



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1012225 E**

(51) Classificação Internacional:

C12C 5/00 (2006.01) **C12C 11/00** (2006.01)
C12G 1/02 (2006.01) **C12N 9/36** (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1998.08.05**

(30) Prioridade(s): **1997.08.05 US 0906266**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.06.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.17**
001/2007

(73) Titular(es):

STATE OF OREGON, THE ACT. BY OREGON
T.O.S.H.E.B.U.O.
CORVALLIS OREGON 97331-2140

US

(72) Inventor(es):

MARK, A. DAESCHEL
LINDA, D BRUSLIND

US

US

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIMINUIR A DEGRADAÇÃO DA CERVEJA**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIMINUIR A DEGRADAÇÃO DA
CERVEJA"

O crescimento de bactérias de degradação em preparações de leveduras e em produtos de fermentação é inibido pela adição de lisozima em diversos dos passos do processo de produção

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIMINUIR A DEGRADAÇÃO DA CERVEJA"

ESTADO DOS CONHECIMENTOS À DATA DA INVENÇÃO

Esta invenção diz respeito à utilização de lisozima na produção de bebidas fermentadas. A contaminação de bebidas baseadas em malte por bactérias deteriorativas é um problema antigo. As grandes unidades de produção de cerveja, hoje em dia, habitualmente filtram ou aquecem as bebidas baseadas em malte para eliminar as bactérias deteriorativas.

Henning, et al., Int'l Journal of Food Microbiol. 3:135-141, 1980, descrevem a utilização de diversos antibióticos, incluindo a nisina, a virginiamicina, a eritromicina, a oleandomicina e a flavomicina, como conservantes para purés e para sumos de frutos.

Ogden, J. Inst. Brew. 92: 379-383, 1968, descreve a utilização de nisina para inibir o crescimento de bactérias lácticas (*Lactobacillus*) durante a produção de cerveja.

Proctor e Cunningham, "The chemistry of lysozyme

and its use as a food preservative and a pharmaceutical", CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrition 26, 359-395, 1998, apresentam uma revisão sobre a utilização, lisozima como conservante de alimentos e como produto farmacêutico.

Subsiste uma necessidade de impedir a contaminação de bebidas baseadas em malte, de vinho, e de outras bebidas fermentadas, por parte de bactérias de deterioração, durante o processo de produção, sem se afectar substancialmente a qualidade o produto final.

A US-A-5.336.609 diz respeito a leveduras transformadas que codificam para a 1,4-B-N-acetilmuramidose.

O WO 93/01.724 descreve a adição de cloranfenicol a culturas de leveduras.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A lisozima é surpreendentemente eficaz em reduzir a deterioração dos produtos fermentados, tais como bebidas baseadas em malte, que provêm da contaminação com uma bactéria de deterioração. A lisozima é adicionada a uma concentração que é eficaz para inibir o crescimento de uma bactéria (uma "concentração eficaz"), em qualquer um de diversos passos no processo de produção do produto fermentado, incluindo, mas sem que se limite a, a adição de um inóculo de levedura (por exemplo, a levedura que se

secou antes de se voltar a hidratar, ou a uma preparação fresca ou reidratada de leveduras); uma adição a um mosto antes de ou durante a fermentação para se produzir uma bebida baseada em malte; a adição durante as operações de enchimento, etc.

De acordo com uma concretização da invenção relacionada com um método de produção de um bebida com base em malte, adiciona-se directamente lisozima à levedura antes da adição da levedura ao mosto para se iniciar a fermentação. Por exemplo, pode-se adicionar lisozima seca a uma preparação seca activa de levedura antes de se rehidratar a levedura seca. Em alternativa. Pode-se adicionar lisozima (seca ou em suspensão ou em solução), a uma preparação seca activa de levedura. De acordo com outras concretizações da invenção, adiciona-se a lisozima (i) ao mosto de cerveja, antes ou depois de se lhe adicionar um inóculo de levedura para se produzir uma "mistura de fermentação", que se deixa fermentar para se obter uma bebida baseada em malte; ou (ii) à bebida baseada em malte antes de ou na altura de se encher um contentor (por exemplo uma barrica ou uma garrafa). Podem também adicionar-se mais outros compostos para aumentar a eficácia da lisozima quanto à inibição do crescimento bacteriano, por exemplo agentes quelantes, *p*-hidroxibenzoato de metilo, um éster *p*-hidroxibenzóico, aerodesidrogenase de β -glicopirranose, aminoácidos, peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos, e misturas destes compostos.

De acordo com uma outra concretização da invenção, são proporcionadas bebidas baseadas em malte que incluem uma concentração eficaz de lisozima, incluindo bebidas baseadas em malte feitas pelos métodos que se mencionaram acima.

De acordo com uma outra concretização da invenção, são proporcionados métodos para se produzirem os produtos fermentados. Incluem-se nesses métodos (1) adicionar-se a uma amostra que inclua um hidrato de carbono fermentável, uma preparação de levedura que inclua levedura e uma quantidade de lisozima que seja eficaz para impedir o crescimento de bactérias na preparação de leveduras, e proporcionarem-se condições que levem a uma fermentação dos hidratos de carbono por parte da levedura. Pode também adicionar-se um composto, por exemplo à preparação de leveduras, para aumentar a eficácia da lisozima na inibição do crescimento de bactérias. Pode-se tratar também ainda a preparação de leveduras por uma lavagem ácida das leveduras, de preferência antes da adição da lisozima, para diminuir a população bacteriana na preparação de leveduras. Numa concretização, a preparação de leveduras é uma preparação seca que inclui a levedura seca activa e uma concentração de lisozima seca (por exemplo, entre cerca de 0,5 % e cerca de 2,0 % de lisozima seca, em peso), que seja suficiente para inibir de forma eficaz o crescimento bacteriano após a rehidratação da preparação de leveduras. Podem voltar a hidratar-se essas preparações de leveduras pela adição de um líquido aquoso antes da sua utilização.

Tanto quanto consta acima como outros aspectos da invenção será tornado mais evidente a partir das descrições pormenorizadas seguintes, e dos desenhos que as acompanham.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é um diagrama de fluxo do processo para a produção de cerveja. Indicam-se exemplos de pontos nos quais se pode fazer a adição de lisozima para inibir o crescimento das bactérias de deterioração (numerados "1" a "5").

A FIG. 2 é um gráfico que ilustra a actividade da lisozima adicionada à cerveja e mantida à temperatura ambiente (21°C) ou sob condições de refrigeração (4°C), ao longo de 194 dias.

A FIG. 3 é um gráfico em que se representa o efeito da lisozima sobre a turvação medida (FTU) de cerveja que tenha sido refrigerada (4°C) durante 30, 64, ou 194 dias.

A FIG. 4 é um gráfico em que se representa o efeito da lisozima sobre a turvação medida (FTU) de cerveja mantida à temperatura ambiente, "TA", 21°C) durante 30, 64 ou 194 dias.

A FIG. 5 é um gráfico em que se representa o

efeito da lisozima sobre a turvação medida (FTU) de cerveja aos 194 dias, a que foi adicionada lisozima e que foi mantida à temperatura ambiente ("TA"), arrefecida (4°C), ou arrefecida e depois levada à temperatura ambiente ("arrefecida/TA").

A FIG. 6 é um gráfico que ilustra a estabilidade da espuma de cerveja, uma semana depois de se tratar a cerveja com lisozima. B é cerveja Budweiser®; W é cerveja Hefeweisen Widmer®.

A FIG. 7 é um gráfico que ilustra o efeito de lisozima sobre bactérias lácticas sobre as leveduras na passagem da sala de brassagem para as cubas de fermentação (concentração original de bactérias = 10^3 /mL), no dia 7. Lb, *Lactobacterium brevis*; Lp1, estirpe 1 de *Lactobacterium plantarum*; Lp2, estirpe 2 de *Lactobacterium plantarum*; Pp, *Pediococcus pentosaceus*.

A FIG. 8 é um gráfico que ilustra o efeito de lisozima sobre bactérias lácticas na passagem da sala de brassagem para as cubas de fermentação (concentração original de bactérias = 10^6 /mL), no dia 7. Lb, *Lactobacterium brevis*; Lp1, estirpe 1 de *Lactobacterium plantarum*; Lp2, estirpe 2 de *Lactobacterium plantarum*; Pp, *Pediococcus pentosaceus*.

A FIG. 9 é um gráfico que ilustra a concentração inibitória mínima (MIC) de bactérias lácticas por parte da

lisozima em leveduras na passagem da sala de brassagem para as cubas de fermentação. Para cada estirpe bacteriana, a concentração original de bactérias foi de 10^3 /mL (esquerda) ou de 10^6 /mL (direita).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

A cerveja está exposta à contaminação por parte de bactérias deteriorativas indesejáveis, em qualquer um de diversos passos do processo produtivo. A adição de lisozima (N-acetil-hexosaminodase), em um ou mais destes passos, impede o crescimento das bactérias deteriorativas sem afectar negativamente a qualidade (por exemplo a cor, o sabor, etc.) do produto final.

