

(11) Número de Publicação: **PT 1893033 E**

(51) Classificação Internacional:
A23C 11/10 (2007.10) **A23L 1/105** (2007.10)
C12N 1/04 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.07.06	(73) Titular(es): ALPRO NV	
(30) Prioridade(s): 2006.07.07 EP 06447086	VLAMINGSTRAAT 28 8560 WEVELGEM	BE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.03.05	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.10.22 235/2008	DOMINIEK DE SCHINKEL	BE
	DIRK DE BUYSER	BE
	(74) Mandatário:	
	JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO	
	R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA PREPARAR UM ANÁLOGO DE UM PRODUTO LÁCTEO**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODO PARA PREPARAR UM ANÁLOGO DE UM LACTICÍNIO"

A invenção presente diz respeito a um método para se preparar um análogo de um lacticínio, e de preferência um análogo de um produto lácteo fermentado, utilizando uma cultura bacteriana contendo bactérias lácticas. O método é caracterizado por todos os passos do método serem levados a cabo em condições de isenção da presença de animais, incluindo o isolamento das bactérias lácticas e a adaptação destas bactérias lácticas pela cultura destas bactérias em meios respectivamente de isolamento e de adaptação, que são 100 % de origem vegetal. O análogo de lacticínio referido pode ser um produto alimentar vegetal, um ingrediente alimentar vegetal, ou um alimento funcional vegetal.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA PREPARAR UM ANÁLOGO DE UM PRODUTO LÁCTEO"

Domínio da invenção

A invenção presente diz respeito ao domínio da tecnologia de alimentos. A invenção presente proporciona uma cultura bacteriana contendo bactérias lácticas que foram adaptadas cultivando-as num meio de adaptação 100 % isento de animais, e a um método de se preparar uma tal cultura bacteriana. A invenção presente também diz respeito a um método para se prepararem análogos de laticínios e aos análogos de laticínios que dessa forma se obtêm utilizando a cultura bacteriana referida.

Estado dos conhecimentos à data da invenção

As bactérias lácticas (LAB) são um grupo de bactérias gram-positivas que produzem ácido láctico em resultado da fermentação de hidratos de carbono. Elas têm sido utilizadas há séculos na fermentação de alimentos, não apenas por causa do desenvolvimento de sabor e de textura, mas também por causa da sua capacidade para produzirem compostos antimicrobianos, que impedem o crescimento de micro-organismos de deterioração ou patogénicos.

As LAB são conhecidas sobretudo pelo seu papel na preparação de produtos alimentares fermentados, tais como o

iogurte (*Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.), queijos (*Lactococcus* spp.) e, chucrute (*Leuconostoc* spp.). Para além disto, as LAB também são utilizadas para se prepararem pickles de vegetais, em padaria, no fabrico de vinhos, na cura de pescado, de carnes e de produtos de salsicharia. O seu crescimento faz baixar o pH devido à produção de ácido láctico. Este processo de acidificação inibe o crescimento da maior parte dos outros micro-organismos incluindo os patogénicos mais comuns do ser humano, permitindo portanto que estes alimentos apresentem uma vida útil prolongada. A acidez também altera a textura dos alimentos devido à precipitação de algumas proteínas, e as transformações bioquímicas que ocorrem durante o crescimento aumentam o sabor.

As LAB são heterotóficas e apresentam em geral necessidades nutricionais complexas porque não dispõem de muitas das capacidades biossintéticas. A maior parte das espécies tem múltiplas exigências no que toca a aminoácidos e a vitaminas. Por causa disto, as bactérias lácticas são em geral abundantes apenas em comunidades em que essas necessidades podem ser satisfeitas. Estas comunidades estão amiúde associadas com as cavidades orais dos animais e com os seus intestinos (por exemplo *Enterococcus faecalis*), com folhas de plantas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) bem como com material em decaimento, vegetal ou animal, tal como vegetais em apodrecimento, material fecal, compostados, etc.

Na técnica anterior, fazem-se tradicionalmente crescer as bactérias lácticas e mantêm-se em meios contendo proteínas animais tais como o leite, a caseína, a peptona de carne, o soro de cavalo, a albumina de soro bovino, soro de leite, etc., e/ou ingredientes provenientes de animais tais como cloreto de hemina, e/ou ingredientes obtidos utilizando enzimas com origem animal tais como a tripsina, a pepsina, ou a pancreatina. Para além disto, sabe-se bem na técnica que conservar as bactérias lácticas ao frio utilizando componentes de origem animal tais como o soro de cavalo.

Por exemplo, na FR 2.831.395 descreve-se a utilização de uma estirpe de *Lactobacillus plantarum* depositada, para a fermentação de sumo de soja e/ou de outros produtos semelhantes baseados em soja. A estirpe de *L. plantarum* é utilizada para a fermentação de leite de soja para a preparação de análogos de produtos lácteos com origem vegetal. Esta estirpe é conservada em azoto líquido num meio contendo ingredientes derivados de animais (caldo MRS).

No entanto, quando se utilizam LAB que foram conservadas, se fizeram crescer e/ou se mantiveram, em meios tais como os que se indicaram acima, para a preparação de análogos de produtos lácteos, podem surgir diversos problemas, incluindo períodos de fermentação relativamente longos, maus sabores, perda da actividade metabólica específica das LAB, menor taxa de sobrevivência

das bactérias lácticas nos produtos preparados isentos de lacticínios e/ou uma vida útil limitada para os produtos preparados isentos de lacticínios.

Para além disto, a utilização das LAB anteriormente conservadas, cultivadas e/ou mantidas em meios tais como os que foram indicados acima em alimentos para vegetarianos ou para vegetarianistas representa um problema ético para grupos específicos de consumidores tais como os vegetarianos ou os vegetarianistas, e para diversos grupos religiosos tais como no caso de se haver utilizado peptona de carne de vaca para os Hindus ou no caso de peptona de carne de porco para Judeus ou para Muçulmanos.

A invenção presente tem como objectivo proporcionar uma solução para pelo menos alguns dos problemas mencionados acima.

Mais especificamente, é um objecto da invenção presente proporcionar um método melhorado para se prepararem produtos alimentares, por exemplo análogos de lacticínios fermentados, que seja mais eficaz e necessite de períodos de fermentação mais curtos.

É outro objecto ainda da invenção proporcionar um método melhorado para se prepararem produtos alimentares, preferivelmente produtos alimentares fermentados, no qual os produtos alimentares referidos, por exemplo análogos a

lacticínios, apresentem melhor qualidade, propriedades nutricionais e/ou organolépticas.

É outro objecto ainda da invenção proporcionar uma cultura bacteriana melhorada de bactérias lácticas, para utilização na preparação de produtos alimentares, preferivelmente produtos alimentares fermentados tais como análogos de lacticínios fermentados.

A utilização de meios de crescimento isentos de proteínas animais para criar bactérias lácticas foi descrita em Heenan, C. N. et al., Lebensm.-Wiss, u. Technol. **35**: 171-176 (2002)

Descrição Resumida da Invenção

Num primeiro aspecto, a invenção diz respeito a um método para se preparar um análogo de um lacticínio. O método inclui os passos de:

a) se isolar uma ou mais bactérias lácticas a partir do seu ambiente natural ou a partir de uma colecção de culturas, num meio de isolamento adequado isento de produtos de origem animal;

b) se adaptarem as bactérias isoladas referidas cultivando essas bactérias num meio de

adaptação adequado isento de produtos de origem animal;

c) se cultivarem as bactérias adaptadas referidas num meio adequado isento de produtos de origem animal, e

d) se preparar um análogo de um lacticínio adicionando ao referido análogo de um produto lácteo, a título de matéria-prima, uma quantidade adequada das bactérias obtidas no passo c).

O método caracteriza-se por os passos a) a d) serem levados a cabo em condições de isenção da presença de produtos de origem animal. Numa concretização preferida, os meios de isolamento, de adaptação e de cultura são meios 100 % vegetais. O passo d) inclui preferivelmente fermentar-se um análogo a um lacticínio adicionando ao referido análogo a um lacticínio usado como matéria-prima uma quantidade adequada das bactérias obtidas no passo c).

Noutro seu aspecto adicional, a invenção também inclui um análogo a um lacticínio que se possa obter pelo método presente. O análogo a um produto lácteo é preferivelmente um produto alimentar vegetal, um ingrediente alimentar vegetal, ou um alimento funcional vegetal. Mais preferivelmente, o análogo a um lacticínio é

um análogo a um lacticínio fermentado, que seja preferivelmente derivado da soja.

A invenção presente também diz respeito a bactérias lácticas ou a uma cultura de bactérias que inclua uma ou mais bactérias lácticas que tenham sido isoladas e adaptadas por cultura, respectivamente, num meio de isolamento e num meio de adaptação isentos de produtos de origem animal ou 100 % vegetais. As bactérias lácticas são preferivelmente seleccionadas de entre os géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, e *Streptococcus*.

A invenção presente proporciona um método para preparar um análogo a um lacticínio, preferivelmente um análogo a um lacticínio fermentado, em que os passos de isolamento, adaptação, cultivo, e preparação (isto é, a adição e/ou a fermentação) são todos levados a cabo sob condições e/ou em meios garantindo a isenção da presença de produtos de origem animal. De acordo como método presente, portanto, é evitada a contaminação com produtos de origem animal durante todo o processo de preparação do análogo a lacticínio. Para além disto, a entidade solicitante da patente demonstrou fazendo crescer as bactérias presentes num meio de adaptação 100 % vegetal, que as bactérias são capazes de sofrer adaptação (bio)química, por exemplo alterando os seus perfis de expressão de enzimas. Essa adaptação tem consequências inesperadas e vantajosas para o processo de preparação em si próprio, mas também para as

propriedades de qualidade e nutricional dos análogos a laticínios preparados.

Com o propósito de se ilustrarem melhor as características da invenção, descrevem-se adiante neste documento algumas concretizações preferidas e exemplos são descritos adiante neste documento em relação aos desenhos insertos.

Descrição das figuras

A **FIG. 1** ilustra a variação do pH num leite de soja que se está a fermentar com *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669).

A **FIG. 2** representa perfis em SDS PAGE para *L. casei* T (LMG P-23506) em meio S (**FIG. 2A**), para *L. casei* T (LMG P-23506) em meio MRS (**FIG. 2B**) e para *L. casei* 6904 em meio MRS (**FIG. 2C**).

A **FIG. 3** mostra a transição gradual no espectro de IV típico quando se compara o *L. casei* V (LMG P-23504) em meio S (VS), adaptada em meio S e re-adaptada em meio MRS (VSM), adaptada em meio MRS e re-adaptada em meio S (VMS) e adaptada ao meio MRS (VM).

A **FIG. 4** representa os perfis de SDS PAGE bidimensional para *L. casei* V (LMG P-23504) em meio S (**FIG.**

4A), para *L. casei* V (LMG P-23504) em meio MRS (**FIG. 4B**). As setas indicam as diferenças entre ambos os geles.

A **FIG. 5** ilustra a velocidade de fermentação de um leite de soja + 2 % de glucose quando se utiliza *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) isolado, adaptado e mantido nos meios S ou MRS.

A **FIG. 6** ilustra a velocidade de fermentação de um leite de soja + 2 % de glucose quando se utiliza o *L. casei* V (LMG P-23504) isolado, adaptado e mantido nos meios S ou MRS.

A **FIG. 7** ilustra a velocidade de fermentação de um leite de soja + 2,5 % de rafinose quando se utiliza o *B. infantis* (LMG P-24096) isolado, adaptado e mantido nos meios S ou MRS.

A **FIG. 8** ilustra a velocidade de fermentação a um pH constante de 5,9, de um leite de soja + 2,5 % de rafinose quando se utiliza o *B. infantis* (LMG P-24096) isolado, adaptado e mantido nos meios S ou MRS.

Descrição pormenorizada da invenção

A invenção presente proporciona um método para se preparar um análogo a um laticínio, preferivelmente um análogo a um laticínio fermentado. Tradicionalmente, os processos de preparação ou de fermentação incluem os passos

de A) se fazerem crescer as bactérias, B) se cultivarem as bactérias referidas e C) se utilizarem as bactérias referidas sob a forma de culturas bacterianas, num passo de preparação ou de fermentação.

