações indicadas precisam ser ajustadas com um fator apropriado para levar em consideração a mudança em concentração no ingrediente de aumento de sal.

### **Produtos alimentícios**

[0068] O termo produto alimentício é usado em um sentido amplo para incluir qualquer produto posto na cavidade oral, mas não necessariamente ingerido, incluindo, sem limitação, alimento, bebidas, nutracêuticos e produtos de cuidado dental incluindo enxaguatório bucal.

[0069] Produtos alimentícios incluem produtos cereais, produtos de arroz, produtos de massa, ravioli, produtos de tapioca, produtos de sago, produtos de padeiro, produtos de biscuit, produtos folhados, produtos de pão, produtos de doceria, produtos de sobremesa, gomas, gomas de mascar, chocolates, sorvetes, produtos de mel, produtos de melado, produtos de levedura, produtos de sal e pimenta, produtos condimentados, produtos de mostarda, produtos de vinho, molhos (condimentos), alimentos processados, frutas cozidas e produtos vegetais, carne e produtos de carne, análogos/substitutos de carne, ge-

leias, compotas, caldas de fruta, produtos de ovo, leite e produtos laticínios, produtos de queijo, manteiga e produtos substitutos de manteiga, produtos substitutos do leite, produtos de soja, óleos comestíveis e produtos de gordura, medicamentos, bebidas, sucos, sucos de fruta, sucos vegetais, extratos alimentícios, extratos de planta, extratos de carne, condimentos, nutracêuticos, gelatinas, comprimidos, pastilhas, gotas, emulsões, elixires, xaropes e combinações dos mesmos.

[0070] De interesse particular são, sem limitação, produtos alimentícios tradicionalmente com alto teor de sal de sódio com uma concentração de sal de sódio reduzida, incluindo condimentos e molhos (frio, morno, instantâneo, conserva, sate, tomate, BBQ Sauce, Ketchup, maionese e análogos, bechamel), molho de carne, chutney, molhos de salada (estáveis em prateleira, refrigerados), misturas de batedeira, vinagre, pizza, massa, macarrão instantâneo, batatas fritas, croutons, salgadinhos (batatas fritas, crisps, nozes, tortilla-tostada, pretzels, salgadinhos de queijo, salgadinhos de milho, salgadinhos de batata, pipoca pronta, pipoca de micro-ondas, pipoca de caramelo, torresmos, nozes), crackers (Salgado, tipo 'Ritz'), salgadinhos de cracker "tipo sanduíche", cereais matinais, queijos e produtos de queijo incluindo análogos de queijo (queijo com teor de sódio reduzido, queijo processado pasteurizado (alimento, salgadinhos & coberturas), coberturas aromáticas, produtos de queijo embalados a frio, produtos de molho de queijo), carnes, mousse gelatinosa, carnes curadas (presunto, bacon), carnes para refeição leve/cafê da manhã (cachorros-quentes, cortes frios, molho), produtos à base de soja, produtos de tomate, produtos de batata, composições de pimenta seca ou tempero, composições de pimenta líquida ou tempero incluindo pesto, marinadas e bebidas do tipo sopa/alternativas para refeição e sucos vegetais incluindo suco de tomate, suco de cenoura, sucos vegetais mistos e outros sucos vegetais.

[0071] Alimentos processados incluem margarina, manteiga de amendoim, sopa (clara, enlatada, creme, instantânea, UHT), molho de carne, sucos enlatados, suco vegetal enlatado, suco de tomate enlatado, suco de fruta enlatado, bebidas de suco enlatadas, vegetais enlatados, molhos de massa, entradas congeladas, jantares congelados, entradas para comer com a mão congeladas, jantares embalados a seco (macarrão & queijo, jantares secos-carne adicionada, salada seca/misturas de acompanhamento, jantares secos-com carne). As sopas podem estar em formas diferentes incluindo úmidos condensados, prontos para servir, ramen, secos e sopa pura, alimentos com baixo teor de sódio processados e pré-preparados.