A lisozima lisa as células bacterianas hidrolisando as ligações $\beta(1-4)$ entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina na peptidoglicana da parede celular das bactérias. Por causa da natureza das suas paredes celulares, as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à lisozima.

Utiliza-se uma concentração de lisozima que é eficaz para inibir o crescimento de bactérias de deterioração sem apresentar um impacto negativo significativo sobre a qualidade do produto fermentado, de preferência entre cerca de 5 ppm e cerca de 2000 ppm. Uma concentração de lisozima de 150 ppm em cerveja, por exemplo, é suficientemente elevada para inibir bactérias a

ela sensíveis, e permite verificar uma manutenção de actividade, ao longo do tempo, virtualmente sem alterações detectáveis na cerveja (por exemplo, da turvação e da espuma). Para efeitos de referência, pode fazer-se a adição de uma embalagem com 125 gramas de lisozima a um barril com 55 galões de cerveja, para se obter uma concentração de 300 ppm.

Pode adicionar-se lisozima sob uma forma seca, ou pode diluir-se antes da adição, por exemplo com água, para se assegurar que a lisozima se dissolve por completo.

Pode-se utilizar a lisozima em combinação com qualquer composto que seja habitualmente utilizado para aumentar a eficácia bactericida da lisozima (ou das suas misturas), incluindo, mas não se limitando a: agentes quelantes (por exemplo ácido fítico), *p*-hidroxibenzoato de metilo (POBB), um éster *p*-hidroxibenzóico, aerodesidrogenase de β -glicopirranose, aminoácidos (por exemplo glicina, treonina, ou lisina), peróxido de hidrogénio e ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico ou o ácido ascórbico. Por exemplo, pode ser especialmente útil o ácido cítrico ou outro agente quelante, para aumentar a eficácia da lisozima contra bactérias Gram-negativas, pela ligação a iões magnésio que são necessários para assegurar a estabilidade da membrana exterior das suas células.

Pode-se adicionar a lisozima sob a forma de um enzima seco, ou de uma suspensão ou uma solução em água ou

num tampão individual que seja compatível com a actividade da lisozima, por exemplo um tampão de TRIS, tris(hidroximetilaminometano). Uma tal solução ou suspensão pode também incluir um estabilizador osmótico (por exemplo, polietilenoglicol).

Ilustra-se o processo de produção da cerveja na FIG. 1. Incluem-se nos passos que integram o processo de produção de cerveja, nos quais se pode adicionar lisozima para impedir o crescimento bacteriano, sem que estes se limitem aos que se apresentam, um ou mais de entre os seguintes:

1. Descontaminação da levedura antes da fermentação. Pode-se adicionar lisozima directamente a um inóculo de leveduras, para impedir a deterioração de um produto alimentar, incluindo cerveja, vinho, licores, produtos lácteos fermentados, etc., por parte de micro-organismos que são sensíveis à lisozima.

Pode-se adicionar lisozima a uma suspensão de leveduras antes da adição dessa suspensão de leveduras a um mosto, a um puré, a um sumo, etc., para efeito de fermentação. Para a produção de cerveja, a lisozima é adicionada de preferência à levedura de brassagem, a uma concentração de entre cerca de 50 ppm e cerca de 300 ppm.

Alguns produtores de cerveja, por exemplo, utilizam uma preparação activa seca de levedura. Pode-se

utilizar a levedura quando necessário, ela for estável, tenha elevada visibilidade, não necessite de qualquer passo de propagação antes da sua utilização, e inicie rapidamente a fermentação. No entanto, não é economicamente viável No produzirem-se preparações de leveduras secas em condições estéreis. Em resultado disto, a levedura seca está invariavelmente contaminada com micro-organismos que podem deteriorar um produto fermentado, incluindo bactérias lácticas. Pode ser especialmente problemática a reutilização de leveduras que originalmente provinham de uma levedura seca activa, uma vez que a proporção de micro-organismos contaminantes pode aí ser maior do que nas preparações secas originais. Pode minimizar-se ou eliminar-se este problema utilizando uma preparação de levedura seca que inclua uma quantidade suficiente de lisozima seca para inibir o crescimento de micro-organismos contaminantes após rehidratação. A lisozima seca pode, por exemplo, ser adicionada à levedura seca antes da sua embalagem, para uma utilização conveniente. As preparações de levedura seca são tipicamente activadas antes da rehidratação com água (por exemplo, dez vezes, em peso, ao longo de 30 minutos). à rehidratação, a concentração de lisozima na suspensão de leveduras é de preferência entre cerca de 50 ppm e cerca de 2000 ppm.

Para a produção de cerveja, depois do período de rehidratação, adiciona-se tipicamente uma parte de suspensão de levedura a 200 partes, em peso, de mosto, para se obter a concentração inicial adequada de levedura. Por

exemplo, se se incluir lisozima pura (forma pura, seca) na preparação de levedura seca a entre cerca de 0,5 % e cerca de 2,0 %, em peso, depois da rehidratação em água (dez vezes, em peso) a concentração de lisozima na suspensão de levedura seria de entre cerca de 500 ppm e cerca de 2000 ppm, o que seria uma concentração mais do que suficiente para eliminar um pequeno número de bactérias lácticas contaminantes. Depois da adição da suspensão de leveduras ao mosto, a concentração de lisozima no mosto seria de entre cerca de 2,5 ppm e cerca de 10 ppm.

A levedura separada é normalmente utilizada de novo, de uma fermentação para outra, e muitas vezes sofre contaminação com bactérias deteriorativas. A prática industrial corrente é lavar a levedura em meio ácido para se eliminarem selectivamente as bactérias contaminantes, mas a lavagem em meio ácido é muitas vezes ineficaz e pode alterar o desempenho fermentativo da levedura. Pode-se adicionar directamente a lisozima à levedura a reutilizar antes da fermentação, em substituição da lavagem em meio ácido. Em alternativa, pode-se adicionar lisozima à levedura antes ou depois de um tratamento de lavagem convencional em meio ácido, para se obter uma descontaminação adicional da levedura.

2. Adição ao mosto antes da fermentação, por exemplo durante o arrefecimento

Na produção de cerveja, por exemplo, aquece-se

uma pasta para se obter um mosto doce, que se arrefece antes da adição de levedura para se obter uma mistura para fermentação. Quando se arrefece este mosto, ele torna-se extremamente vulnerável à contaminação por bactérias deteriorativas. A adição de lisozima ao mosto de cerveja arrefecido, por exemplo a uma concentração de entre cerca de 50 ppm e cerca de 300 ppm, pode impedir o crescimento de contaminantes bacterianos introduzidos neste estágio.

3. Durante a fermentação.

também se pode adicionar lisozima ao mosto após a adição de levedura, por exemplo a uma concentração de entre cerca de 50 ppm e cerca de 300 ppm. Esta actuação evita o crescimento das bactérias lácticas previamente introduzidas (por exemplo durante o arrefecimento do mosto, ou presentes no inóculo de levedura), na cerveja em fermentação.

4,5. Durante o enchimento.

Pode-se adicionar lisozima ao produto fermentado ele próprio, para se impedir a sua deterioração. Por exemplo, pode-se adicionar lisozima a uma concentração de entre cerca de 5 ppm e cerca de 150 ppm.

As cervejas vivas embaladas em barris e em garrafas são uma cervejas de especialidade que não são nem filtradas nem pasteurizadas, permitindo portanto uma carbonatação final pela levedura que fermenta no barril ou

na garrafa. Uma deterioração resultando de contaminação bacteriana durante as operações de enchimento do barril ou da garrafa pode ser impedida adicionando lisozima antes do, ou na altura do, enchimento.

As cervejas feitas em fermentações de pequena dimensão são raramente pasteurizadas. É-lhes amiúde administrada uma filtração grosseira para separa a levedura, mas não se leva a cabo uma filtração esterilizante porque esta retira a cor, altera a sensação em boca e o sabor.

A contaminação de cerveja contida em pequenos barris ou em garrafas é um problema de certo modo habitual. A adição de lisozima na altura do enchimento proporciona estabilidade biológica à cerveja.

Terminologia. Excepto quando se afirmar especificamente o contrário, devem entender-se os termos e expressões de acordo com os significados da sua utilização habitual por parte de indivíduos com conhecimentos normais da técnica relevante.

A expressão "produto fermentado" inclui qualquer produto que seja produzido por um processo que inclua fermentação por leveduras. incluem-se nos produtos fermentados, sem que a estes eles se limitem, bebidas baseadas em malte, vinhos, licores, produtos fermentados de soja e lácteos, etc.

A expressão "bebida baseada em malte" inclui bebidas fermentadas, alcoólicas e não alcoólicas, fabricadas a partir de malte e de um grão de um cereal, e opcionalmente saborizadas com lúpulo, incluindo cervejas, cervejas de fermentação alta, cervejas "stout", cervejas "porter", cervejas "lager", vinho de cevada ("barley wine"), etc.