Na técnica, têm sido vendidos aos consumidores produtos fermentados e não fermentados sob uma designação incluindo a expressão "100 % vegetal". Deve no entanto tornar-se bem claro que esses produtos não têm de facto uma origem 100 % vegetal, uma vez que na prática, em geral nem todos os passos na produção desses produtos são levados a cabo unicamente na presença de material vegetal. Tradicionalmente, antes de serem multiplicadas e inoculadas a título de fermento, as bactérias lácticas são cultivadas em meios que contêm proteínas animais, por exemplo tais como o leite, a caseína, uma peptona de carne, o soro de cavalo, a albumina de soro bovino, o soro de queijo, etc.

Pelo contrário, a invenção presente difere de tais processos da técnica anterior porque antes de serem cultivadas e inoculadas a título de cultura bacteriana, as bactérias lácticas são isoladas em meio de isolamento isento de produtos de origem animal, e fazem-se crescer em meio de adaptação isento de produtos de origem animal. No processo presente, todos os passos de isolamento, adaptação, cultura e preparação são levados a cabo em meios e/ou sob condições isentas de produtos de origem animal.

A expressão "*isento/a de produtos de origem animal*" refere-se neste contexto a condições e/ou a meios aos quais não são adicionados produtos de origem animal. Podem estar presentes vestígios de componentes com origem animal não pretendidas, mas não têm qualquer efeito no metabolismo e/ou no perfil de expressão enzimática das bactérias lácticas. Preferivelmente as bactérias lácticas são isoladas e cultivadas de acordo com a invenção num meio isento de produtos de origem animal que é substancialmente, e preferivelmente, um meio 100 % vegetal. O termo "*substancialmente*" tal como se utilize neste contexto, refere-se a um meio vegetal na preparação do qual apenas se utilizam ingredientes 100 % vegetais, mas no qual podem estar presentes vestígios, não pretendidos, de componentes com origem animal, mas em que esses vestígios não têm qualquer efeito sobre o metabolismo e/ou a expressão enzimática das bactérias lácticas. Numa concretização preferida, o meio isento de produtos de origem animal ou 100 % vegetal inclui componentes vegetais e/ou componentes sintéticas derivadas de fontes vegetais. Os exemplos preferidos de meios 100 % isentos de produtos de origem animal incluem meios nos quais, por exemplo, a fonte de azoto é uma peptona vegetal tal como a peptona de soja, e a fonte de carbono é uma espécie de açúcar derivada de plantas, tal como a frutose, ou a meios sintéticos com uma composição bem definida em aminoácidos e vitaminas sintéticas, que apenas provêm de fontes não animais.

A invenção presente proporciona um método para preparar um análogo de um lacticínio fermentado que é mais seguro e mais transparente, uma vez que é evitada a contaminação com produtos de origem animal durante todo o processo de produção do análogo ao lacticínio, incluindo os passos de isolamento, adaptação, cultura e fermentação.

Os solicitantes verificaram também além disto que pela utilização de bactérias lácticas que foram isoladas e adaptadas num meio 100 % vegetal, se obtêm períodos de fermentação mais curtos na preparação de análogos a lacticínios fermentados. Para além disto, a sobrevivência das bactérias lácticas durante a vida útil dos análogos a lacticínios que se preparam também é superior.

Para além disto, utilizando bactérias lácticas que foram isoladas e adaptadas num meio 100 % vegetal como cultura bacteriana no método presente permite melhorar as propriedades estruturais, nutricionais e/ou organolépticas dos produtos preparados, incluindo uma melhor digestibilidade.

Outra vantagem da cultura de bactérias presente é que não contém compostos de origem animal. A cultura bacteriana pode vantajosamente ser utilizada para preparar análogos de lacticínios que sejam adequados para determinados grupos de consumidores tais como os vegetarianos, os vegetarianistas, ou grupos religiosos tais como os Judeus ou os Muçulmanos. Para além disto, a

utilização das culturas bacterianas presentes remove o risco de ser transmitida uma contaminação proveniente de animais, tal como a encefalopatia espongiforme dos bovinos (BSE) ou outros agentes infecciosos e lesivos, aos consumidores dos análogos a lacticínios que se preparam.

O método presente será explicado em mais pormenor adiante no que toca aos seus diferentes passos.

Isolamento de Bactérias Lácticas

Um primeiro passo do método presente inclui o isolamento de uma ou mais bactérias lácticas em meio de isolamento isento de produtos de origem animal.

Podem isolar-se bactérias lácticas a partir do seu ambiente natural, por exemplo a partir das cavidades orais de animais ou dos seus intestinos, de leite, de queijo; de folhas de plantas e também de materiais em decomposição, quer de plantas quer de animais, tais como vegetais em apodrecimento, material fecal, produtos de compostagem, produtos vegetais naturalmente fermentados (pickles, choucroute, etc.).

Podem também isolar-se as bactérias lácticas a partir de uma colecção de culturas, tais como as colecções de culturas que se encontram presentes nas instituições depositárias nos termos do tratado de Budapeste.

Isolam-se as bactérias num meio de isolamento, e preferivelmente um meio 100 % vegetal. O passo de isolamento no método presente inclui *um único passo* de se levarem as bactérias para um meio de isolamento adequado, preferivelmente um meio de isolamento 100 % vegetal. O passo de isolamento é o primeiro passo na transposição de bactérias, por exemplo provenientes do meio ambiente ou de uma colecção de culturas, para um meio de isolamento adequado tal como se define neste documento. Deste modo, o isolamento inclui em princípio substancialmente apenas um passo manipulativo.

Preferivelmente as bactérias lácticas são seleccionadas de entre o conjunto constituído pelos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* *Bifidobacterium*, e *Streptococcus*. Numa concretização preferida, as bactérias lácticas incluem *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, ou *L. reuteri*. Noutra concretização as bactérias lácticas incluem *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, *L. piscium*, ou *L. raffinolactis*. Noutra concretização as bactérias lácticas incluem *Bifidobacterium infantis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis (lactis)*, e *B. adolescentis*. Noutra concretização ainda as bactérias lácticas incluem *Streptococcus salivarius* ou *Streptococcus thermophilus*, e preferivelmente *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*.

Numa concretização mais preferida, as bactérias lácticas incluem *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504), *Lactobacillus casei* W (LMG P-23505), *Lactobacillus casei* T (LMG P-23506), *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669), *Bifidobacterium infantis* S (LMG P-24096) e/ou *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (LMG P-24095). A estirpe *Lactobacillus casei* V foi depositada junto da Colecção de Bactérias BCCM/LMG, Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Bélgica no dia 11 de Abril de 2006 (recibo do depósito emitido pela Autoridade Depositária a 17 de Fevereiro de 2006). A estirpe depositada tem as características do número de acessão que lhe foi atribuído LMG P-23504. A estirpe *Lactobacillus casei* V foi depositada junto da Colecção de Bactérias BCCM/LMG, Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Bélgica no dia 11 de Abril de 2006 (recibo do depósito emitido pela Autoridade Depositária a 17 de Fevereiro de 2006). A estirpe depositada tem as características do número de acessão que lhe foi atribuído LMG P-23505. A estirpe *Lactobacillus casei* V foi depositada junto da Colecção de Bactérias BCCM/LMG, Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Bélgica no dia 11 de Abril de 2006 (recibo do depósito emitido pela Autoridade Depositária a 17 de Fevereiro de 2006). A estirpe depositada tem as características do número de acessão que lhe foi atribuído LMG P-23506. Noutra concretização as referidas bactérias lácticas são *Lactococcus lactis* S. Esta estirpe foi depositada na Colecção de Bactérias BCCM/LMG, Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Bélgica a 15 de Maio de 2006. A estirpe depositada tem as características do número de acessão que lhe foi

atribuído LMG P-23669. Noutra concretização as bactérias lácticas referidas são *Bifidobacterium infantis* S. Esta estirpe foi depositada junto da Colecção de Bactérias BCCM/LMG, Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Bélgica, a 12 de Abril de 2007. A estirpe depositada tem as características do número de acessão que lhe foi atribuído LMG P-24096. Noutra concretização ainda as bactérias lácticas referidas são *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Esta estirpe foi depositada junto da Colecção de Bactérias BCCM/LMG, Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Bélgica a 12 de Abril de 2007. A estirpe depositada tem as características do número de acessão que lhe foi atribuído LMG P-24095.

Adaptação

De acordo com a invenção presente, proporciona-se um método em que as bactérias lácticas são isoladas e adaptadas fazendo-as crescer em meios adequados de isolamento isentos de produtos animais à sua temperatura óptima de crescimento.

O termo "crescer", tal como se utilize neste documento, refere-se ao crescimento de bactérias. O crescimento bacteriano é definido neste documento como tratando-se de um aumento da biomassa bacteriana.

O passo de adaptação no método presente inclui preferivelmente o crescimento e novos plaqueamentos frequentes das bactérias num meio de adaptação adequado,

preferivelmente a 100% vegetal. O passo de adaptação implica pelo menos um e preferivelmente mais do que um novo plaqueamento das bactérias para um meio de adaptação tal como definido neste documento. Durante este passo de adaptação, as bactérias são frequentemente submetidas a novos plaqueamentos, por exemplo a cada 3 a 5 dias, para manter as bactérias num estado viável. Preferivelmente, durante estas operações de plaqueamento, seleccionam-se as maiores colónias bacterianas. Fazem-se crescer as bactérias a uma temperatura adequada durante um período de tempo apropriado. Por exemplo, para as bactérias *Lactococcus*, a temperatura ronda preferivelmente os 30°C; para *Lactobacillus* a temperatura é preferivelmente de 30°C ou de 37°C, dependendo da estirpe, para *Streptococcus thermophilus* a temperatura é preferivelmente de 42°C, enquanto que para *Bifidobacterium* a temperatura é preferivelmente de cerca de 37°.

O passo de adaptação é caracterizado em especial por se fazerem crescer as LAB num meio isento de produtos de origem animal, ou 100 % vegetal. A solicitante demonstrou que fazendo crescer e plaqueando de novo frequentemente as LAB num meio 100 % vegetal, as LAB se adaptam a um tal meio. O termo "adaptação", quando é utilizado neste contexto refere-se aos fenómenos que as LAB sofreram, modificações químicas e metabólicas, em particular no que toca ao seu metabolismo enzimático, por exemplo por ajustarem o seu perfil enzimático, a indução/regulação em baixa de determinados enzimas, a

actividade enzimática, a cinética da síntese de enzimas, etc..., em função das componentes presentes no meio vegetal. Em resultado disto, as LAB estão mais adaptadas a componentes vegetais, e obtêm capacidades melhoradas para subsequentemente fermentarem produtos de origem vegetal.

Pode utilizar-se qualquer meio padrão para a cultura de bactérias como base para se preparar o meio vegetal presente, desde que a composição final do meio seja isenta de produtos de origem animal, ou seja substancialmente vegetal, tal como se define neste documento. O termo "meios" pode ser utilizado referindo meios sólidos plaqueados que suportem o crescimento das bactérias. Também se incluem nesta definição sistemas para o crescimento de micro-organismos que sejam semi-sólidos e líquidos, bem como quaisquer tipos de meios. Podem preparar-se os meios sólidos habituais pela adição de um agente solidificante tal como o agar a qualquer meio líquido.

O meio da invenção presente inclui preferivelmente uma fonte de carbono, uma fonte de azoto, uma fonte vitamínica, uma fonte de minerais essenciais e opcionalmente um agente de selecção, tal como um agente redutor como a L-cisteína ou um antibiótico, para seleccionar os micro-organismos que se pretende entrem em cultura.

Numa concretização, o meio de isolamento isento de produtos de origem animal e o meio de adaptação isento de produtos de origem animal são ambos o mesmo meio. Noutra concretização, o meio de isolamento isento de produtos de origem animal e o meio de adaptação isento de produtos de origem animal são meios diferentes. Por exemplo, o meio de adaptação pode ser mais pobre do que o meio de isolamento, ou pode conter componentes (tais como por exemplo péptidos específicos derivados de uma fonte vegetal, rafinose, estaquiase, ácido fítico, ...) que melhoram o processo de adaptação. Num exemplo, o meio de isolamento inclui diferentes hidratos de carbono fermentescíveis tais como frutose, glucose e sacarose e uma fonte de azoto proveniente de diversas peptonas vegetais (por exemplo da soja e da batata), enquanto o meio de adaptação é mais selectivo e inclui por exemplo uma peptona específica de soja com uma distribuição específica de massas moleculares e um hidrato de carbono fermentescível (por exemplo frutose).

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "*fonte de carbono*" é utilizada para referir qualquer composto que possa ser utilizado como fonte de carbono para o crescimento bacteriano e/ou para o metabolismo das bactérias. As fontes de carbono podem assumir diversas formas, incluindo, mas sem que se limitem a, as de polímeros, hidratos de carbono, ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, aminoácidos, e péptidos.