[0072] Dependendo do produto alimentício, para produtos alimentícios que contêm cerca de 10 a 100%, por exemplo, 25 a 50%, menos sódio do que um produto alimentício comparável (por exemplo, produtos com “teor sódio reduzido” com redução de 25% ou produtos com “menos sódio” com uma redução de 50%), o ingrediente de aumento de sal pode ser empregado como segue: uma concentração útil para a maioria das aplicações alimentícias pode ser, por exemplo, cerca de 0,001% a cerca de 0,015% (p/p) com base no ingrediente de aumento de sal não-concentrado. Alternativamente, por exemplo, 25 a 300 ppm ou 0,002% a 0,03% (p/p) com base em um concentrado 2x seco por pulverização podem ser usados.

[0073] O aumentador de sal pode ser usado em forma não-concentrada ou concentrada ou o concentrado pode ser formulado em uma pasta ou pó através de métodos conhecidos na técnica. Neste caso, a quantidade a ser usada tem que ser ajustada apropriadamente. Composições de saborização tais como molhos são frequentemente mais concentradas, por exemplo, um concentrado 10x, e a concentração será ajustada maior apropriadamente.

[0074] A concentração de NaCl em produtos alimentícios comuns

com uma concentração de NaCl regular varia com a maioria dos produtos variando de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 5% (p/p) NaCl. Temperos ou produtos usados como tempero, tais como croutons, molhos ou molhos de salada que são empregados em uma quantidade pequena (a serem aplicados a, por exemplo, salada ou macarrões instantâneos), têm uma concentração de, por exemplo, a partir de cerca de 2% a cerca de 5% (p/p) de NaCl. As sopas geralmente contêm cerca de 0,6% a cerca de 1,25% (p/p) de NaCl. Crackers salgados e produtos de carne (salaminho, presunto, bacon) geralmente contêm cerca de 2% a cerca de 4% (p/p) de NaCl. Os cereais geralmente contêm cerca de 0,6 a 3% (p/p) de NaCl. Produtos que precisam ser reconstituídos (sopas secas) geralmente variam nas faixas de concentração indicadas após reconstituição.

[0075] Para produtos com baixo teor de sódio contendo ainda menos NaCl do que produtos com teor de sódio reduzido (353 mg por porção), a quantidade do ingrediente de aumento de sal pode ter que ser aumentada.

[0076] Para produtos alimentícios com KCl adicionado, dependendo do produto alimentício e dos ditos ingredientes, a concentração de KCl pode ser de a partir de cerca de 0,1% a cerca de 0,2% até cerca de 1%, até cerca de 1,5%, até cerca de 2% (p/p), ou maior, dependendo do quanto a concentração de sódio é reduzida. Uma concentração de KCl de cerca de 0,25% a cerca de 1,5% (p/p), por exemplo, cerca de 0,5% a cerca de 1,5%, (p/p) KCl será útil para a maioria dos produtos com baixo teor de sódio. Uma faixa na qual a concentração de NaCl pode ser reduzida utilmente para a maioria das aplicações é, por exemplo, cerca de 0,25% (p/p) a cerca de 2,5% (p/p) ou de a partir de cerca de 0,125% a cerca de 1,25% (p/p). A quantidade do ingrediente de aumento de sal a ser adicionada ao produto alimentício como um ingrediente vai depender da concentração de KCl usada e do produto

alimentício específico incluindo a base e o sabor particulares. Uma concentração útil para a maioria das aplicações alimentícias pode ser, por exemplo, cerca de 0,001% a cerca de 0,015% (p/p) com base no ingrediente de aumento de sal não-concentrado. Alternativamente, por exemplo, 25 a 300 ppm ou 0,002% a 0,03% (p/p) com base em um concentrado 2x seco por pulverização podem ser usados.