Uma "concentração eficaz" de lisozima é uma concentração de lisozima que é suficiente para inibir o crescimento de uma bactéria na amostra (por exemplo, uma preparação de levedura ou um produto fermentado) de um modo estatisticamente significativo, de preferência assegurando pelo menos cerca de 25 %, mais preferivelmente pelo menos cerca de 50 %, e de preferência inibindo por completo o crescimento da bactéria, em comparação com uma amostra de controlo que esteja isenta de lisozima.

A expressão "bactérias deteriorativas" diz respeito a espécies bacterianas que podem crescer num produto fermentado e se encontram associadas à sua deterioração, incluindo, mas não se limitando a, bactérias tais como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, etc.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Estabilidade da actividade da lisozima

na cerveja

A vida útil realística da cerveja é de cerca de seis meses. Esta experiência foi concebida para determinar se a actividade da lisozima é estável depois da sua adição a cerveja, ao longo desse período de tempo.

Obteve-se cerveja fabricada comercialmente que havia sido fabricada sem lúpulo (feita segundo a formulação de Budweiser®, Anheuser-Busch Co., St. Louis, MO). Seleccionou-se cerveja sem lúpulo para permitir uma determinação mais precisa da influência da lisozima sobre o sabor e o aroma, sem a contribuição sensorial do lúpulo. Para além disso, uma vez que os lúpulos apresentam propriedades anti microbianas, a cerveja sem lúpulo permite uma melhor avaliação da eficácia anti microbiana da lisozima.

Abriram-se as cervejas e adicionou-se-lhes lisozima (Fordras S.A., Lugano, Suíça) que havia sido solubilizada em água estéril, com as concentrações seguintes: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, e 400 ppm (testou-se cada concentração em triplicado). As cervejas foram imediatamente rolhadas. Mantiveram-se amostras de cerveja à temperatura ambiente (21°C) e sob refrigeração (4°C).

Mediu-se a limpidez das cervejas usando um nefelómetro (turbidímetro) (Turbidímetro de Investigação DRT-100B, HF Scientific, Inc., For Myers, FL) calibrado

usando 0,02 unidades de turvação nefelométrica (NTU) de um padrão certificado de referência, de formazina (HF Scientific, Inc.) (NTU x 25 = unidades de turvação de formazina [FTU], que são directamente equivalentes às unidades ASBC (enevado, ligeiramente enevado, etc.)). As medições da turvação foram feitas sobre amostras mantidas à temperatura ambiente, à temperatura de refrigeração, e sobre amostras que foram mantidas sob refrigeração e depois levadas até à temperatura ambiente antes da medição.

A actividade da lisozima nas amostras foi também medida pelo método da FAO (Compendium of Food Additive Specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52, 1992, págs. 61-64).

A FIG. 2 ilustra a actividade quantificável da lisozima adicionada a cerveja, e mantida à temperatura ou sob refrigeração durante 194 dias. As perdas da actividade de lisozima variaram entre nenhuma perda substancialmente detectável e cerca de 40 % de perda. Não existia nenhuma diferença estatisticamente significativa na actividade de lisozima quando a cerveja era mantida à temperatura diferente, em relação à que se manteve à temperatura de refrigeração. Também não existia qualquer diminuição significativa da actividade dos 60 dias de armazenagem até aos 194 dias de armazenagem.

As FIG. 3, 4, e 5 representam os valores de turvação das amostras de cerveja à temperatura ambiente

durante 30, 64, e 194 dias. Com amostras de cerveja armazenadas à temperatura ambiente, existia uma correlação geral entre a concentração de lisozima e o aumento da turvação. As amostras mantidas sob refrigeração apresentavam em geral menos turvação do que as amostras mantidas à temperatura ambiente, sendo este efeito muito pronunciado aos 194 dias. Um aspecto interessante é que as amostras de cerveja mantidas à temperatura de refrigeração e depois levadas até à temperatura ambiente evidenciavam um mínimo de turvação em relação às que foram submetidas aos outros tratamentos.

EXEMPLO 2: Avaliação da lisozima em levedura a utilizada contaminada com bactérias lácticas

Cultivaram-se as leveduras para as cervejas "lager" de Amesterdão e "ale" de Nottingham (Lallemond Inc., Montreal, Canada) em extracto de malte estéril a 7% (malte cristalino em pó Great Western™) durante uma semana, até se completar a fermentação. Separaram-se as leveduras, centrifugaram-se, e determinou-se o número de células de levedura. Diluíram-se as culturas de levedura até cerca de 75×10^6 células/mL (sete vezes a concentração recomendada para a sua remoção, e distribuíram-se as suspensões de leveduras resultantes por tubos estéreis.

Adicionou-se lisozima às suspensões, a concentrações de 0, 50, 100, ou 200 ppm. Introduziu-se *Lactobacillus brevis* (bactérias lácticas, LAB) nas

suspensões de levedura, a uma concentração de 10^3 células/mL ("pequena" na Tabela 1) e a 10^6 células/mL ("grande", na Tabela 1). Fez-se uma contagem selectiva das LAB com meio MRS (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD) contendo 25 mg/L de nistatina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), nos dias 1 e 7 depois da inoculação inicial. Confirmou-se a viabilidade e a concentração das leveduras no dia 7 após a inoculação inicial. A Tabela 1 ilustra a concentração de células de *L. brevis* (células/mL) nas suspensões, nos dias 1 e 7.

A Tabela I mostra que a inibição de *L. brevis* foi semelhante tanto para as leveduras da cerveja *lager* de Amsterdão como para as da cerveja *ale* de Nottingham. Havia um pequeno aumento do crescimento de *L. brevis* depois do dia 1 e um aumento substancial do crescimento após 7 dias com a lisozima a 0 ppm, a ambas as concentrações iniciais de bactérias. Não havia qualquer crescimento bacteriano após a adição de lisozima, excepto para a levedura da *ale* de Nottingham com 50 ppm de lisozima e com 10^6 bactérias adicionadas, caso em que a concentração de bactérias descia até $1,5 \times 10^2$ células/mL no dia 1, mas aumentava para $8,0 \times 10^3$ no dia 7, o que é menos do que na amostra isenta de lisozima.

TABELA 1

LEVEDURA DA ALE DE NOTTINGHAM				
Lisozima (ppm)	0	50	100	200
Dia 1-pequena	$6,4 \times 10^3$	0	0	0
Dia 7-pequena	$5,0 \times 10^6$	0	0	0
Dia 1-pequena	$5,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^2$	0	0
Dia 7-pequena	$7,8 \times 10^7$	$7,9 \times 10^3$	0	0
Levedura da Lager de Amesterdão				
Lisozima (ppm)	0	50	100	200
Dia 1-pequena	$3,0 \times 10^5$	0	0	0
Dia 7-pequena	$5,0 \times 10^6$	0	0	0
Dia 1-pequena	$2,7 \times 10^7$	0	0	0
Dia 7-pequena	$7,9 \times 10^7$	0	0	0

No controlo do dia 7, a viabilidade e a concentração das leveduras mantinha-se a mesma que se verificara nas suspensões de levedura originalmente inoculadas com lisozima, indicando que a lisozima não tinha tido efeito aparente sobre a levedura.

EXEMPLO 3: Efeitos da lisozima sobre a estabilidade da espuma da cerveja

Trataram-se triplicados de amostras de cervejas Budweiser® (Anheuser-Busch, St. Louis, MO) e de Hefeweizen Widmer® (Portland, OR), com 0, 50, 100, ou 150 ppm de lisozima.

Testou-se a estabilidade da espuma (taxa de colapso da espuma em unidades de Sigma), passada uma semana, pelo método do valor de Sigma (Quality Control Course Laboratory Exercises, Siebel Institute of Technology, Chicano, IL).

[A American Society of Brewing Chemists (ASBC) descreve outro método padrão para testar a estabilidade da espuma em "Foam Collapse Rate" (Beer 22), *Standard Methods of Analysis* (publicado em 1992)]. Tal como se mostra na FIG. 6, não era patente nenhuma diferença significativa (ANOVA de 2 factores sem replicação) entre os tratamentos com concentrações diferentes de lisozima, para qualquer uma das cervejas.

Observou-se visualmente um ligeiro decréscimo no brilho da cerveja Budweiser® tratada com lisozima, embora não se tenha observado nenhuma precipitação (não se observou qualquer decréscimo da brilho na cerveja Hefeweizen Widmer®, uma vez que esta cerveja não filtrada apresenta normalmente precipitação).

EXEMPLO 4: Estabilidade da actividade da lisozima em vinho

Adicionou-se lisozima a vinho tinto (*Pinot noir*, produzido a partir de uvas obtidas na Oregon State University, por procedimentos normais de fabrico de vinho), a uma concentração de 0, 100, 200, ou 300 ppm. Extraíram-se com água taninos de carvalho liofilizados (Food, Wine and Spirit Group, Inc., P.O. Box 10234, Napa, CA), e mantiveram-se à temperatura ambiente. Foram testadas amostras em duplicado. A diversos períodos de tempo depois da adição da lisozima e dos taninos de carvalho, mediu-se a concentração de lisozima e o total de fenólicos como equivalentes em ácido gálico (GAE).