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "fonte de azoto" é utilizada para referir qualquer composto que possa ser utilizado a título de fonte de azoto para o crescimento bacteriano e/ou para o metabolismo das bactérias. Tal como sucede com as fontes de carbono, as fontes de azoto podem assumir diversas formas, tais como as de azoto livre, bem como as de compostos que contenham azoto, incluindo mas sem que se limitem a aminoácidos, peptonas, vitaminas, amoníaco e sais azotados.

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "fonte de minerais" pode referir-se à adição de um ou mais minerais. Tal como se utiliza neste documento, a expressão "fonte de vitaminas" pode referir-se à adição de uma ou mais vitaminas.

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "agente de selecção" é utilizada para referir qualquer composto que iniba o crescimento de, ou que mate micro-organismos ou que estimule o crescimento do organismo seleccionado. Pretende-se que a expressão seja utilizada com o seu sentido mais geral, e inclua, sem que se limite a, compostos tais como a L-cisteína ou antibióticos que sejam produzidos por via natural ou sintética. Também se pretende que a expressão inclua compostos e elementos que sejam úteis para inibir o crescimento de, ou para matar micro-organismos ou para estimular organismos seleccionados. Os agentes de selecção podem ser incorporados nos meios utilizados na invenção presente.

Desta forma, os organismos com características indesejáveis (por exemplo, os contaminantes) podem ser inibidos ou mortos antes de ou durante a conservação e/ou o reavivamento dos organismos com interesse. Em alternativa, pela adição de agentes estimuladores, esses agentes estimulam o crescimento dos organismos seleccionados de modo a que os organismos seleccionados tenham uma vantagem durante o seu reavivamento.

Numa concretização preferida, o meio de acordo com a invenção inclui uma peptona vegetal; uma componente de leveduras (tal como um extracto de levedura); um hidrato de carbono fermentescível derivado de um vegetal; e um tampão.

As peptonas vegetais são misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos que são obtidos por digestão de tecidos de plantas que contêm proteínas, tais como, por exemplo, bagaço de soja ou proteína de soja. As peptonas contêm sobretudo péptidos e aminoácidos singelos. Como são produtos em bruto da digestão de materiais complexos, elas contêm uma grande variedade de outros materiais orgânicos e inorgânicos. As peptonas podem ser seleccionadas de entre o conjunto que inclui soja, algodão, trigo, malte, milho, batata, feijão, tremço, sorgo e/ou arroz. Preferivelmente a peptona é uma peptona de soja. Incluem-se nos exemplos de peptonas vegetais mas não se limitam a esta, produtos de digestão da proteína de soja (bagaço de soja) com papaína comercial, produtos de

digestão de farinha de trigo com papaína comercial, produtos de digestão de proteína de batata com papaína comercial, etc...

Podem utilizar-se procedimentos padrão bem conhecidos dos especialistas da técnica para a preparação de peptonas vegetais. Por exemplo, podem preparar-se composições proteicas derivadas de soja por digestão enzimática de bagaço de soja ou de isolado de soja partindo de enzimas vegetais padrão tais como a papaína. Podem também obter-se composições proteicas por hidrólise ácida de um isolado de soja. Para resumir, as peptonas vegetais são produtos de digestão química ou enzimática de proteínas vegetais e contêm uma mistura de aminoácidos, pequenos péptidos e polipéptidos de diferentes dimensões. Preferivelmente a peptona vegetal está presente no meio numa quantidade de entre 0,1 e 10 %, em peso, e preferivelmente de entre 0,5 e 5 %, em peso, e mais preferivelmente de cerca de 1 %, em peso.

Noutra concretização, o meio inclui uma componente de leveduras. Uma tal componente de leveduras pode ser utilizada como fonte de aminoácidos, de vitaminas, de coenzimas e de purinas e pirimidinas incluindo muitos que são necessários a como factores de crescimento para os organismos. A concentração de componente de leveduras no meio presente está preferivelmente compreendida entre 0,1 e 10 %, em peso, e preferivelmente entre 0,3 e 5 %, em peso, e é mais preferivelmente de cerca de 0,5 %, em peso. As

componentes de leveduras podem ser preparadas por procedimentos padrão bem conhecidos dos especialistas da técnica. Para além disto, as componentes de leveduras estão comercialmente disponíveis. A componente de leveduras pode ser constituída por levedura autolisada, extracto de levedura (isso é, um extracto de células de levedura) ou um extracto de leveduras (ultra)filtrado.

Noutra concretização ainda, o meio de isolamento e/ou de adaptação vegetal presente inclui um tampão adequado para manter a gama de pH óptima para o organismo, em meio sólido ou em meio líquido, para impedir alterações pronunciadas do pH que de outra forma ocorreriam em resultado da produção de ácidos ou bases orgânicos por parte do micróbio. Incluem-se nos exemplos dos tampões adequados os fosfatos de sódio e de potássio e o carbonato de cálcio. As preparações orgânicas em bruto, tais como as peptonas (veja-se adiante) também actuam como tampões. As componentes Químicas tais como a tricina e o MOPS também podem ser utilizadas como componentes de tampões. A concentração de tampão no meio presente varia preferivelmente entre 0,1 e 10 %, em peso; e preferivelmente entre 0,3 e 5 %, em peso, e é preferivelmente de cerca de 0,5 %, em peso. Preferivelmente o meio vegetal é tamponizado a um pH de entre 5 e 8, e preferivelmente entre 6 e 6,5.

Num exemplo o meio vegetal é tamponizado a um pH de 6,3 no caso de se tratar de um meio para *Lactococcus lactis* ou *Lactobacillus casei*.

Numa outra concretização preferida, a invenção presente proporciona um meio de isolamento e/ou de adaptação que inclui um hidrato de carbono derivado de vegetais, fermentescível. Os hidratos de carbono são compostos químicos que contêm átomos de oxigénio, hidrogénio e carbono. A expressão "derivado de vegetais" neste contexto refere-se a hidratos de carbono, que é um grande grupo de açúcares, amidos, celulosos, e gomas, que são provenientes de fontes vegetais tais como o milho, o trigo, a chicória, a mandioca, o arroz, a batata, a beterraba ou a cana e que são substancialmente isentas de produtos de origem animal. Os hidratos de carbono fermentescíveis podem incluir glucose, frutose, sacarose, galactose, etc... Este conceito exclui hidratos de carbono que sejam derivados do leite ou de produtos lácteos, tais como por exemplo a lactose. Preferivelmente utilize-se a título de hidrato de carbono a frutose ou a glucose. A concentração em hidratos de carbono fermentescíveis no meio presente varia preferivelmente entre 0,1 e 10 %, em peso, e preferivelmente entre 0,5 e 5 %, em peso, e preferivelmente é de 1 %, em peso.

Para se preparar um meio sólido, o meio vegetal contém também agar-agar, preferivelmente numa quantidade de

entre 1 e 2 %, em peso, e por exemplo numa quantidade de 1.5%, em peso.

Cultura

O Passo c) do método presente inclui a cultura de bactérias adaptadas num meio adequado isento de produtos de origem animal.

Um tal meio de cultura isento de produtos de origem animal pode incluir peptonas vegetais tais como se definiram neste documento, por exemplo da soja, do trigo, do arroz, da batata; componentes de leveduras tais como definidas neste documento; hidratos de carbono fermentescíveis derivados de vegetais tais como definidos neste documento; ou fontes de hidratos de carbono complexos tais como licor de milho, melaços, etc...

A cultura envolve a multiplicação de bactérias adaptadas numa escala maior com o objectivo de se obter biomassa suficiente que se pode utilizar num próximo passo para se prepararem os análogos a lacticínios.

É claro que a temperatura e o período necessários para o passo de cultura dependerão do tipo de bactérias lácticas. Além disto, a cultura é levada a cabo à temperatura óptima para as bactérias adaptadas a que respeita, por exemplo para *Lactococcus lactis* S é de 30°C enquanto que para *Lactobacillus casei* V é de 30° ou 37°C,

dependendo da estirpe. O pH é monitorizado e mantido constante por adição de um produto alcalino tal como hidróxido de sódio, hidróxido de amónio, hidróxido de cálcio, ... O pH óptimo depende da cultura e varia preferivelmente entre 5 e 8. O pH é por exemplo de cerca de 6,3 no caso de *Lactococcus lactis* S ou de *Lactobacillus casei* V.

Preparação de análogos a lacticínios

Num passo seguinte d), prepara-se um análogo a um lacticínio adicionando a um análogo a um lacticínio utilizado como matéria-prima uma quantidade adequada de bactérias que tenham sido objecto de cultura (multiplicação) no passo c). Essa quantidade adequada pode incluir entre 10^5 e 10^{10} bactérias por mL, e preferivelmente incluirá 10^7 bactérias/mL. O passo de preparação d) pode ou não incluir um passo de fermentação: as bactérias do passo c) podem ser adicionadas ao análogo a lacticínio a título de ingrediente, sem fermentação, ou podem ser adicionadas como cultura de arranque que é subsequentemente objecto de fermentação. Opcionalmente, pode pasteurizar-se ou esterilizar-se o produto que se vai fermentar antes dessa sua fermentação.

Numa concretização preferida, a invenção presente proporciona um método para se preparar um análogo a um lacticínio, em que o período de fermentação durante a preparação do análogo a lacticínio referido é encurtado.

Numa concretização preferida, proporciona-se um método no qual o período de fermentação durante a preparação do referido análogo a lacticínio é encurtado em pelo menos 10 %, preferivelmente em pelo menos 15 %, mais preferivelmente em pelo menos 20 % ainda mais preferivelmente em pelo menos 30 %. O período de fermentação pode ser por exemplo diminuído em 15, 18, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40, 45 ou mesmo 50 %.

Deve ser claro que a temperatura e o período de tempo necessários para o passo de fermentação dependerão do tipo de análogo a lacticínio que se pretende fermentar. Num exemplo preferido, o análogo a lacticínio é leite de soja, preparado a partir de grãos de soja tal como descrito para Tonyu ou preparado a partir de Isolados de Soja. Para além disto, a fermentação é levada a cabo à temperatura óptima para as bactérias adaptadas que se utilizarem, por exemplo para *Lactococcus lactis* S é a 30°C enquanto que para *Lactobacillus casei* V é a 30° ou a 37°C, dependendo da estirpe utilizada. Durante a fermentação, o pH decresce e as proteínas coagulam. O Exemplo 3 ilustra como a utilização de uma cultura de bactérias lácticas que foram previamente isoladas, adaptadas e submetidas a uma cultura de acordo com a invenção permite melhorar a preparação de um análogo a um lacticínio, e em especial acelerar a sua fermentação e portanto diminuir o período de fermentação durante a preparação de um tal análogo a um lacticínio.

Numa concretização preferida, a invenção presente pode incluir o(s) passo(s) adicional(is) de se misturar o produto fermentado para se obter um produto macio e untuoso, e/ou de se misturar com ele um ou mais ingredientes adicionais tais como por exemplo pedaços de fruta(s) ou puré de fruta(s), vegetais, ervas, especiarias, açúcar e edulcorantes, sabores, corantes, estabilizadores e espessantes, sal, conservantes,...

Análogos a lacticínios

podem utilizar-se com vantagem em processos de fermentação de alimentos bactérias lácticas que tenham sido isoladas e adaptadas de acordo com os passos a) e b) do método presente e/ou uma cultura de bactérias incluindo essas bactérias lácticas, e por exemplo em processos de alimentos, e preferivelmente para se prepararem produtos alimentares isentos de produtos de origem animal, tal como um análogo a um lacticínio fermentado.

A expressão "*análogo a (um) lacticínio*", tal como se utilize neste documento, pretende significar um produto com origem vegetal e pode incluir um produto alimentar vegetal, um ingrediente alimentar vegetal, ou um alimento funcional vegetal. A expressão "*com origem vegetal*" indica que o produto apenas contém compostos derivados de plantas.

Os termos "*alimento*" ou "*produto alimentar*" são utilizados neste documento com um sentido geral, e incluem

alimentos para seres humanos bem como alimentos para animais (isto é, rações). Num aspecto preferido, o alimento destina-se a ser consumido por seres humanos. O alimento pode assumir a forma de uma solução ou a de um sólido, consoante a utilização e/ou o modo de aplicação e/ou o modo de administração a que se destina.