[0077] O ingrediente de aumento de sal pode ser usado em forma não-concentrada ou o concentrado pode ser formulado em uma pasta ou pó ou ingrediente de aumento de sal seco por pulverização através de métodos conhecidos na técnica. Neste caso, a quantidade a ser usada tem que ser ajustada adequadamente.

[0078] A concentração apropriada do ingrediente de aumento de sal pode ser facilmente testada através de uma titulação organoléptica. Esta técnica é bem-conhecida no campo de análise sensorial.

### EXEMPLOS

[0079] A menos que de outra maneira indicado, porcentagens ou razões são dadas como p/p.

### EXEMPLO 1

#### Hidrólise enzimática de espinafre e fermentação do hidrolisato de espinafre

[0080] Várias amostras diferentes foram preparadas conforme indicado na tabela abaixo.

[0081] Folhas de espinafre frescas foram finamente cortadas com um processador de alimento. Água foi adicionada ao espinafre cortado em uma razão 1:9 (água:espinafre) e a pasta fluida foi liquefeita no processador de alimento.

[0082] Uma parte da pasta fluida de espinafre liquefeita foi separada através de destilação em uma fração de resíduo volátil e uma não-volátil/panela.

[0083] Em paralelo, ao invés de pasta fluida liquefeita de espinafre

fresco, pasta fluida liquefeita de pó de espinafre desidratado (seco ao ar) foi usada em uma concentração de 15% em água e obteve resultados similares.

[0084] A pasta fluida liquefeita de espinafre fresco ou desidratado ou suas frações não-voláteis foram aquecidas para 50° C e as amostras que seguem foram preparadas através da adição das enzimas digestivas que seguem nas concentrações indicadas (p/p) para a pasta fluida:

- a) Viscozyme® (0,1%) e Umamizyme® (0,1%) UV
- b) Umamizyme® (0,1%) , Viscozyme® (0.1%) e Glutaminase Flavorpro 373® (0,025%) UVG

| <b>Amostras de pasta fluida de folhas de espinafre</b> | <b>Enzimas</b> |
|--|----------------|
| Frescas - total - controle                             | -              |
| Frescas – total a)                                     | U&V            |
| Frescas – total b)                                     | UV&G           |
| Frescas - voláteis - controle                          | -              |
| Frescas - não-voláteis - controle                      | -              |
| Frescas - não-voláteis a)                              | U&V            |
| Frescas - não-voláteis b)                              | UV&G           |
| <hr/>  |                |
| Pó - controle  | -              |
| Pó - total a)  | U&V            |
| Pó - total b)  | UV&G           |
| Pó - voláteis - controle                               | -              |
| Pó – não-voláteis - controle                           | -              |
| Pó – não-voláteis a)                                   | U&V            |
| Pó – não-voláteis b)                                   | UV&G           |

[0085] Viscozyme® (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) tem uma atividade de 100 Unidades de Beta-Glicanase Fúngica FBG por grama de enzima; por grama de material de partida, 0,1 FBG foi usado. Umamizime® (Amano, Nagoya, Japão) tem uma atividade de 70 U

(método Unidades por LGG, LGG = L-Leucila-Glicila-Glicina); por grama de material de partida, 0,07U são usados.

[0086] Uma Glutaminase, Flavorpro 373<sup>®</sup> (Biocatalysts, Cardiff, UK), pode ser usada como uma enzima proteolítica. Flavorpro 373<sup>®</sup> tem uma atividade de 30 Unidades de Glutaminase (GU); por grama de material de partida, 0,0075 GU é usado.

[0087] Hidrólise enzimática foi deixada prosseguir por 20 a 24 horas a 50º C enquanto agitando a 150 rpm para formar um hidrolisato.

[0088] O hidrolisato foi então esfriado para 37º C e inoculado com uma cultura da noite para o dia de uma linhagem de *Lactobacillus plantarum* (densidade celular de cerca de 10<sup>6</sup> células/g) em uma concentração de 0,3% de cultura da noite para o dia por material hidrolisado/caldo de fermentação.