A Tabela 2 mostra a concentração de lisozima em amostras de vinho passados 7 dias à temperatura ambiente. A concentração em lisozima para as amostras isentas de taninos de carvalho era de cerca de 50 % da concentração original. Para amostras com 100 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 30 % da concentração original. Para amostras com 200 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 20 % da concentração original. Para amostras com 300 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 10 % da concentração original.

A Tabela 3 mostra a concentração de lisozima em amostras de vinho passados 28 dias (quatro semanas) à temperatura ambiente. A concentração em lisozima para as amostras isentas de taninos de carvalho era de cerca de 30

% da concentração original. Para amostras com 100 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 20 % da concentração original. Para amostras com 200 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 15 % da concentração original. Para amostras com 300 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era 1,0 %, ou menos, da concentração original.

A Tabela 4 mostra a concentração de lisozima em amostras de vinho passados 84 dias (doze semanas) à temperatura ambiente. A concentração em lisozima para as amostras isentas de taninos de carvalho era de cerca de 20 % da concentração original. Para amostras com 100 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 7 % da concentração original. Para amostras com 200 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima era inferior a 4 % da concentração original. Para amostras com 300 ppm de taninos de carvalho, a concentração em lisozima tinha baixado para valores não detectáveis.

As Tabelas 5-7 mostram os teores em fenólicos (GAE) passados 7, 28, e 84 dias, respectivamente. Não existia uma diferença significativa entre a quantidade de GAE das amostras que haviam sido fortificadas em taninos de carvalho. A adição de um grama de preparação de taninos de carvalho (600-650 mg de GAE), adicionada a 100 ppm, deveria aumentar os GAE em 65. Não foi observada uma correlação directa entre os taninos observados e os GAE.

Em resumo, ao passo que as concentrações medidas de lisozima diminuíram ao longo do tempo no vinho tinto, a adição de taninos de carvalho ao vinho aumentavam de forma acentuada a diminuição das concentrações de lisozima que se mediram. A diminuição da actividade de lisozima era inversamente proporcional ao aumento da concentração em taninos de carvalho. Para além disto, as amostras que continham menores concentrações de lisozima eram afectadas de forma muito mais severa. A quantidade de taninos de carvalho que era adicionada não se traduzia por nenhuma diferença aparente na quantidade de GAE detectada.

TABELA 2: Medição da Concentração de Lisozima em Vinho Contendo Taninos de Carvalho (1 Semana)

<u>Taninos de Carvalho (ppm)</u>	<u>Concentração de Lisozima</u>			
		<u>Adicionada (ppm)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>
0	0	27,4	77,4	156,8
100	0	1,8	44,5	94,6
200	0	0	21,2	59,4
300	0	0	1,8	4,1

TABELA 3: Medição da Concentração de Lisozima em Vinho Contendo Taninos de Carvalho (12 Semana)

<u>Taninos de Carvalho (ppm)</u>	<u>Concentração de Lisozima</u>			
	<u>Adicionada (ppm)</u>			
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>
0	0	15,3	56,7	114,5
100	0	1,3	30,1	69,5
200	0	0	6,25	43,9
300	0	0	0,7	1,82

TABELA 4: Medição da Concentração de Lisozima em Vinho Contendo Taninos de Carvalho (12 Semanas)

<u>Taninos de Carvalho (ppm)</u>	<u>Concentração de Lisozima</u>			
	<u>Adicionada (ppm)</u>			
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>
0	0	7,7	38,0	83,0
100	0	0	12,2	18,0
200	0	0	1,84	11,4
300	0	0	0	0

TABELA 5: Concentração Fenólica (GAE) Medida em Vinhos Com Adição de Lisozima e de taninos de Carvalho (1 Semana)

<u>Concentração Original em</u> <u>Lisozima (ppm)</u>	<u>Concentração de Taninos</u> <u>Adicionada (ppm)</u>			
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>
0	0	7,7	38,0	83,0
100	0	0	12,2	18,0
200	0	0	1,84	11,4
300	0	0	0	0

TABELA 6: Concentração Fenólica (GAE) Medida em Vinhos Com Adição de Lisozima e de taninos de Carvalho (4 Semanas)

<u>Concentração Original em</u> <u>Lisozima (ppm)</u>	<u>Concentração de Taninos</u> <u>Adicionada (ppm)</u>			
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>
0	850	799	961	995
100	934	777	906	908
200	825	837	866	880
300	800	802	867	844

TABELA 7: Concentração Fenólica (GAE) Medida em Vinhos Com Adição de Lisozima e de taninos de Carvalho (12 Semanas)

<u>Concentração Original em</u> <u>Lisozima (ppm)</u>	<u>Concentração de Taninos</u> <u>Adicionada (ppm)</u>			
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>
0	985	1043	1205	1179
100	1032	777	1145	996
200	974	1055	1107	1159
300	854	880	1062	1240

EXEMPLO 5: Sensibilidade de Diversas Bactérias Deteriorativas à Lisozima

Testaram-se diversas estirpes de bactérias para determinar a sua sensibilidade aos efeitos anti microbianos da lisozima, em especial uma estirpe de *Lactobacterium brevis*, duas estirpes diferentes de *Lactobacterium plantarum*, e uma estirpe de *Pediococcus pentosaceus*. Cultivaram-se leveduras de *lager* de Amesterdão e de *ale* de Nottingham em caldo estéril de extracto de malte a 7 % durante uma semana ou até estar completa a fermentação. Separaram-se as células de levedura, centrifugou-se e contou-se. Diluíram-se as culturas de leveduras a cerca de 75×10^6 células/mL e repartiram-se por tubos estéreis. Adicionaram-se concentrações de 0, 50, 100, e 200 ppm

(mg/L) de lisozima. Introduziram-se as estirpes de bactérias deteriorativas descritas adiante nas suspensões de levedura, a concentrações de 5×10^3 células/mL e de 5×10^6 células/mL. Nos dias um e sete após a inoculação inicial foi feita uma contagem selectiva da estirpe de bactéria de deterioração, com meio MRS contendo 25 mg/L de nistatina. Confirmou-se a viabilidade e a concentração da levedura no dia sete após a inoculação inicial. Ilustram-se os resultados na FIG. 7 (concentração original de bactéria = 10^3 /mL) e na FIG. 8 (concentração original de bactéria = 10^6 /mL).

Para se determinar a concentração inibitória mínima de lisozima para cada uma das estirpes de bactérias deteriorativas que se testaram, inocularam-se células da estirpe em caldo nutriente estéril, a 10^3 e a 10^6 células/mL. Adicionaram-se concentrações de 0-100 mg/L (ppm) de lisozima que se voltara a suspender em água estéril. Cada concentração de lisozima foi testada em duplicado. Uma vez inoculados, os tubos foram incubados a 32°C . Plaquearam-se amostras (10 μL) de cada tubo sobre agar MRS nos dias um e sete após a inoculação. Considerou-se como sendo a concentração inibitória mínima (MIC), a primeira concentração à qual ambas as réplicas, em ambos os pontos de amostragem, evidenciavam uma ausência de crescimento. Os resultados estão ilustrados na FIG. 9.

A. Efeito da Lisozima sobre *Lactobacillus brevis*

Quando foram inoculadas com a levedura de *lager* de Amesterdão, ambas as concentrações de *L. brevis* evidenciaram um grande aumento de crescimento passado um dia, e a sua concentração não se tinha alterado muito no quando testada aos sete dias, com 0 ppm de lisozima.

Quando foram inoculadas com a levedura de *ale* de Nottingham, ambas as concentrações de *L. brevis* evidenciaram um aumento de crescimento praticamente nulo no dia um, e um aumento substancial de crescimento no dia 7, com 0 ppm de lisozima. Também se observou crescimento no dia um no tubo contendo 50 ppm de lisozima, inoculado com 10^6 bactérias por mL, embora a concentração fosse significativamente inferior à do inoculo inicial. No dia sete, a concentração de bactérias neste tubo tinha aumentado um pouco, embora se mantivesse significativamente inferior à do inoculo original. O crescimento de *L. brevis* na amostra contendo 50 ppm de lisozima foi consistentemente inferior ao ocorrido na amostra contendo 0 ppm de lisozima.

A viabilidade e a concentração de leveduras, que foram testadas no dia sete, permaneceram iguais às observadas no inoculo original. isto indica que a lisozima adicionada não havia produzido qualquer efeito sobre a levedura.

A MIC para *L. brevis* a 10^3 células/mL em caldo nutriente foi de 5 mg/mL de lisozima. A MIC para *L. brevis*

a 10^6 células/mL em caldo nutriente foi de 20 mg/mL de lisozima.

Tanto concentrações grandes (10^6 /mL) como pequenas (10^3 /mL) desta estirpe de *L. brevis* eram sensíveis mesmo a teores baixos de lisozima.