Podem obter-se exemplos não limitativos de "*produtos alimentares vegetais*" que se podem obter recorrendo a uma cultura de bactérias de acordo com a invenção presente, por exemplo, iogurtes e iogurtes líquidos; queijo, molho de queijo, nata (amarga), nata para bater, revestimento de nata batida, sorvetes, gelados e sobremesas, produtos de pastelaria, biscoitos, bolos e misturas para bolos, alimentos para consumo entre refeições, recheios de frutos, revestimento brilhante para bolos, recheios achocolatados para produtos de pastelaria, recheios para bolos, revestimentos brilhantes para bolos e donuts, cremes pasteleiros instantâneos, recheios para bolachas, creme pasteleiro pronto a usar, creme pasteleiro com menos calorias, bebidas nutricionais, bebidas de sumo de soja acidificadas, pós para confecção de bebidas, leite de soja enriquecido em cálcio, sobremesas congeladas com inclusão de ar. Numa concretização preferida, a invenção presente pode ser utilizada preferivelmente no que toca à produção de iogurtes e queijos baseados em soja, tais como bebida de iogurte de soja fermentado, iogurte de soja, iogurte líquido de soja, queijo de soja, nata de soja fermentada, sobremesas baseadas em soja e outras.

A expressão "*ingrediente alimentar vegetal*", tal como se utiliza neste documento, inclui uma formulação que é ou pode ser adicionada na preparação de outros produtos alimentares. O ingrediente alimentar pode assumir a forma de uma solução ou a de um sólido, consoante a utilização e/ou o modo de aplicação e/ou o modo de administração. Por exemplo uma nata de soja fermentada pode ser utilizada como ingrediente para a preparação de refeições prontas a comer; um iogurte de soja fermentado pode ser utilizado a título de ingrediente para um batido de leite de soja ou para um gelado de soja baseado em iogurte de soja.

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "*alimento funcional vegetal*" significa um alimento vegetal que é capaz de proporcionar não só um efeito nutricional e/ou a satisfação de um sabor, mas é também capaz de proporcionar mais um efeito benéfico para um consumidor. Os alimentos funcionais são portanto alimentos normais que tenham componentes ou ingredientes (tais como aqueles que são descritos neste documento) incorporados neles que emprestam ao alimento um benefício funcional específico, por exemplo medicinal ou fisiológico, para além de um efeito puramente nutricional. Alguns alimentos funcionais são nutracêuticos. Nestes, o termo "nutracêutico" significa um alimento que é capaz de proporcionar apenas um efeito nutricional e/ou a satisfação do paladar, mas que também é capaz de proporcionar um efeito terapêutico (ou outro efeito benéfico) para o consumidor. Os nutracêuticos atravessam as demarcações que tradicionalmente separam os

alimentos dos medicamentos. A título de exemplo pode citar-se uma preparação de *Bifidobacterium* isenta de produtos de origem animal, que se adiciona ao iogurte de soja ou a preparações de fruta para se preparar um alimento funcional vegetal.

Um tal alimento funcional vegetal pode ser um nutracêutico na medida em que contribui para um melhor estado de saúde do aparelho digestivo, diminuindo o colesterol, estimulando a imunidade, etc.

A invenção diz respeito a um análogo a um lacticínio que se possa obter pelo método presente. O análogo a lacticínio presente pode ser caracterizado como se segue.

Numa concretização, proporciona-se um análogo a um lacticínio possuindo um conteúdo diminuído em ácido fítico. Proporciona-se neste caso um análogo a um lacticínio no qual durante a fermentação foi degradado mais ácido fítico do que num análogo a um lacticínio que não se houvesse obtido por um método de acordo com a invenção. A invenção proporciona portanto um análogo a um lacticínio no qual a degradação do ácido fítico é mais pronunciada, e preferivelmente pelo menos 10 %, mais preferivelmente pelo menos 25 % e mesmo mais preferivelmente pelo menos 50 % mais pronunciada, do que num análogo a um lacticínio não obtido por um método de acordo com a invenção. Numa concretização preferida, proporciona-se um análogo a um

lacticínio no qual pelo menos 10 %, preferivelmente pelo menos 15 %, mais preferivelmente pelo menos 20 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 25 % mais ácido fítico seja degradado do que num análogo a um lacticínio que não seja obtido por um método de acordo com a invenção. Num exemplo, proporciona-se um análogo a um lacticínio no qual a degradação do ácido fítico é pelo menos 1,5 vezes, e preferivelmente pelo menos 2 vezes, ou mesmo pelo menos 3 vezes mais pronunciada do que a degradação do ácido fítico num análogo a um lacticínio que não seja obtido por um método de acordo com a invenção.

Noutra concretização proporciona-se um análogo a um lacticínio contendo uma menor quantidade de rafinose. Proporciona-se um análogo a um lacticínio no qual a quantidade de rafinose que foi degradada durante a fermentação é superior à de um análogo a um lacticínio que não tenha sido obtido por um método de acordo com a invenção. A invenção proporciona assim um análogo a um lacticínio no qual a degradação da rafinose é maior, e preferivelmente pelo menos 10 %, mais preferivelmente pelo menos 25 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 50 % maior, do que um análogo a um lacticínio que não seja obtido por um método de acordo com a invenção. Numa concretização preferida, proporciona-se um análogo a um lacticínio no qual pelo menos 25 %, preferivelmente pelo menos 50 %, mais preferivelmente pelo menos 75 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 100 % mais rafinose é degradada do que num análogo a um lacticínio não obtida por

um método de acordo com a invenção. Num exemplo, proporciona-se um análogo a um laticínio no qual a degradação da rafinose seja pelo menos 3 vezes, e preferivelmente pelo menos 5 vezes, ou mesmo pelo menos 7 vezes superior à degradação da rafinose num análogo a um laticínio não obtido por um método de acordo com a invenção.

Numa outra concretização ainda, proporciona-se um análogo a um laticínio com uma quantidade aumentada de formas aglucona de isoflavonas. Proporciona-se um análogo a um laticínio no qual mais formas glucósido das isoflavonas hajam sido transformadas durante a fermentação em formas de aglucona das isoflavonas do que num análogo a um laticínio não obtido por um método de acordo com a invenção. A invenção proporciona portanto um análogo a um laticínio no qual a transformação das formas glucósido das isoflavonas nas formas aglucona das isoflavonas é maior, e preferivelmente pelo menos 10 %, mais preferivelmente pelo menos 25 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 50 % maior, do que num análogo a um laticínio não obtido por um método de acordo com a invenção. Numa concretização preferida, proporciona-se um análogo a um laticínio em que pelo menos 5 %, preferivelmente pelo menos 10 %, mais preferivelmente pelo menos 20 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 25% mais transformação de formas glucósido de isoflavonas em formas aglucona de isoflavonas do que num análogo a um laticínio não obtido por um método de acordo com a invenção. Num exemplo, proporciona-se um

análogo a um lacticínio no qual a transformação de uma forma de glucósido numa forma de aglucona de isoflavonas seja pelo menos de 1,1 vezes, e preferivelmente pelo menos 1,2 vezes, ou mesmo pelo menos 1,3 vezes maior do que num análogo a um lacticínio não obtido por um método de acordo com a invenção.

Bactérias lácticas

Noutra concretização esta invenção diz respeito a bactérias lácticas que foram isoladas e adaptadas por crescimento num meio 100 % vegetal, respectivamente de isolamento e de adaptação.

Numa concretização preferida, a invenção proporciona bactérias lácticas tal como se descrevem neste documento demonstrando um aumento de actividade em um ou mais enzimas, em comparação com as bactérias lácticas que se não fizeram crescer em meios de isolamento e de adaptação 100 % vegetais. Preferivelmente o(s) enzima(s) referido é(são) seleccionado(s) de entre o conjunto que inclua a fosfatase alcalina, a fosfatase ácido, a α -quimotripsina, a α -galactosidase e a β -glucosidase.

Numa concretização preferida, a invenção proporciona bactérias lácticas tal como foram descritas neste documento, que demonstram um aumento de actividade de pelo menos 5 %, preferivelmente pelo menos 10 %, preferivelmente ainda pelo menos 15 %, mais preferivelmente

pelo menos 20 % e de preferência pelo menos 30 %, de um ou mais dos enzimas acima listados. A actividade enzimática pode evidenciar por exemplo aumentos de 15, 18, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40, 45 ou mesmo 50 %.

Numa concretização preferida, a invenção proporciona bactérias lácticas tal como se descreveram neste documento, que são capazes de aumentar a degradação do ácido fítico num um análogo a um lacticínio durante a sua fermentação. A invenção proporciona assim bactérias lácticas evidenciando um aumento da actividade da fosfatase, por exemplo da fosfatase ácida e/ou da fosfatase alcalina, com pelo menos 5 %, preferivelmente com pelo menos 10 %, preferivelmente com pelo menos 20 % e mais preferivelmente com pelo menos 30 %, de aumento. Por exemplo, são proporcionadas bactérias lácticas que são capazes de degradar pelo menos 1,5 vezes, e preferivelmente pelo menos 2 vezes, ou mesmo pelo menos 3 vezes mais ácido fítico do que as bactérias lácticas que não se fizeram crescer em meios de isolamento e de adaptação 100 % vegetais, de acordo com a invenção presente.

Noutra concretização preferida, a invenção proporciona bactérias lácticas tal como as descritas neste documento, que são capazes de aumentar a degradação da rafinose num análogo a um lacticínio durante a sua fermentação. A invenção proporciona deste modo bactérias lácticas que evidenciam um aumento da actividade da sua α -galactosidase de pelo menos 5 %, preferivelmente de pelo

menos 10 %, preferivelmente de pelo menos 20 % e mais preferivelmente de pelo menos 30 %. Por exemplo, são proporcionadas bactérias lácticas que são capazes de degradar menos 3 vezes, e preferivelmente pelo menos 5 vezes, ou mesmo pelo menos 7 vezes mais rafinose do que as bactérias lácticas que não se submeteram a um crescimento em meios de isolamento e de adaptação 100 % vegetais de acordo com a invenção presente.

Noutra concretização ainda, a invenção proporciona bactérias lácticas tal como as descritas neste documento, que são capazes de aumentar a transformação da(s) forma(s) (inactivas) de glucósido em forma(s) (activas) de aglucona, das isoflavonas presentes num análogo a um lacticínio, durante a sua fermentação. A invenção proporciona assim bactérias lácticas evidenciando um aumento da actividade da β -glucosidase, com pelo menos 5 %, preferivelmente com pelo menos 10 %, preferivelmente com pelo menos 20 % e mais preferivelmente com pelo menos 30 % de aumento dessa actividade. Por exemplo são proporcionadas bactérias lácticas que são capazes de transformar pelo menos 1,1 vezes, e preferivelmente pelo menos 1,2 vezes, ou mesmo pelo menos 1,3 vezes mais forma(s) de glucósido em forma(s) de aglucona de isoflavonas do que as bactérias lácticas que não se submeteram a meios de isolamento e de adaptação 100 % vegetais de acordo com a invenção presente.

Noutra concretização, a invenção também se relaciona com uma cultura de bactérias que inclua uma ou

mais bactérias lácticas que tenham sido isoladas e adaptadas por crescimento num meio 100 % vegetal, respectivamente de isolamento e de adaptação, e preferivelmente meios de isolamento e de adaptação tais como os que foram definidos neste documento. A invenção diz respeito além disto e preferivelmente a uma cultura bacteriana que inclua uma ou mais bactérias lácticas tais como as definidas acima.

Uma cultura bacteriana, ou as bactérias lácticas tais como as que foram definidas neste documento, são especialmente adequadas para serem utilizadas para melhorara a preparação de um análogo a um lacticínio. Pode melhorar-se a preparação no sentido de que se podem obter análogos a lacticínios com melhor qualidade, melhores propriedades nutricionais e organolépticas, tais como por exemplo, com mais sabor e/ou estabilidade do sabor, mais digeríveis, com valor nutricional aumentado, com uma maior disponibilidade de minerais tais como Ca, Fe, Mg, etc... A invenção diz por exemplo respeito à utilização de uma cultura bacteriana, ou de bactérias lácticas tais como as definidas neste documento, para a preparação de um análogo a um lacticínio que tenha uma quantidade menor de ácido fítico e/ou de rafinose, e/ou para se preparar um análogo a um lacticínio que tenha uma maior quantidade de forma(s) de aglucona das isoflavonas.