[0089] O material inoculado sofreu fermentação por cerca de 24 horas (ou até que o pH tivesse diminuído para cerca de pH 4) a 37º C sob agitação mínima. Fermentação foi seguida por um tratamento com calor final de 121º C por 30 minutos.

## EXEMPLO 2

### Avaliação sensorial

[0090] As amostras do exemplo 1 foram organolepticamente avaliadas por profissionais treinados em sabor em um caldo de galinha sem gordura, com sódio a 50% reduzido (480 mg de sódio/porção) em duas concentrações de amostra ou controle (5 ppm e 300 ppm). O caldo de galinha foi servido morno (cerca de 37°C) para prova e todas as amostras foram apresentadas cegamente (de maneira que sua identidade não pôde ser identificada pelos integrantes do painel).

[0091] Cada uma das amostras foi comparada com um controle processado conforme descrito no exemplo, mas sem o tratamento de enzima, e uma intensidade de gosto de sal aumentada em relação ao controle foi classificada como: + ligeiramente salgado, ++ salgado, +++,

gosto de sal forte.

[0092] Os resultados são mostrados na tabela abaixo:

| Amostras fluidas de folhas de espinafre | Enzimas | Aumento de Salinidade 300 ppm | Aumento de Salinidade 5ppm |
|---|---------|-------------------------------|----------------------------|
| Frescas - total - controle              | -       | -                             | -                          |
| Frescas – total a)                      | U&V     | ++                            | +++                        |
| Frescas – total b)                      | UV&G    | ++                            | +++                        |
| Frescas - voláteis - controle           | -       | -                             | -                          |
| Frescas - não-voláteis - controle       | -       | -                             | -                          |
| Frescas - não-voláteis a)               | U&V     | ++                            | +++                        |
| Frescas - não-voláteis b)               | UV&G    | ++                            | +++                        |
| Pó - controle                           | -       | -                             | -                          |
| Pó - total a)                           | U&V     | ++                            | +++                        |
| Pó - total b)                           | UV&G    | ++                            | +++                        |
| Pó - voláteis - controle                | -       | -                             | -                          |
| Pó - não-voláteis - controle            | -       | -                             | -                          |
| Pó - não-voláteis a)                    | U&V     | ++                            | +++                        |
| Pó - não-voláteis b)                    | UV&G    | ++                            | +++                        |

[0093] Aumento de sal quando comparado com controles sem tratamento com enzima.

[0094] Todos os integrantes do painel constataram que o hidrolisato culturado da amostra de folhas de espinafre frescas, bem como aquele do pó de espinafre seco, mostrou um bom efeito de aumento de sal em uma concentração de 5 ppm resultando em um gosto salgado abertamente agradável muito similar em seu perfil de sabor temporal ao cloreto de sódio, sem qualquer gosto desagradável.

[0095] O efeito foi diminuído um pouco nas amostras contendo 300 ppm e um leve gosto ruim metálico (++) foi notado por alguns integrantes do painel, especialmente na amostra a) de pó-não-voláteis com UV mas sem G. As outras amostras tratadas com U e V mas não G também tinham um gosto ruim muito leve (+), comparar resultados na tabela abaixo.

| Amostras fluidas de folha de espinafre | Enzimas | Gosto ruim 5 ppm | Gosto ruim 300 ppm |
|--|---------|------------------|--------------------|
| Frescas – total a)                     | U&V     | -                | +                  |
| Frescas – total b)                     | UV&G    | -                | -                  |
| Frescas - não-voláteis a)              | U&V     | -                | ++                 |
| Frescas - não-voláteis b)              | UV&G    | -                | -                  |
| <hr/>                                  |         |                  |                    |
| Pó - total a)                          | U&V     | -                | +                  |
| Pó - total b)                          | UV&G    | -                | -                  |
| Pó - não-voláteis a)                   | U&V     | -                | +                  |
| Pó - não-voláteis b)                   | UV&G    | -                | -                  |

[0096] Comparação UV & UVG, presença de gostos ruins.