B. Efeito da Lisozima sobre *Lactobacillus plantarum* #1

Quando foram inoculadas com a levedura de *lager* de Amesterdão, ambas as concentrações de *L. plantarum* #1 evidenciaram um grande aumento de crescimento passado um dia, e a sua concentração não se tinha alterado muito no quando testada aos sete dias, com 0 ppm de lisozima. Era manifesto um pequeno crescimento a todas as concentrações de lisozima após um dia, com ocorrência de um crescimento mais substancial após sete dias para a concentração mais pequena de bactérias. O crescimento era ligeiramente inferior ou semelhante ao observado nas amostras sem adição de lisozima, mas superior à concentração original de bactérias adicionadas. Para a concentração maior de bactérias, havia crescimento substancial no dia um, não se revelando alteração da concentração de bactérias quando se efectuou o teste aos sete dias.

Quando foram inoculadas com a levedura de *ale* de Nottingham, ambas as concentrações de *L. plantarum* #1 evidenciaram um grande aumento de crescimento passado um

dia, e a sua concentração não se tinha alterado muito no quando testada aos sete dias, com 0 ppm de lisozima. No entanto verificava-se um crescimento ligeiramente superior para a menor concentração de bactérias. Para a concentração maior de bactérias, ocorria um crescimento substancial no dia um a todas as concentrações de lisozima, mas o crescimento diminuía significativamente no dia sete.

A viabilidade e a concentração de leveduras no dia sete permaneceram iguais às inoculadas originalmente, indicando que a lisozima adicionada não havia tido qualquer efeito sobre a levedura.

A MIC para o *L. plantarum* #1 foi de 5 mg/L (ppm) de lisozima para as 10^3 células/mL em caldo nutriente, e de 50 mg/L (ppm) de lisozima a 10^6 células/mL.

O *L. plantarum* #1 era parcialmente resistente à lisozima. Tanto as concentrações grandes (10^6 /mL) como pequenas (10^3 /mL) de bactérias eram resistentes à lisozima quando também estavam presentes leveduras na mistura. Quando não havia leveduras presentes na cultura, as concentrações pequenas de bactérias (10^3 /mL) eram sensíveis à lisozima, enquanto as concentrações grandes de bactérias (10^6 /mL) eram apenas parcialmente sensíveis.

C. Efeito da Lisozima sobre *Lactobacillus plantarum* #2

Quando foram inoculadas com a levedura da *lager* de Amesterdão, ambas as concentrações de *L. plantarum* #2 evidenciaram um grande aumento de crescimento após um dia, e não evidenciaram qualquer aumento de concentração quando testados aos 7, com 0 ppm de lisozima. Havia um pequeno crescimento a todas as concentrações de lisozima ao fim de um dia, com a ocorrência de um crescimento mais substancial aos sete dias, para a concentração inferior de bactérias. O crescimento era ligeiramente inferior ou igual ao observado para as amostras sem lisozima, mas superior à concentração original de bactérias que se havia adicionado. Para a concentração mais elevada de bactérias, existia um crescimento substancial no dia um, e nenhuma alteração quando o teste era conduzido aos sete dias. O crescimento bacteriano diminuía na proporção inversa da concentração da lisozima, no entanto não foi eliminado o crescimento bacteriano.

Quando foram inoculadas com a levedura da *ale* de Nottingham, ambas as concentrações de *L. plantarum* #2 manifestaram de novo um grande aumento após um dia, e evidenciaram uma ausência de alteração de concentração quando testadas no dia sete com 0 ppm de lisozima. No entanto havia um crescimento ligeiramente superior do que para a amostra inoculada com 0 ppm de lisozima no dia sete, para a concentração menor de bactérias. Para a concentração maior de bactérias, ocorria um crescimento substancial no dia um a todas as concentrações de lisozima, e um decréscimo significativo no dia sete.

A viabilidade e concentração de leveduras, que foram testadas no dia sete, permaneciam constantes e iguais às que haviam sido originalmente inoculadas. Isto indica que a lisozima adicionada não tinha produzido qualquer efeito sobre a levedura.

A MIC para *L. plantarum* #2, tanto a 10^3 células/mL como a 10^6 células/mL em caldo nutriente, era > 200 mg/L (ppm) de lisozima.

Esta estirpe de bactérias era resistente ao tratamento com lisozima. Tanto a concentração grande (10^6 /mL) como a pequena (10^3 /mL) de bactérias evidenciaram ser resistentes, mesmo a teores pequenos de lisozima. O crescimento bacteriano diminuía em proporção inversa da concentração de lisozima, mas não era eliminado. A resistência das bactérias à lisozima parecia ser superior na presença de leveduras.

D. Efeito da Lisozima sobre *Pediococcus pentosaceus*

Quando se inocularam leveduras de ale de Nottingham, não se observaram diferenças para o *P. pentosaceus*, em relação à inoculação com leveduras de lager de Amesterdão. Quando inoculadas com leveduras de ale de Nottingham ou de lager de Amesterdão, ambas as concentrações de *P. pentosaceus* evidenciaram um grande

crescimento após um dia, mantendo-se constantes quando testadas no dia sete, a 0 ppm de lisozima. Também se observou crescimento no dia um em todos os tubos que continham lisozima (50, 100, 200 ppm) que haviam sido originalmente inoculados com 10^6 bactérias/mL. Esta concentração permanecia constante quando testada no dia sete. Os tubos contendo lisozima e que haviam sido originalmente inoculados com 10^3 bactérias/mL não evidenciaram crescimento no dia um. No dia 7, no entanto, foi observado crescimento bacteriano no tubo de 10^3 /mL contendo 50 ppm de lisozima, enquanto não se manifestou crescimento nos tubos que continham 100 e 200 ppm de lisozima. O crescimento nas amostras contendo lisozima era ligeiramente inferior ao observado nas amostras com 0 ppm de lisozima.

Quando testadas no dia sete, a viabilidade e a concentração de leveduras permaneciam idênticas às observadas aquando da inoculação original. Isto indica que a lisozima adicionada não exercia qualquer efeito sobre as leveduras.

A MIC para esta estirpe de *P. pentosaceus* foi de 50 mg/L (ppm) de lisozima para 10^3 células/mL em caldo nutriente, e > 200 mg/L (ppm) para 10^6 células/mL.

Esta estirpe de *Pediococcus pentosaceus* era só parcialmente sensível à lisozima. As concentrações grandes (10^6 /mL) de células eram especialmente resistentes ao

tratamento com lisozima, embora as concentrações pequenas (10^3 /mL) de células também eram resistentes a alguns dos teores em lisozima. A resistência á lisozima parecia ser ligeiramente maior na presença de levedura.

E. Conclusões

Das bactérias testadas, o *Lactobacillus brevis* era a mais sensível às bactérias testadas. Determinou-se que uma das estirpes de *Lactobacillus plantarum* era completamente nas condições deste estudo, ao passo que se determinou a outra estirpe de *L. plantarum* era sensível a teores relativamente pequenos de lisozima. A estirpe de *Pediococcus pentosaceus* exibiu uma resistência moderada aos efeitos da lisozima. Todas as bactérias testadas eram mais resistentes ao tratamento com lisozima quando se encontravam na presença de levedura, possivelmente porque a levedura absorvia parte da lisozima. A sensibilidade de uma dada estirpe de bactérias aos efeitos da lisozima dependia fortemente do tipo de meio que se estava a utilizar. As bactérias que eram sensíveis ao tratamento com lisozima em caldo nutriente eram resistentes aos mesmos teores de lisozima quando se cultivavam em caldo MRS.

Lisboa, 14 de Dezembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de se produzir um produto fermentado que inclua:

proporcionar-se uma preparação de leveduras que inclua levedura e uma quantidade de lisozima que seja eficaz para inibir o crescimento de bactérias na preparação de leveduras;

adicionar-se a preparação de leveduras à amostra;
e

proporcionarem-se condições que levem à fermentação do hidrato de carbono pela levedura.

2. Um método de se inibir o crescimento de uma bactéria numa preparação de leveduras, que inclua:

proporcionar-se uma preparação de leveduras; e

adicionar-se à preparação de leveduras uma quantidade de lisozima que seja eficaz para inibir o crescimento da bactéria na preparação de leveduras.

3. O método das reivindicações 1 ou 2 incluindo também lavar-se a preparação de leveduras com meio ácido.

4. O método das reivindicações 1 ou 2 incluindo também adicionar-se à preparação de leveduras um composto que aumente a eficácia bactericida da lisozima.

5. O método da reivindicação 4 em que o composto seja seleccionado de entre um agente quelante, *p*-hidroxibenzoato de metilo, um éster *p*-hidroxibenzóico, aerodesidrogenase de β -glicopirranose, aminoácidos, peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos, e misturas destes compostos.

6. O método das reivindicações 1 ou 2 em que a preparação de leveduras seja de uma levedura activa seca, que contenha uma levedura seca activa e uma quantidade de lisozima seca que seja eficaz para inibir o crescimento de uma bactéria na preparação de leveduras, após a rehidratação.