Para além disto, o processo de preparação do análogo a lacticínio também pode ser melhorado. Em

especial, a invenção também diz respeito à utilização de uma cultura bacteriana ou de bactérias lácticas tais como as definidas neste documento, para diminuir o período de fermentação durante a preparação de um análogo a um lacticínio. Preferivelmente utiliza-se uma cultura bacteriana, ou bactérias lácticas de acordo com a invenção, para diminuir o período de fermentação durante a preparação de um análogo a um lacticínio com pelo menos 10 %, preferivelmente com pelo menos 15 %, preferivelmente com pelo menos 20 % e mais preferivelmente com pelo menos 30 %, de diminuição. O período de fermentação pode por exemplo ser encurtado em 15, 18, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40, 45 ou mesmo em 50 % do tempo.

A invenção também diz respeito à utilização de bactérias lácticas ou de uma sua cultura tal como descrita neste documento para aumentar a degradação de ácido fítico num análogo a um lacticínio durante a sua fermentação, e/ou para aumentar a degradação da rafinose num análogo a um lacticínio durante a sua fermentação e/ou para aumentar a transformação de forma(s) de glucósido de isoflavonas na(s) sua(s) forma(s) de aglucona num análogo a um lacticínio durante a sua fermentação.

Os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar concretizações específicas da invenção e não limitam o seu âmbito.

Exemplos

Exemplo 1: meio de adaptação 100 % vegetal de acordo com a invenção presente

O exemplo presente ilustra um meio 100 % vegetal de acordo com a invenção presente. O médio é constituído por: 10 g de Peptona S (= produto digerido com papaína a partir de farinha de soja comercial, da Acumedia, 5 g de Extracto de Levedura, ultrafiltrado (Lisado de levedura de panificação ultrafiltrado) da Acumedia, 10 g de Frutose, 5 g de um tampão de fosfato, pH=7,2 (da Acumedia) 15 g de Agar-agar (bacteriológico), e água desmineralizada até perfazer 1 litro.

Para preparar um caldo, pode utilizar-se o meio acima descrito omitindo o agar-agar.

Exemplo 2: Caracterização de culturas bacterianas de acordo com a invenção presente

As bactérias lácticas que se utilizaram nos exemplos seguintes a título de matérias-primas foram quer isoladas de fontes naturais (por exemplo produtos alimentares) ou obtidos de uma colecção de culturas (BCCM - Gent, Bélgica).

2.1 Perfil de indução de enzimas

*** *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504)**

Numa primeira experiência fez-se crescer *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504) e manteve-se, dos seguintes modos: 1) crescimento e manutenção em meio S (VS); 2) crescimento e manutenção em meio MRS (VM); 3) crescimento e manutenção num meio S e re-plaqueamento uma vez num meio MRS (VSM); e 4) crescimento e manutenção num meio MRS e re-plaqueamento uma vez num meio S (VMS).

O meio S é um meio substancialmente vegetal de acordo com a invenção, incluindo peptona de soja, extracto de levedura, um tampão fosfato e uma fonte de açúcar. O meio MRS corresponda a um meio que inclui uma peptona de carne. As LAB foram re-plaqueadas duas vezes por semana em meio MRS ou em meio S levando-se para esta finalidade a cabo uma selecção das maiores colónias bacterianas (= selecção).

Os perfis de indução enzimática das bactérias que haviam crescido nos meios acima mencionados foram analisados de um modo semi-quantitativo. Utilizando um estojo comercial (BioMérieux) determinou-se a actividade enzimática por intermédio de um código de cores (0: ausência de actividade enzimática, a 5: actividade enzimática mais forte). As actividades enzimáticas foram medidas depois de uma incubação a 37° durante 4 horas.

Os resultados desta experiência indicam que ao adaptar *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504) a um meio substancialmente vegetal (meio S) de acordo com a invenção, determinados enzimas se encontravam significativamente induzidos ou incrementados, por exemplo a fosfatase alcalina, a fosfatase ácida, a β -glucosidase e a α -fucosidase. Estes enzimas não eram praticamente induzidos quando as bactérias eram adaptadas a um meio MRS. no entanto, quando as bactérias, adaptadas a um meio substancialmente vegetal, eram re-adaptadas a um meio MRS, havia uma transição no perfil enzimático: havia uma reversão do perfil de indução dos enzimas.

O exemplo seguinte ilustra a maior actividade de fosfatase no *L. casei* V (LMG P-23504) quando cresceu e foi mantido em meio S, em comparação com *L. casei* V (LMG P-23504) que cresceu e foi mantido em meio MRS. Inoculou-se leite de soja + 2 % de glucose adicionada com *L. casei* V a 1×10^7 /mL, o qual havia sido mantido em meio S, ou que havia sido mantido em meio MRS, e fermentaram-se os leites de soja inoculados a 30°C até chegarem a um pH de 4,5.

Mediu-se o conteúdo em ácido fítico no leite de soja antes e depois da sua fermentação. Apresentam-se os resultados na **Tabela 1**.

Tabela 1

amostra	% de ácido fítico, peso	% de diminuição
antes da fermentação	0,15	
Fermentado com <i>L. casei</i> V (MRS)	0,09	40
Fermentado com <i>L. casei</i> V (S)	< 0,05	> 67

A **Tabela 1** demonstra que o *L. casei* V (LMG P-23504) que havia sido mantido em meio S induz uma maior decomposição do factor anti-nutricional, ácido fítico. Isto é uma vantagem nutricional para o consumidor. A quantidade de ácido fítico no análogo a lacticínio é mais do que 67 % inferior quando se recorre a *L. casei* V que havia sido mantido em meio S para a fermentação, em comparação com uma diminuição para um valor também diminuído mas para 40 % quando se utiliza *L. casei* V que havia sido mantido em meio MRS. Este exemplo também indica que existe mais do que 27 % a mais de ácido fítico degradado no análogo a lacticínio preparado com o *L. casei* V que havia sido mantido no meio S do que no análogo a um lacticínio preparado com o *L. casei* V que havia sido mantido no meio MRS. O *L. casei* V que havia sido mantido no meio S é capaz de aumentar a degradação do ácido fítico de um análogo a um lacticínio, de um factor de pelo menos 1,675.

*** *Lactococcus lactis* LMG 8522**

Noutra experiência adaptou-se durante vários meses o *Lactococcus lactis* LMG 8522, quer a um meio S, quer a um meio MRS. Passados diversos meses de cultura, determinou-se a actividade enzimática utilizando o estojo, tal como se definiu acima.

Os resultados obtidos indicavam que adaptando-se o *Lactococcus lactis* sobre um meio substancialmente vegetal de acordo com a invenção, determinados enzimas eram induzidos, por exemplo a fosfatase alcalina e a α -quimotripsina. Estes enzimas não eram induzidos quando se adaptava esta bactéria láctica a um meio MRS.

*** *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669)**

Numa outra experiência ainda, adaptou-se o *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) durante diversos meses, quer a um meio S, quer a um meio MRS. Passados diversos meses de cultura, actividade enzimática utilizando o estojo, tal como se definiu acima.

Os resultados obtidos indicavam que adaptando-se o *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) sobre um meio substancialmente vegetal de acordo com a invenção, determinados enzimas eram induzidos, por exemplo a fosfatase alcalina e a α -quimotripsina. Estes enzimas não eram induzidos quando se adaptava esta bactéria láctica a um meio MRS.

O exemplo seguinte ilustra o aumento da actividade de fosfatase do *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669), quando mantido num meio S, em comparação ao *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) mantido num meio MRS. Inoculou-se leite de soja + 2 % de glucose adicionada com 1×10^7 / mL de *Lactococcus lactis* S que havia sido mantido em meio S, ou que havia sido mantido em meio MRS, e fermentaram-se os leites inoculados a 30°C até um pH de 4,5.

Mediu-se o conteúdo em ácido fítico no leite de soja antes, e nas amostras fermentadas depois da fermentação. Apresentam-se os resultados na **Tabela 2**.

Tabela 2

amostra	% de ácido fítico, em peso	% de diminuição
antes da fermentação	0,15	
Fermentado com <i>L. lactis</i> (MRS)	0,14	7
Fermentado com <i>L. lactis</i> (S)	< 0,11	27

A **Tabela 2** demonstra que o *L. lactis* S (LMG P-23669) que havia sido mantido num meio S induz uma maior decomposição do factor antinutricional ácido fítico. A quantidade de ácido fítico no análogo a um laticínio foi diminuída para 27 % quando se utilizou *L. lactis* S que

havia sido mantido num meio S, em comparação com uma diminuição de 7 % quando se utilizou o *L. lactis* S que havia sido mantido num meio MRS. Este exemplo indica também que há cerca de mais 20 % de ácido fítico degradado num análogo a um lacticínio preparado com *L. lactis* S previamente mantido num meio S do que num análogo a um lacticínio preparado com um *L. lactis* S que foi previamente mantido num meio MRS. O *L. lactis* S que foi mantido em meio S é capaz de aumentar a degradação do ácido fítico num análogo a um lacticínio, de um factor de pelo menos 3,86.

*** *Bifidobacterium infantis* (LMG P-24096)**

Numa outra experiência ainda, adaptou-se o *Bifidobacterium infantis* LMG P-24096 durante diversos meses, quer a um meio S, quer a um meio MRS. Passados diversos meses de cultura, actividade enzimática utilizando o estojo, tal como se definiu acima.

Os resultados obtidos indicavam que adaptando-se o *Bifidobacterium infantis* LMG P-24096 sobre um meio substancialmente vegetal de acordo com a invenção, determinados enzimas eram induzidos, por exemplo a α -galactosidase e a β -glucosidase. Estes enzimas não eram induzidos quando se adaptava esta bactéria láctica a um meio MRS.

O exemplo seguinte ilustra por exemplo o aumento da actividade da α -galactosidase e da β -glucosidase no

Bifidobacterium infantis (LMG P-24096), quando é mantido num meio S, em comparação com as observadas no *Bifidobacterium infantis* (LMG P-24096) mantido num meio MRS.

Inoculou-se leite de soja + 2,5 % de rafinose com 1×10^7 /mL de *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S, ou que havia sido mantido sobre meio MRS, e fermentou-se o leite de soja inoculado a 37°C sob condições anaeróbicas.

Durante a fermentação mediu-se o conteúdo em rafinose antes e ao fim de 6 horas de fermentação pelo *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S, e pelo que havia sido mantido sobre meio MRS. A cultura de *B. infantis* adaptada ao meio S evidenciava uma decomposição mais elevada da rafinose devido a um aumento da sua actividade de α -galactosidase: 6 horas depois do início da fermentação, o *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S havia lisado 6 % da rafinose, em comparação com o *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio MRS e que apenas havia lisado 0,8 % da rafinose. Este exemplo indica que havia mais cerca de 5,2 % de rafinose degradada no análogo a um lacticínio preparado com o *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S do que num análogo a um lacticínio preparado com *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio MRS. Este exemplo também indica que o *B. infantis* que havia sido mantido sobre um meio S é capaz de aumentar a degradação da rafinose de um análogo a um lacticínio de um factor de pelo menos 7,5.

Durante a fermentação também se mediu o conteúdo em isoflavonas, antes e passadas 6 horas de fermentação por *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S, ou que havia sido mantido sobre meio MRS. A cultura de *B. infantis* adaptada ao meio S evidenciava uma maior transformação da forma biologicamente inactiva de glucósido das isoflavonas à sua forma biologicamente activa de aglucona, devido a uma maior actividade da β -glucosidase: 6 horas após o início da fermentação, o *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S tinha transformado 98 % dos glucósidos daidzina e genistina nas agluconas daidzeína e genisteína, enquanto que o *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio MRS apenas tinha transformado 89 %. Este exemplo indica que existem menos cerca de 9 % de formas de glucósido das isoflavonas que foram transformadas num análogo a um lacticínio preparado com *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio S do que num análogo a um lacticínio preparado com *B. infantis* que havia sido mantido sobre meio MRS. Este exemplo também indica que o *B. infantis* que foi mantido sobre meio S é capaz de aumentar a transformação das formas glucósido (inactivas) das isoflavonas nas respectivas formas glucona (activas), com um factor de pelo menos 1,1.

As actividades das enzimas induzidas podem ser correlacionadas com os melhoramentos no que toca à qualidade e às propriedades organolépticas dos análogos a lacticínios produzidos com as LAB.

Por exemplo, os enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida podem desempenhar um papel na degradação do ácido fítico, que é um factor anti-nutricional presente por exemplo na soja. O ácido fítico liga-se a minerais tais como Ca, Fe e Mg e portanto diminui a sua biodisponibilidade. A degradação do ácido fítico aumenta portanto a disponibilidade desses minerais.