### EXEMPLO 3

#### Avaliação sensorial

[0097] A avaliação foi realizada conforme essencialmente descrito no exemplo 2 retirando a enzima carboidrato (amostra sem "V"). Quando comparado com amostras com enzima carboidrato V, o aumento em Salinidade foi constatado ser menos pronunciado.

[0098] Embora os processos, ingredientes e produtos alimentícios tenham sido descritos acima em conexão com certas modalidades ilustrativas, deve ser compreendido que outras modalidades similares podem ser usadas ou modificações ou adições podem ser feitas às modalidades descritas para realização da(s) mesma(s) função(ões). Ainda, todas as modalidades descritas não estão necessariamente na alternativa, uma vez que várias modalidades podem ser combinadas para prover as características desejadas. Variações podem ser feitas por um versado comum na técnica sem se afastar do escopo do relatório. Desta maneira, os processos, ingredientes e produtos alimentícios não devem ser limitados a nenhuma modalidade única, mas ao contrário considerados em âmbito e escopo de acordo com o mencionado nas reivindicações apensas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo de formação de um ingrediente de aumento de sal, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de

(i) formar uma pasta fluida aquosa de material de planta de espinafre, e

(ii) formar um hidrolisato de material de planta de espinafre submetendo-o a uma hidrólise enzimática usando uma enzima(s) proteolítica(s);

(iii) submeter o material de planta de espinafre a uma hidrólise enzimática usando uma enzima(s) carboidrase(s) em paralelo ou subsequente à hidrólise enzimática por uma enzima(s) proteolítica(s); e

(iv) fermentar o hidrolisato da planta de espinafre usando uma bactéria *Lactobacillus* selecionada do grupo consistindo em *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis* e *L. helveticus* a uma temperatura de 40º C a 60º C.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma enzima(s) e a bactéria *Lactobacillus* no ingrediente de aumento de sal formado são inativadas por calor.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a uma enzima(s) proteolíticas(s) é selecionada do grupo consistindo em proteinase, peptidase e glutaminase.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a uma enzima(s) proteolíticas(s) compreende ambas as atividades de endopeptidase e exopeptidase.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a uma enzima(s) proteolítica(s) compreende uma preparação de enzima de *Aspergillus oryzae* e a hidrólise é realizada a 40º C a 60º C.

6. Ingrediente de aumento de sal, caracterizado pelo fato de que é obtenível através do processo como definido na reivindicação 1.

7. Ingrediente de aumento de sal de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que é concentrado pelo menos 1,5 vez através de remoção de água.

8. Ingrediente de aumento de sal de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o ingrediente de aumento de sal é seco por pulverização.

9. Composição flavorizante para produtos alimentícios, caracterizada pelo fato de que compreende o ingrediente de aumento de sal como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 8 e um ou mais excipientes de grau alimentício.

10. Composição flavorizante de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a concentração de ingrediente de aumento de sal como definido na reivindicação 9 é 0,25 a 400 ppm com base no uso do ingrediente de aumento de sal não-concentrado.

11. Produto alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende o ingrediente de aumento de sal como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 8, preferivelmente em uma concentração de 0,25 a 400 ppm com base no uso do ingrediente de aumento de sal não-concentrado.

12. Produto alimentício de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que é um produto alimentício com teor de sódio reduzido ou menor, preferivelmente com uma concentração de cloreto de sódio que é 0,15% (p/p) a 3% (p/p), mais preferivelmente 0,15% (p/p) a 1,5% (p/p).

13. Produto alimentício com teor de sódio reduzido ou baixo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda KCl, opcionalmente compreendendo KCl em uma concentração de 0,1% a 2% (p/p) de KCl.

14. Método de provisão de um produto alimentício com salinidade aumentada, caracterizado pelo fato de que o ingrediente de aumento de sal conforme definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 8 é misturado a um produto alimentício.