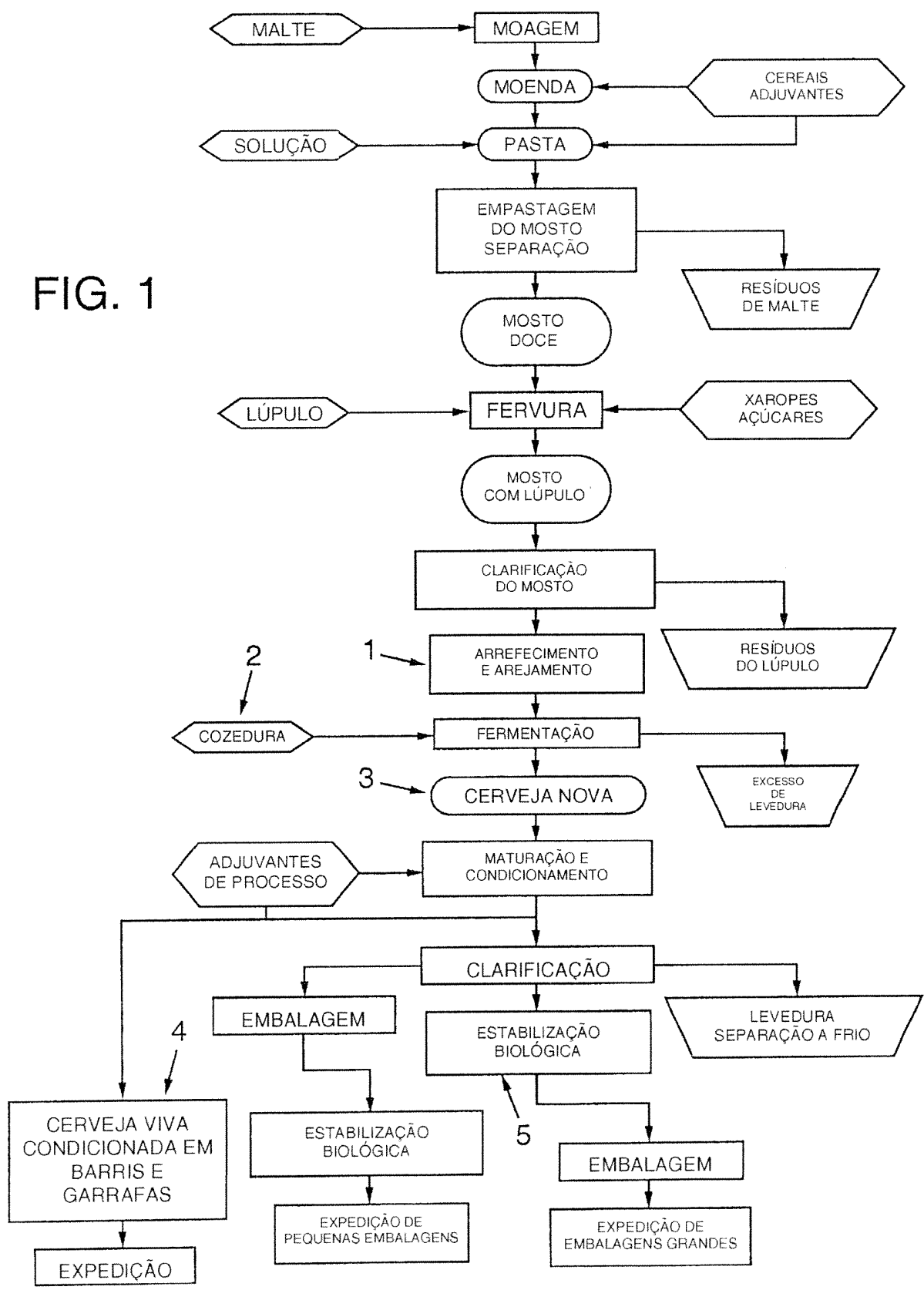
7. O método da reivindicação 6 incluindo também adicionar-se um líquido aquoso à preparação de leveduras para se obter uma preparação de leveduras rehidratada, em que a adição da preparação de leveduras à amostra inclua adicionar-se a preparação de leveduras rehidratadas à amostra, sendo a quantidade de lisozima na levedura seca, uma quantidade que seja eficaz para inibir o crescimento da bactéria na preparação de leveduras rehidratadas.

8. O método das reivindicações 6 ou 7, em que a preparação de leveduras seca contenha entre cerca de 0,5 %

e cerca de 2,0 % de lisozima seca, em peso.