Outro exemplo é o da β -glucosidase. Este enzima transforma glucósidos numa unidade de glucose e numa aglucona. Numa matriz de soja a β -glucosidase transformará as formas biologicamente inactivas de glucósidos das isoflavonas nas espécies de aglucona correspondentes que são biologicamente activas. Um aumento de actividade de β -glucosidase aumenta a biodisponibilidade das isoflavonas que estejam presentes na soja sob a forma de glucósidos.

Um outro exemplo ainda é o da actividade da α -galactosidase. Este enzima é capaz de quebrar a estrutura da rafinose e da estaquiose. Estes são ambos açúcares não digeríveis que se encontram tipicamente presentes no leite de soja e que não podem ser digeridos pelos seres humanos. Isto pode originar a formação de gases, não desejável, no aparelho gastrointestinal. Um aumento da quebra destes açúcares flatulentos no leite de soja aumenta a sua digestibilidade para os consumidores.

Um outro exemplo ainda é a α -quimotripsina. Este enzima proteolítico tem uma função na fase inicial da

digestão, na formação de péptidos bioactivos, na formação de aromas, na formação de estrutura.

*** Conclusão**

Em suma, estes resultados indicam que as bactérias lácticas que foram adaptadas a um meio substancialmente vegetal sofrem alterações metabólicas significativas. Estas alterações metabólicas da estirpe são no entanto invertidas quando a estirpe é re-adaptada a um meio contendo compostos com origem animal. Os enzimas induzidos desempenham um papel na qualidade, na melhoria nutricional e organoléptica dos análogos a lacticínios produzidos com as LAB presentes.

2.2 Impressões digitais do ADN recorrendo a análise rápida RAPD

Levou-se a cabo uma análise RAPD utilizando ADN do *L. casei* T (LMG P-23506) adaptado a um meio S e o *L. casei* T adaptado a um meio MRS. Veja-se no ponto 2.1 acima uma definição dos meios S e MRS.

Os resultados desta análise revelaram que as culturas de bactérias não evidenciavam diferenças nas suas impressões digitais de ADN para os catalisadores (*primers*) seleccionados. Os resultados indicaram também que adaptando as bactérias a um meio S em comparação com um meio MRS não induzia quaisquer diferenças ao nível do seu ADN (mutações)

para os catalisadores seleccionados, mas tal como se detalhou no ponto 2.1 acima, originava diferenças na sua actividade enzimática e nos perfis de indução, e portanto diferenças de adaptação.

2.3 Perfis de proteína utilizando SDS-page

Levou-se a cabo uma análise por SDS-PAGE a uma dimensão sobre *Lactobacillus casei* LMG 6904, e sobre *L. casei* T (LMG P-23506) adaptado a um meio S e sobre *L. casei* T adaptado a um meio MRS.

O perfil proteico do *L. casei* T (LMG P-23506) adaptado ao meio S era diferente do perfil proteico das duas outras culturas bacterianas, apontando para uma diferença da actividade enzimática entre as culturas bacterianas estudadas, devido à adaptação.

Na **FIG. 2** ilustram-se as diferenças de expressão proteica. As setas apontam para diferenças nas expressões específicas das proteínas. Tal como se evidencia por comparação da **FIG. 2A** que ilustra o perfil de SDS PAGE do *L. casei* T sobre meio S com a **FIG. 2B** mostrando o perfil de SDS PAGE do *L. casei* T sobre meio MRS, as diferenças entre as expressões específicas das proteínas ocorrem por adaptação ao respectivo meio de adaptação. Tal como se evidencia por comparação da **FIG. 2A** aonde se mostra o perfil de SDS PAGE do *L. casei* T sobre meio S com a **FIG. 2C** aonde se mostra o perfil de SDS PAGE do *L. casei* 6904, a

estirpe de *L. casei* T adaptada tornou-se diferente da estirpe de que deriva *L. casei* 6904 que se obteve a partir da colecção de culturas BCCM.

Noutro exemplo, levou-se a cabo uma análise bidimensional por SDS-page na qual as proteínas foram separadas de acordo com as suas dimensões e o seu ponto iso-eléctrico (focagem iso-eléctrica). A **Figura 4** ilustra os resultados de uma tal análise. Os resultados desta análise 2D para o *L. casei* V (LMG-23504) que cresceu num meio S (**FIG. 4A**) ou num meio MRS (**FIG. 4B**) demonstram a diferença entre as duas amostras no que toca à expressão proteica. Na **FIG. 4** as setas indicam as diferenças entre ambos os geles.

2.4 Análise do conteúdo celular total (FTIV-UATR) (Perkin Elmer)

Utilizando Espectroscopia de Infravermelho, estudou-se o conteúdo total das células de quatro culturas bacterianas. O conteúdo celular é considerado como sendo uma característica para uma determinada estirpe, em condições bem definidas de crescimento. Recorrendo a bases de dados, é possível identificar bactérias utilizando espectros de IV.

Nesta experiência **fizeram-se culturas de** *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504), *L. casei* T (LMG P-23506), *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) e de *Lactococcus*

lactis LMG 9452 e mantiveram-se sob diversas condições diferentes, incluindo: 1) adaptados ao meio S; 2) adaptados ao meio MRS; 3) adaptados ao meio S e re-adaptados ao meio MRS; e 4) adaptados ao meio MRS e re-adaptados ao meio S.

Os resultados desta experiência mostraram diferenças significativas entre as bactérias que tinham sido adaptadas ao meio S e as bactérias que tinham sido adaptadas ao meio MRS. Os resultados são expressos em % de semelhança (com um desvio padrão ≤ 1 %). A diferença entre *Lactobacillus casei* V (LMG-23504) adaptado ao meio S e adaptado ao meio MRS era de 3,5 %. Quando o *L. casei* V adaptado ao S (VS) foi re-adaptado ao MRS (VSM), a diferença baixava para 1,4 %. Quando o *L. casei* V adaptado ao MRS (VM) era re-adaptado ao meio S (VMS), a diferença era de 3 %. A **FIG. 3** mostra uma transição gradual de um espectro de IV típico quando se comparam VS, VSM, VMS e VM.

A diferença entre *L. casei* T (LMG P-23506) adaptado ao meio S e adaptado ao meio MRS era de 3,3 %.

A diferença entre *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) adaptado meio S e adaptado ao MRS era de 4,3 %.

A diferença entre *Lactococcus lactis* LMG 9452 adaptado ao meio S e adaptado ao MRS era de 3,1 %.

Exemplo 3: Estudos de fermentação

Os exemplos seguintes ilustram a utilização de uma cultura de bactérias lácticas que foram isoladas, adaptadas e submetidas a uma cultura de acordo com a invenção presente que permite melhorar a preparação de um análogo a um lacticínio, e em especial melhorar (acelerar) a sua fermentação e portanto diminuir o período de fermentação durante a preparação de um análogo a um lacticínio.

*** *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669)**

Prepararam-se cultura bacterianas de *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) de acordo com a invenção presente preparando culturas da estirpe referida num meio S ou num meio MRS, ambos definidos no exemplo 2. Utilizaram-se então quantidades semelhantes de inóculo, comparáveis ao nº 5 da escala de McFarland, destas culturas bacterianas, para a fermentação de uma composição baseada em soja e constituída por 85 %, em peso, de leite de soja, 2 %, em peso, de frutose e 13 %, em peso, de água. Determinou-se então o período de tempo necessário para se obter um valor de pH de 4,6. Considera-se este valor de pH como sendo um valor "seguro" para suprimir o desenvolvimento de patogénicos. Tal como se ilustra na **FIG. 1**, o período de tempo necessário para se atingir este valor de pH utilizando uma cultura bacteriana de *Lactococcus lactis* S que cresceu em meio S era mais curto em cerca de 60 minutos do que quando se utilizava uma cultura bacteriana de *Lactococcus lactis* S que havia crescido em meio MRS. Os resultados desta

experiência indicavam portanto que as LAB que se faziam crescer num meio substancialmente vegetal de acordo com a invenção permitiam diminuir os períodos necessários para a preparação (fermentação) de análogos a lacticínios. Neste exemplo o período de tempo necessário para se atingir um valor de pH que é considerado como sendo "seguro" para suprimir o desenvolvimento de patogénicos é atingido cerca de 1,2 vezes mais depressa quando se utiliza uma estirpe de *Lactococcus* que foi isolada, adaptada e submetida a cultura sobre um meio 100 % vegetal. Este exemplo demonstra a vantagem tecnológica da adaptação da estirpe das bactérias ao meio S. O período de fermentação durante a preparação do referido análogo a lacticínio pode ser diminuído em cerca de 20 %.

*** *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669)**

Prepararam-se culturas bacterianas de *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) de acordo com a invenção presente levando a cabo a cultura da estirpe referida num meio S ou num meio MRS, tal como se definiram no exemplo 2.

Inoculou-se leite de soja com 2 % de frutose contendo 1×10^7 /mL de *Lactococcus lactis* adaptado ao meio S ou ao MRS, e fermentou-se a 30°C até se atingir o pH crítico de 4,6. A **Figura 5** mostra que o *L. lactis* S adaptado ao meio S atingia o pH de 4,6 uma hora mais cedo do que as bactérias que haviam sido feitas crescer adicionalmente em meio MRS. Neste exemplo o período para se

atingir um determinado valor de pH que é considerado como sendo "seguro" para suprimir o desenvolvimento de patogénicos é atingido cerca de 1,2 vezes mais depressa quando se recorre a uma estirpe de *Lactococcus* que tenha sido isolada, adaptada e submetida a uma cultura num meio 100 % vegetal. O período de fermentação durante a preparação do referido análogo a um lacticínio pode ser diminuído em cerca de 20 %. Este exemplo demonstra a vantagem tecnológica da adaptação das estirpes de bactérias ao meio S.

*** *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504)**

Prepararam-se culturas bacterianas de *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504) de acordo com a invenção presente fazendo culturas da estirpe referida sobre um meio S ou sobre um meio MRS, tal como se definiram no exemplo 2.

Inoculou-se leite de soja contendo 2 % de glucose adicionada, com 5×10^7 /mL bactérias *L. casei* V que haviam crescido sobre meio S ou sobre meio MRS. Levou-se a cabo a fermentação a 37°C até se atingir o valor limite de segurança do pH, de 4,6. A **Figura 6** mostra que o *L. casei* V que estava adaptado ao meio S já tinha atingido o pH pretendido de 4,6 ao fim de 2,5 horas de fermentação, enquanto o *L. casei* V que havia crescido sobre MRS atingiu este valor de pH após 6,5 horas de fermentação. O período necessário para se atingir este valor de pH utilizando uma

cultura bacteriana de *Lactobacillus casei* V que havia sofrido cultura sobre meio S foi de cerca de 4 horas mais curta do que quando se utilizou uma cultura bacteriana de *Lactobacillus casei* V mas cuja cultura havia sido feita sobre um meio MRS. Deste modo, o período de tempo necessário para se atingir um valor de pH que é considerado como "seguro" para suprimir o desenvolvimento de patogénicos é menos de metade, sendo a cultura deste exemplo 2,6 vezes mais rápida quando se utiliza uma estirpe de *Lactobacillus* que foi isolada, adaptada e cultivada num meio 100 % vegetal. O período de fermentação durante a preparação do análogo a lacticínio referido pode sofrer uma diminuição superior a 100 %. Esse exemplo demonstra qual a vantagem tecnológica da adaptação das estirpes de bactérias ao meio S.

*** *Bifidobacterium infantis* (LMG P-24096)**

Prepararam-se culturas bacterianas de *Bifidobacterium infantis* (LMG P-24096) de acordo com a invenção presente submetendo esta estirpe a uma cultura num meio S ou num meio MRS, tal como se definiram no exemplo 2.

Inoculou-se leite de soja com 2,5 % de rafinose com 1×10^7 /mL de *B. infantis* adaptado ao meio S ou ao meio MRS, e fermentou-se a 37° sob condições anaeróbicas. A **Figura 7** mostra que o *B. infantis* adaptado ao meio S cresce mais depressa do que o da cultura adaptada ao meio MRS.

Após 6 horas parou-se a fermentação porque o *B. infantis* se inibe a ele próprio devido ao decréscimo do pH.

Durante a fermentação, o *B. infantis* inibe-se a ele próprio devido a um valor decrescente do pH e á formação de ácido láctico e de ácido acético. Para se examinar a capacidade de formação de ácido sem o efeito inibidor do pH decrescente, repetiu-se o teste de fermentação descrito acima mas manteve-se o pH constante a 5,9 por adição de NaOH 1 M.

A **Figura 8** demonstra que o *B. infantis* que estava adaptado ao meio S chegou ao pH de 5,9 cerca de 3,5 horas mais cedo do que o *B. infantis* que estava adaptado ao meio MRS, e que consumia mais NaOH durante a fermentação. Isto demonstra a maior velocidade de crescimento e a maior capacidade de formação de ácido do *B. infantis*, quando se encontra adaptado ao meio S. Assim, o período de tempo necessário para se atingir um valor de pH de 5,9 é mais do que duas vezes mais rápido, e neste exemplo é 2,2 vezes mais rápido do que quando se utiliza uma estirpe de *B. infantis* que tenha sido isolada, adaptada e sofrido cultura num meio 100 % vegetal. Este exemplo demonstra a vantagem tecnológica de se fazer a adaptação da estirpe das bactérias ao meio S.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para se preparar um análogo a um lacticínio, que inclua os passos de:

- a) se isolar uma ou mais bactérias lácticas a partir do seu ambiente natural ou a partir de uma colecção de culturas, num meio de isolamento adequado isento de produtos de origem animal;
- b) se adaptarem as bactérias isoladas referidas cultivando essas bactérias num meio de adaptação adequado isento de produtos de origem animal;
- c) se cultivarem as bactérias adaptadas referidas num meio adequado isento de produtos de origem animal, e
- d) se preparar um análogo de um lacticínio adicionando ao referido análogo de um produto lácteo, a título de matéria-prima, uma quantidade adequada das bactérias obtidas no passo c).

em que os passos a) a d) sejam levados a cabo em condições de isenção da presença de produtos de origem animal.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o passo d) inclua fermentar-se um análogo a um lacticínio pela adição ao referido análogo a um lacticínio utilizado como matéria-prima, de uma quantidade adequada de bactérias obtidas no passo c).

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou a 2, no qual os meios de cultura referidos para isolamento, adaptação e cultura sejam meios 100 % vegetais.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, no qual os meios de cultura referidos para isolamento, adaptação e cultura contenham entre 0,1 e 10 %, em peso, de uma peptona vegetal, preferivelmente uma proteína de soja digerida com papaína.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 to 4, em que os meios referidos incluam também entre 0,1 e 10 %, em peso, de uma componente de leveduras, preferivelmente um extracto de células de levedura.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que os meios referidos contenham também entre 0,1 e 10 %, em peso, de um agente tamponizante, preferivelmente um tampão fosfato, que mantenha o meio referido a valores de pH de entre 5 e 8.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que os meios referidos contenham

também entre 0,1 e 10%, em peso, de um hidrato de carbono fermentescível com origem vegetal.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que as bactérias lácticas referidas sejam seleccionadas de entre os géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que as bactérias lácticas referidas sejam seleccionadas de entre o conjunto constituído por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, ou *Lactococcus lactis*, ou *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*.

10. Método de acordo com a reivindicação 8 ou a 9, em que as bactérias lácticas referidas incluam *Lactobacillus casei* V (LMG P-23504), *Lactobacillus casei* W (LMG P-23505), *Lactobacillus casei* T (LMG P-23506), *Lactococcus lactis* S (LMG P-23669) *Bifidobacterium infantis* S (LMG P-24096) e/ou *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (LMG P-24095).

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o análogo a laticínio referido seja um produto alimentar vegetal, um ingrediente alimentar vegetal, ou um alimento funcional vegetal.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o análogo a laticínio referido seja um derivado da

soja.

13. Método com qualquer uma das reivindicações 2 a 12, em que o período de fermentação durante a preparação do análogo a lacticínio referido seja menor.

14. Um análogo a um lacticínio obtido pelo método de qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

15. Análogo a um lacticínio de acordo com a reivindicação 14, com uma menor quantidade de ácido fítico.

16. Análogo a um lacticínio de acordo com a reivindicação 14 ou a 15, com uma menor quantidade de rafinose.

17. Análogo a um lacticínio de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 e 16, com uma maior quantidade de formas aglucona de isoflavonas.

18. Uma cultura bacteriana que inclua uma ou mais bactérias lácticas que tenham sido isoladas e adaptadas por crescimento em meios 100 % vegetais, respectivamente de isolamento e de adaptação.

19. Bactérias lácticas que tenham sido isoladas e adaptadas por crescimento, respectivamente, em meios de isolamento e de adaptação que sejam 100 % vegetais.

20. Bactérias lácticas de acordo com a

reivindicação 19, evidenciando um aumento de actividade de um ou mais enzimas quando comparadas com bactérias lácticas que não tenham sido cultivadas em meios de isolamento e de adaptação 100 % vegetais.

21. Bactérias lácticas de acordo com a reivindicação 20, em que o(s) enzima(s) referido(s) seja(m) seleccionados de entre o conjunto constituído por fosfatase ácida, fosfatase alcalina, α -quimotripsina, α -galactosidase e β -glucosidase.

22. Uma cultura bacteriana de acordo com a reivindicação 18 ou bactérias lácticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21, em que o meio vegetal referido seja tal como definido em com qualquer uma das reivindicações 3-7.

23. Uma cultura bacteriana de acordo com a reivindicação 18 ou bactérias lácticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21, em que as bactérias lácticas referidas sejam tal como se definiram em qualquer uma das reivindicações 8-10.

24. A utilização de uma cultura bacteriana de acordo com qualquer uma das reivindicações 18, 22 ou 23 ou de bactérias lácticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21, para melhorar a preparação de um análogo a um lacticínio.

25. A utilização de uma cultura bacteriana de

acordo com qualquer uma das reivindicações 18, 22 ou 23 ou de bactérias lácticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21, para diminuir o período de fermentação durante a preparação de um análogo a um lacticínio.