Lisboa, 14 de Dezembro de 2006

FIG. 1



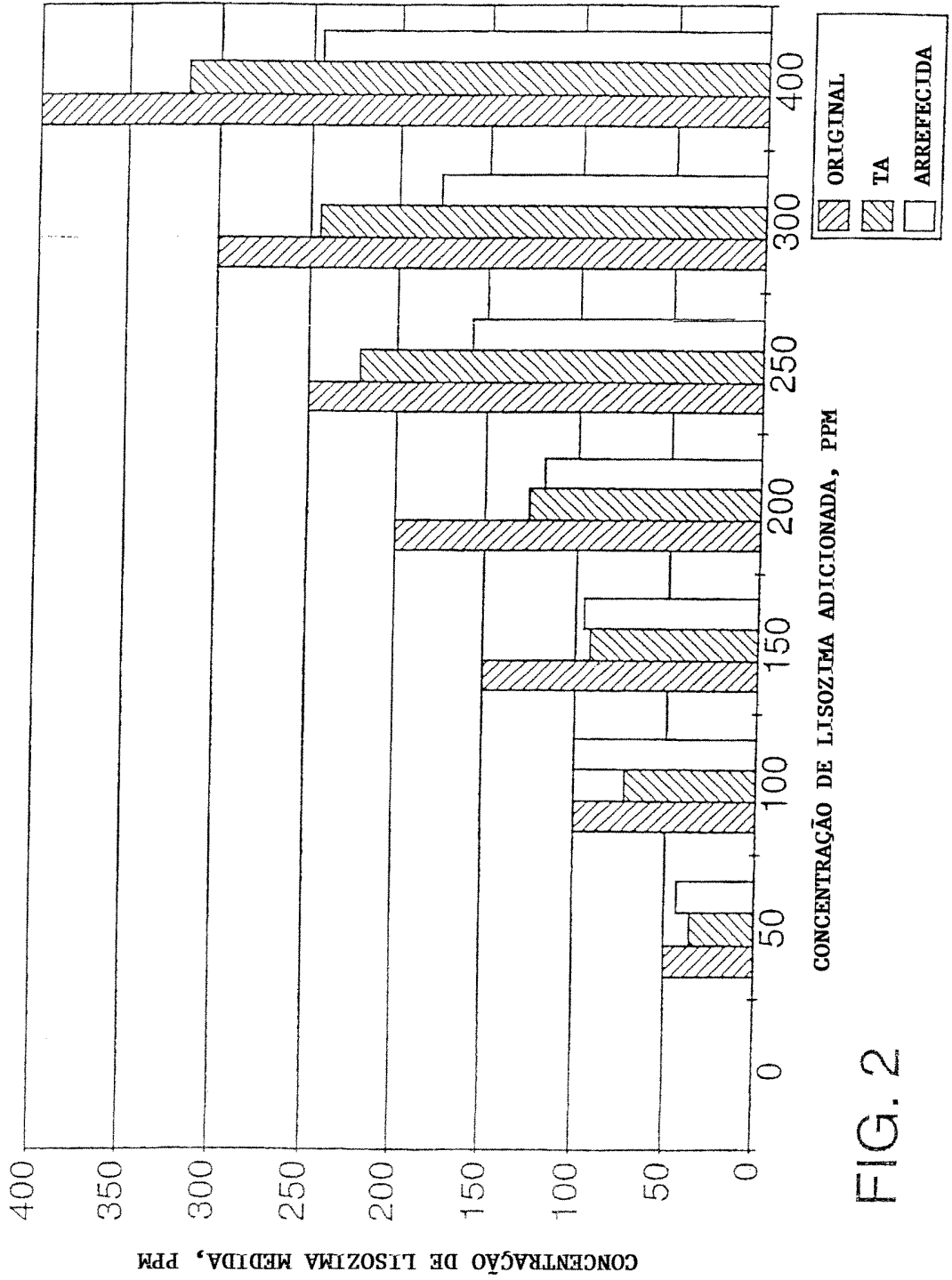


FIG. 2

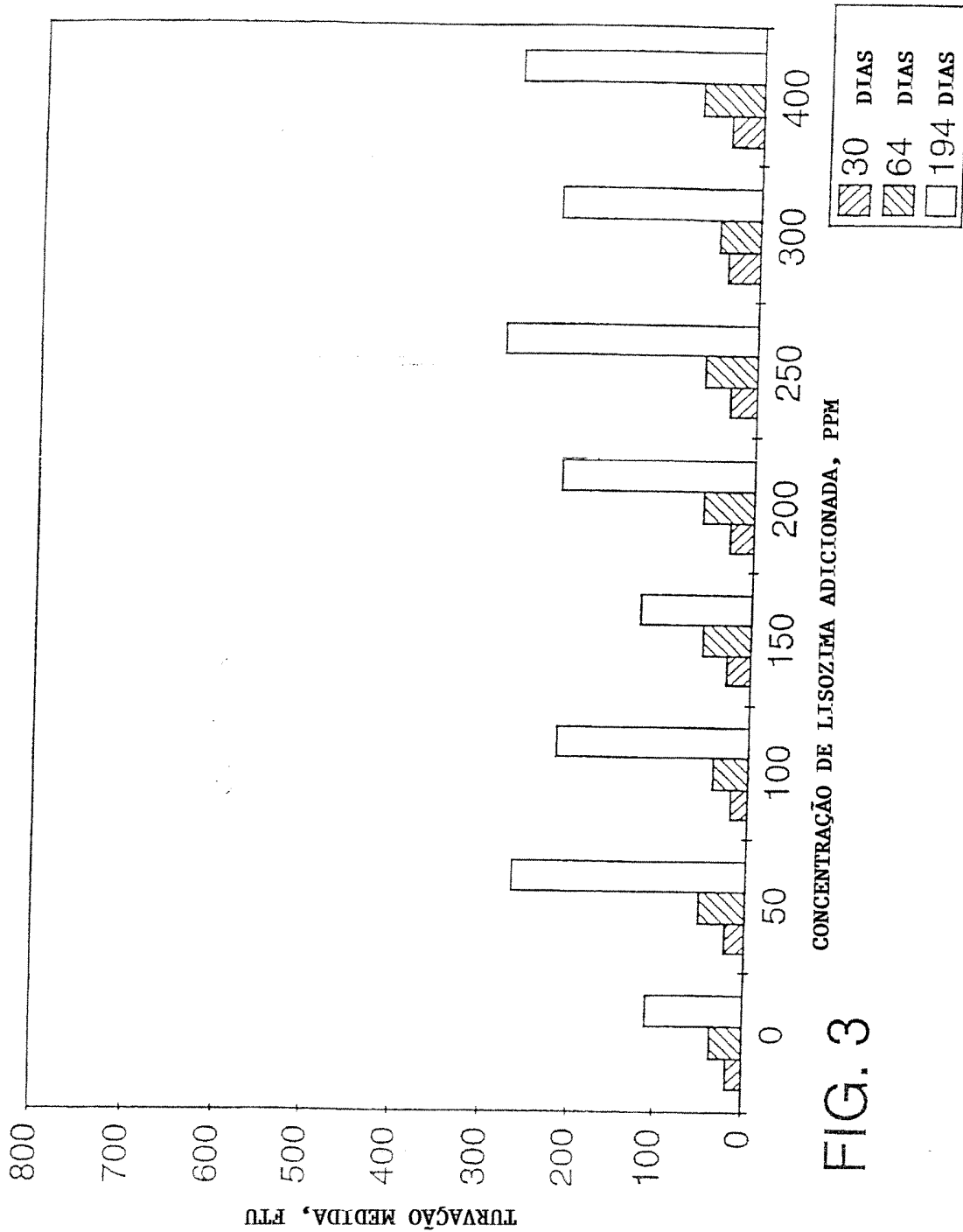


FIG. 3

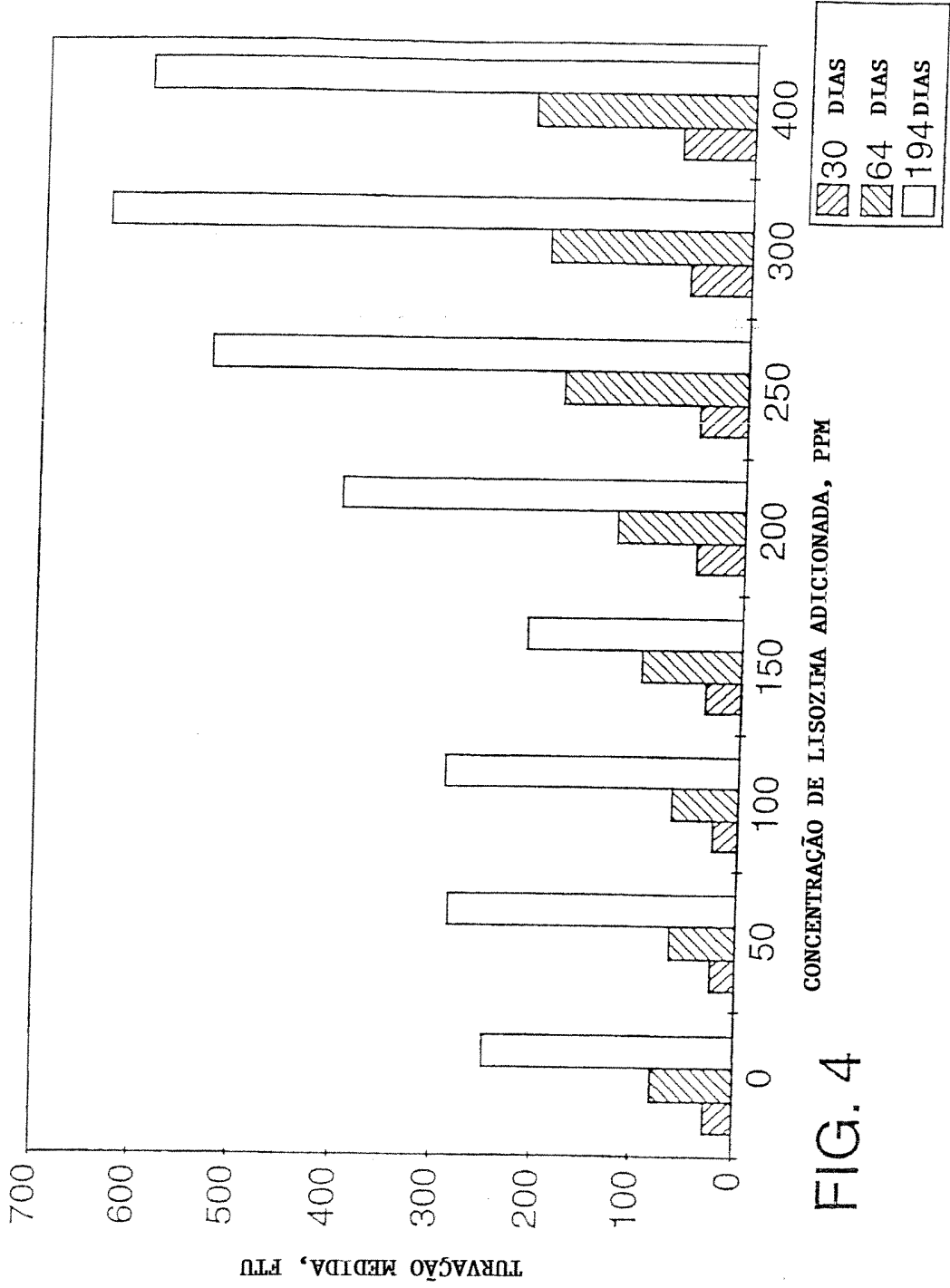