Lisboa, 19 de Novembro de 2008

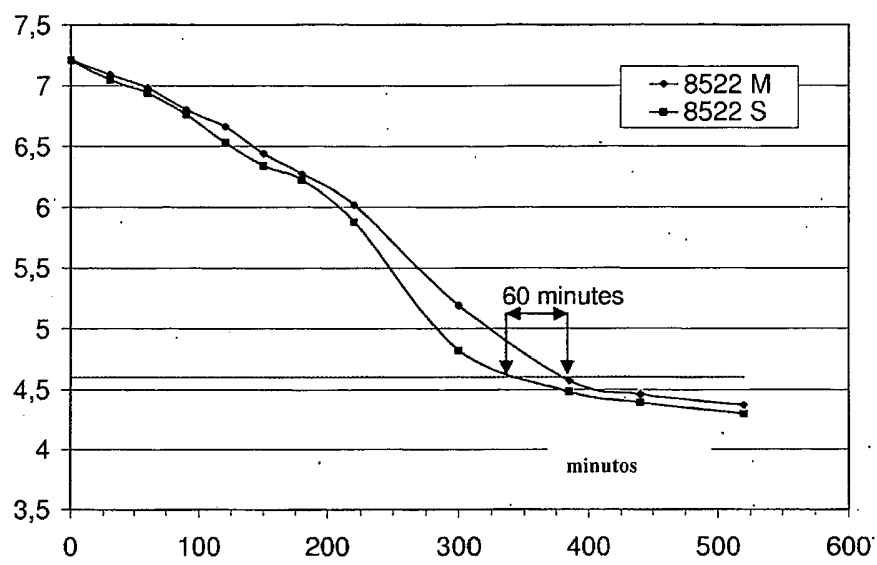


FIG. 1

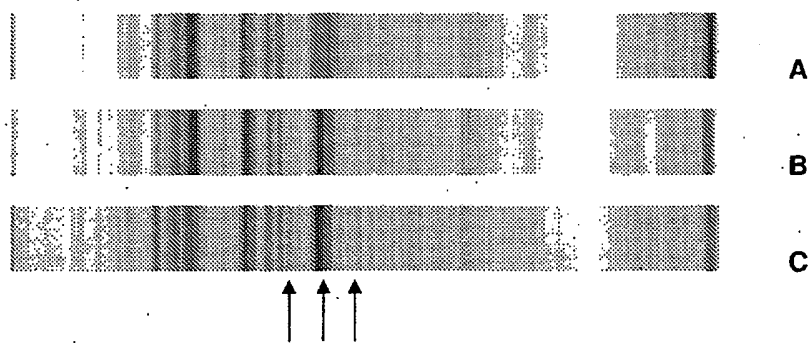


FIG. 2

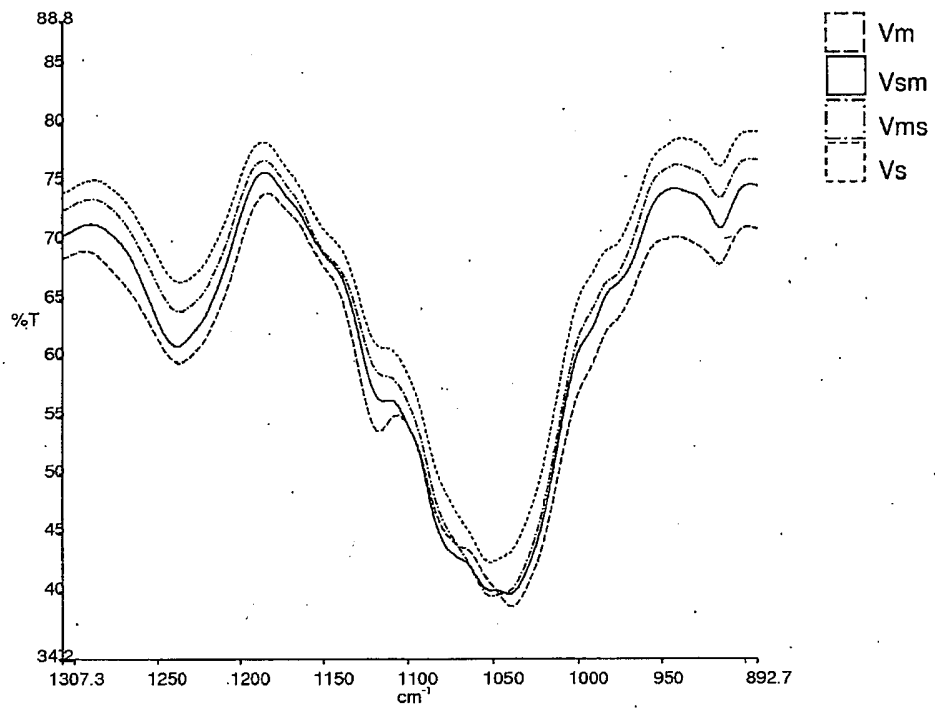


FIG. 3

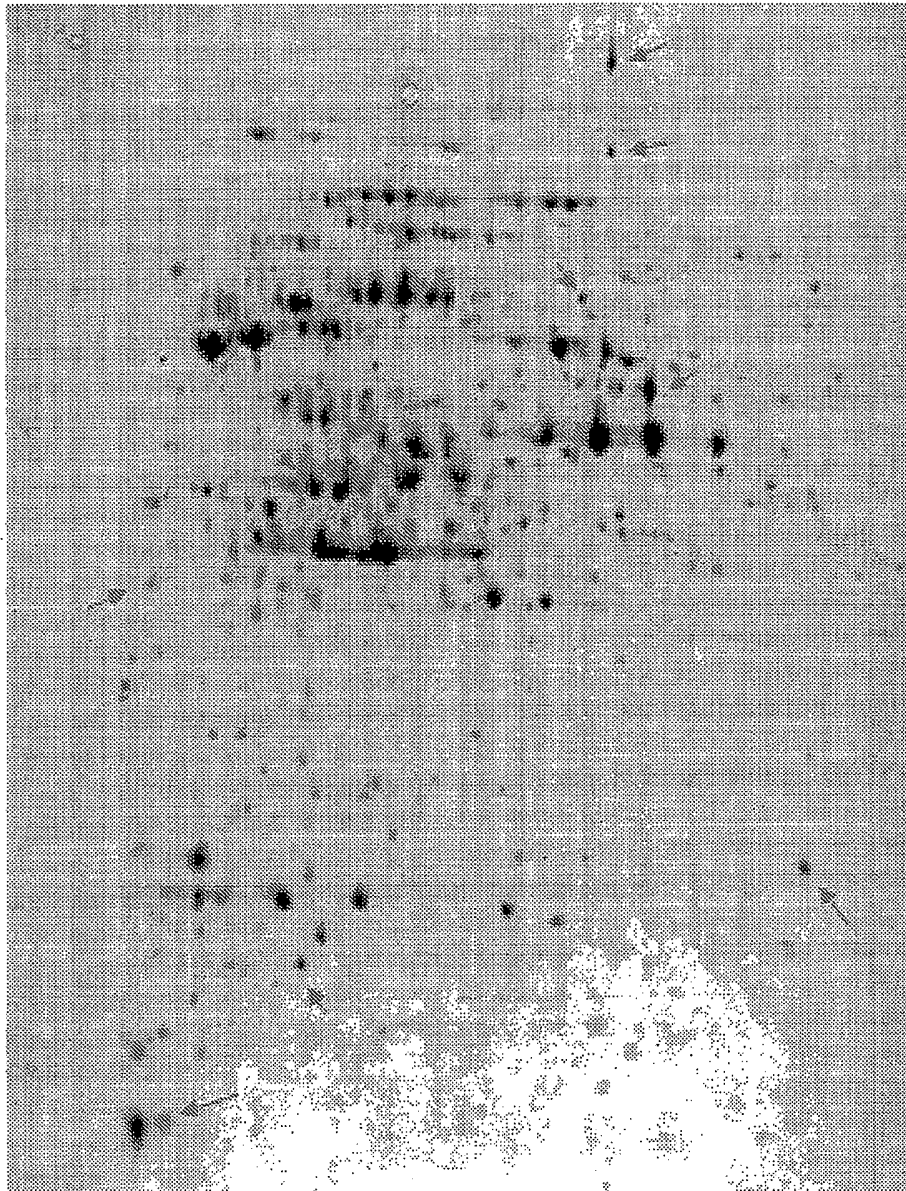


FIG. 4A

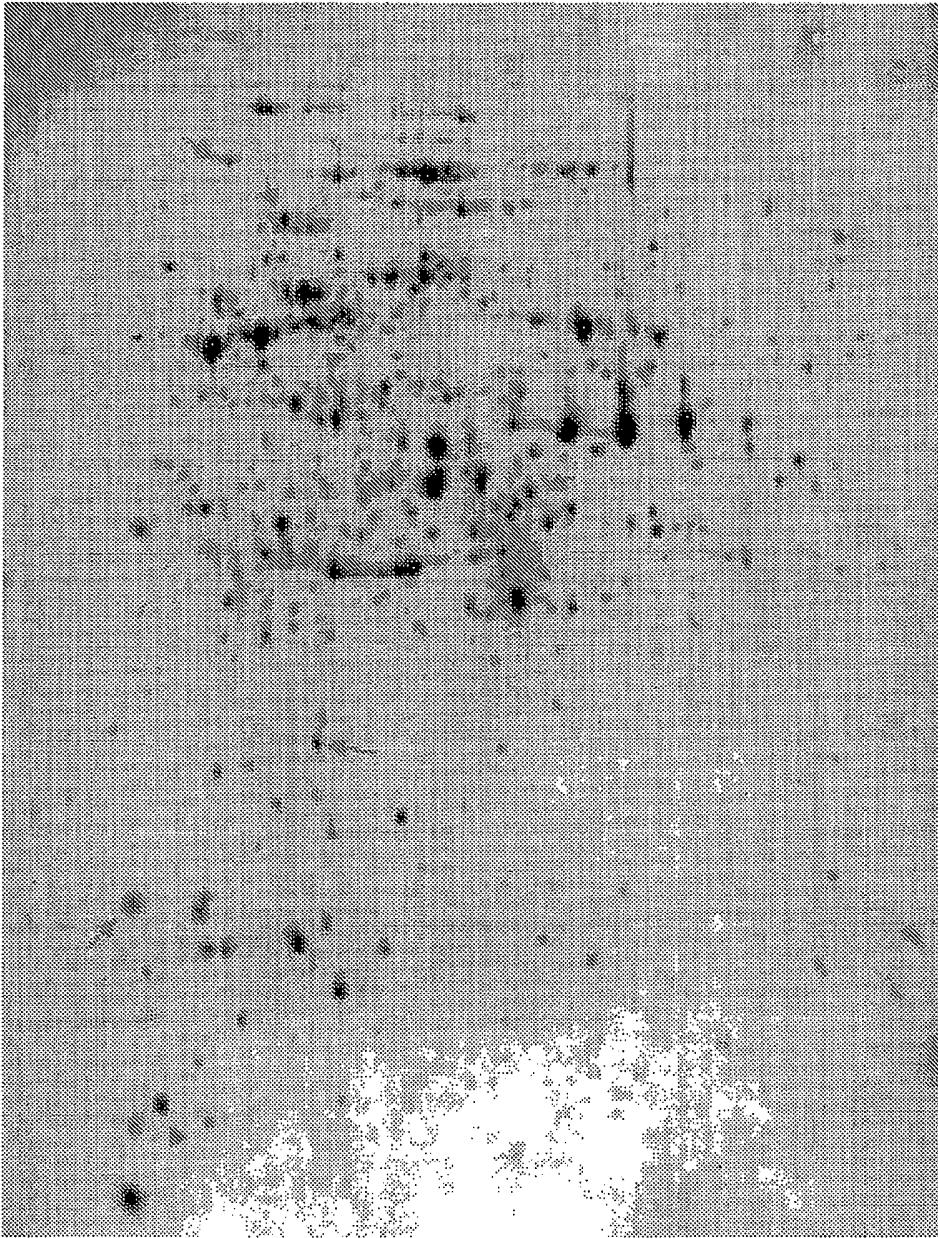


FIG. 4B

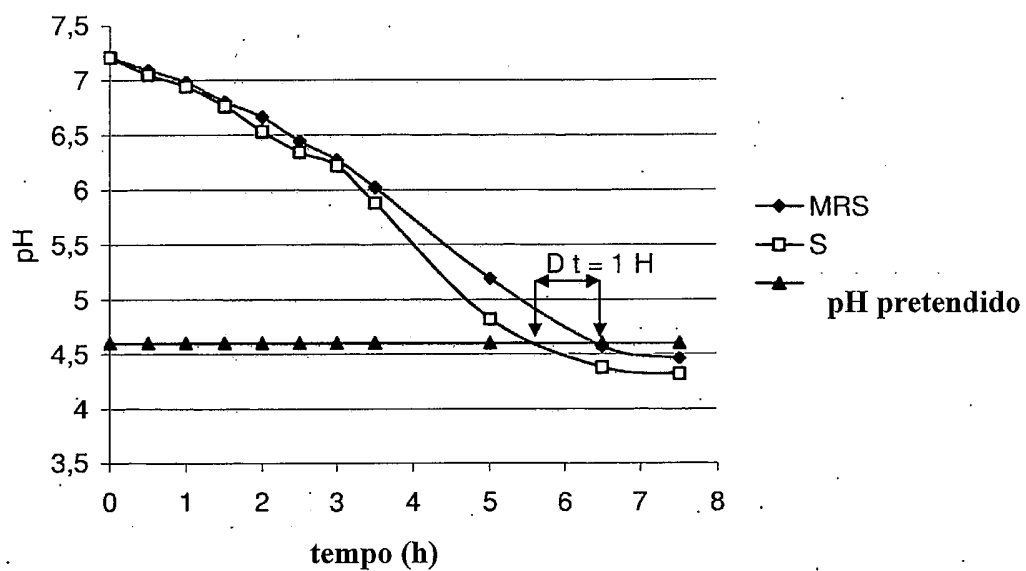


FIG. 5

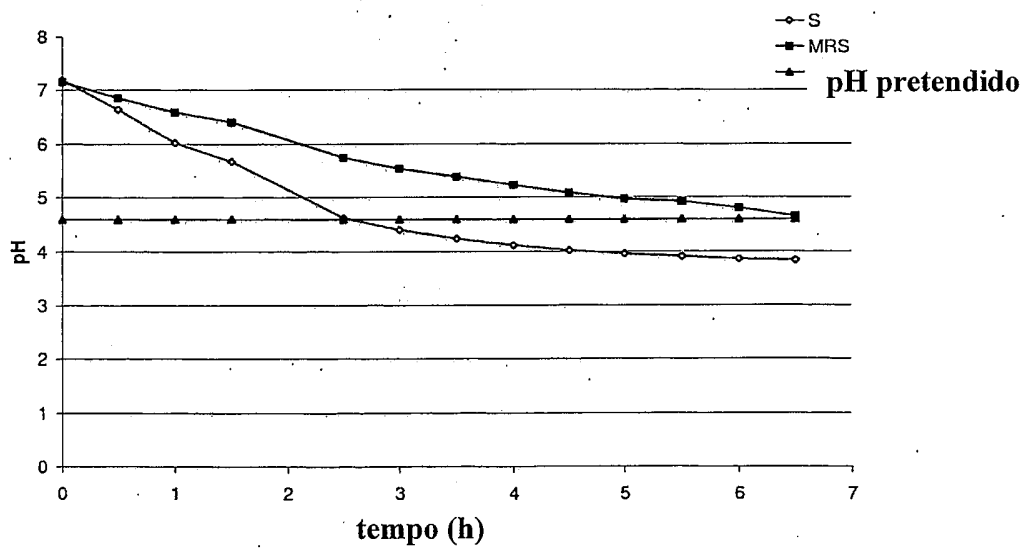


FIG.6

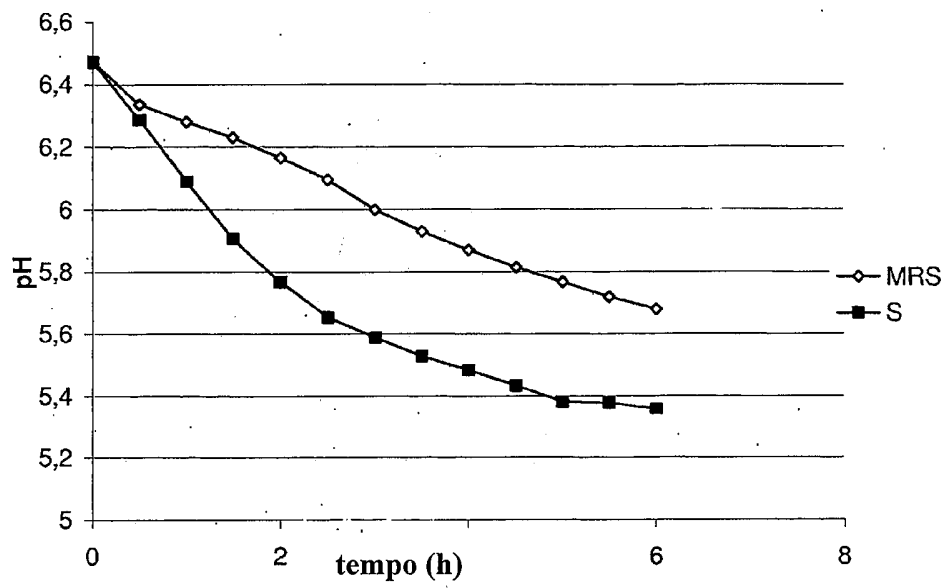


FIG. 7

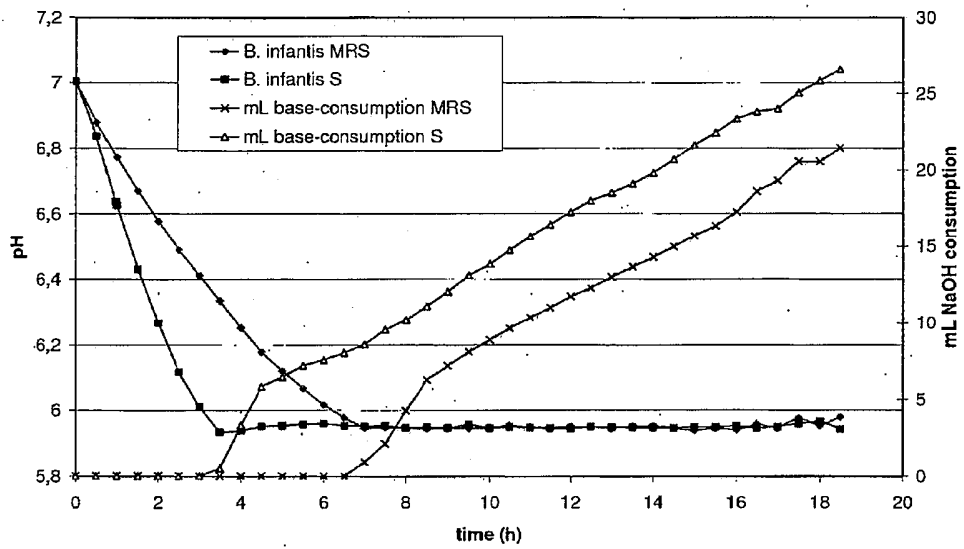


FIG. 8