FIG. 4

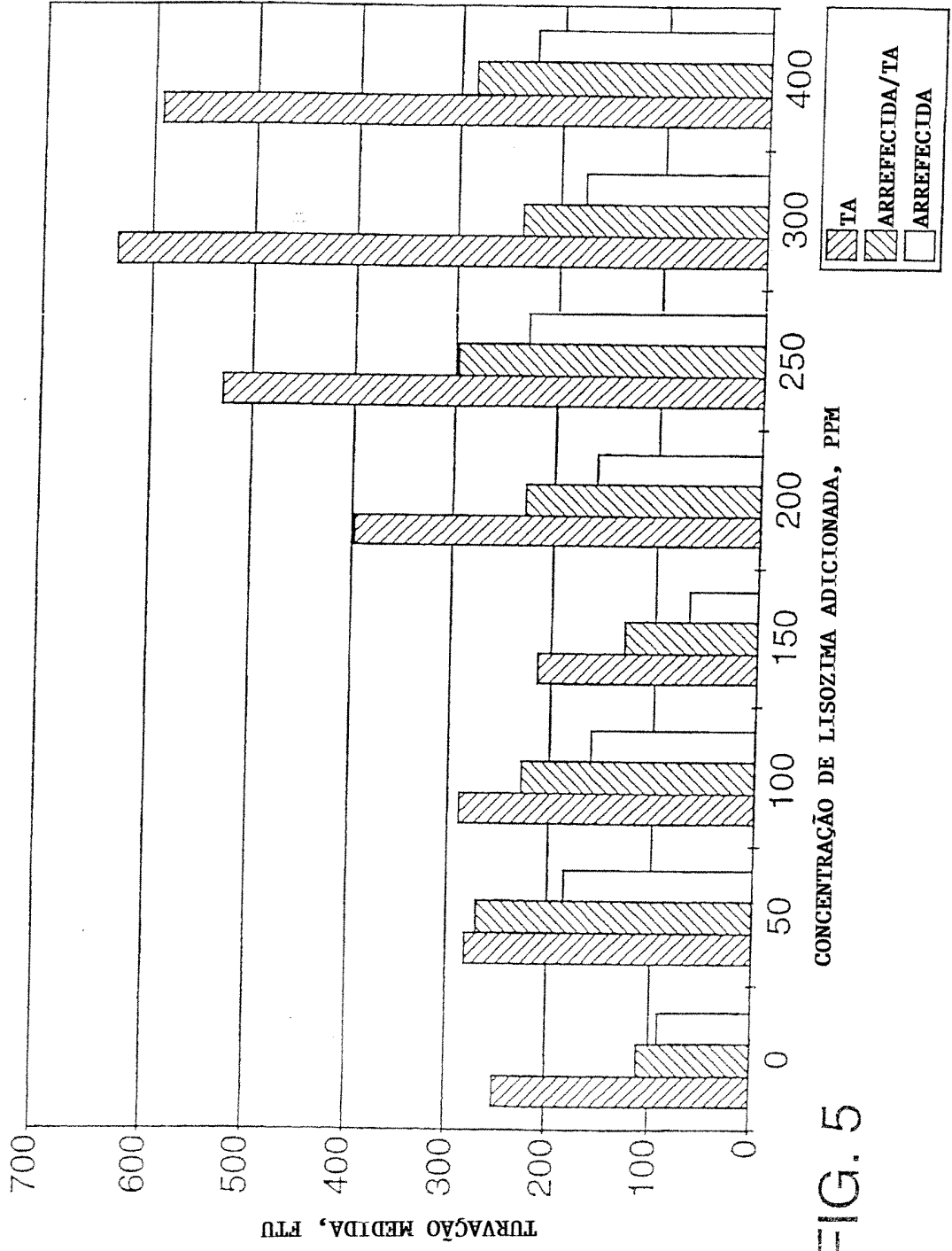


FIG. 5

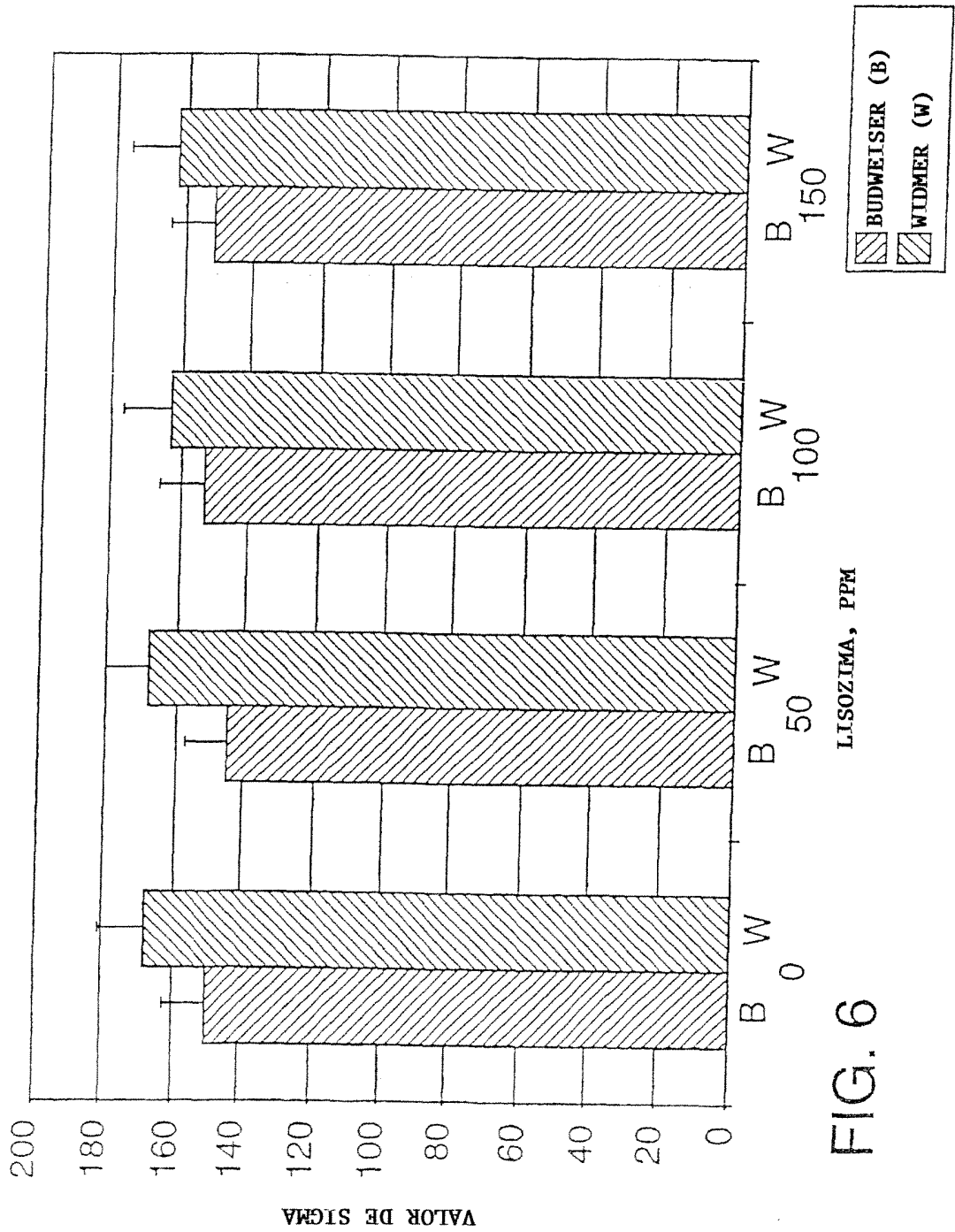


FIG. 6

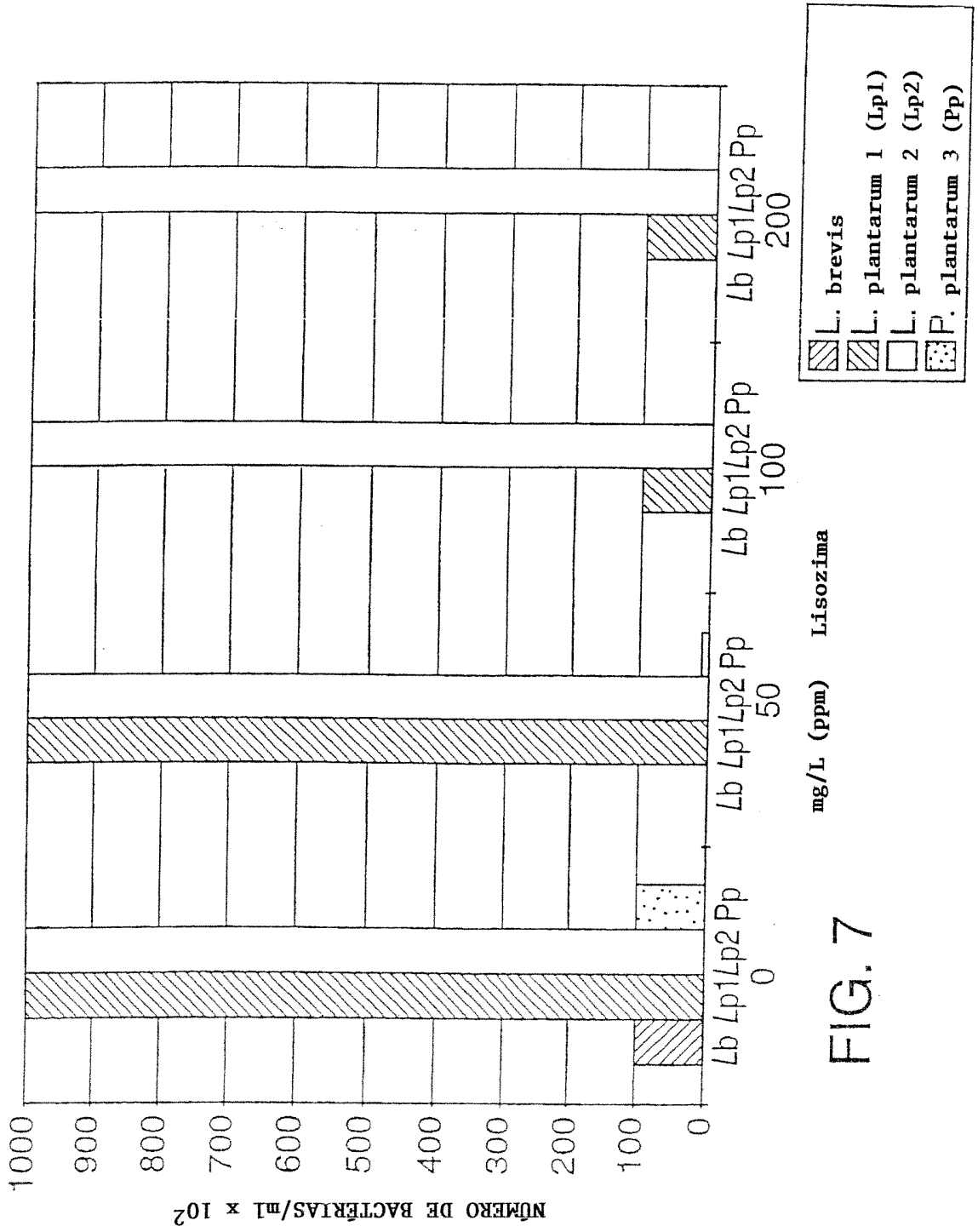


FIG. 7

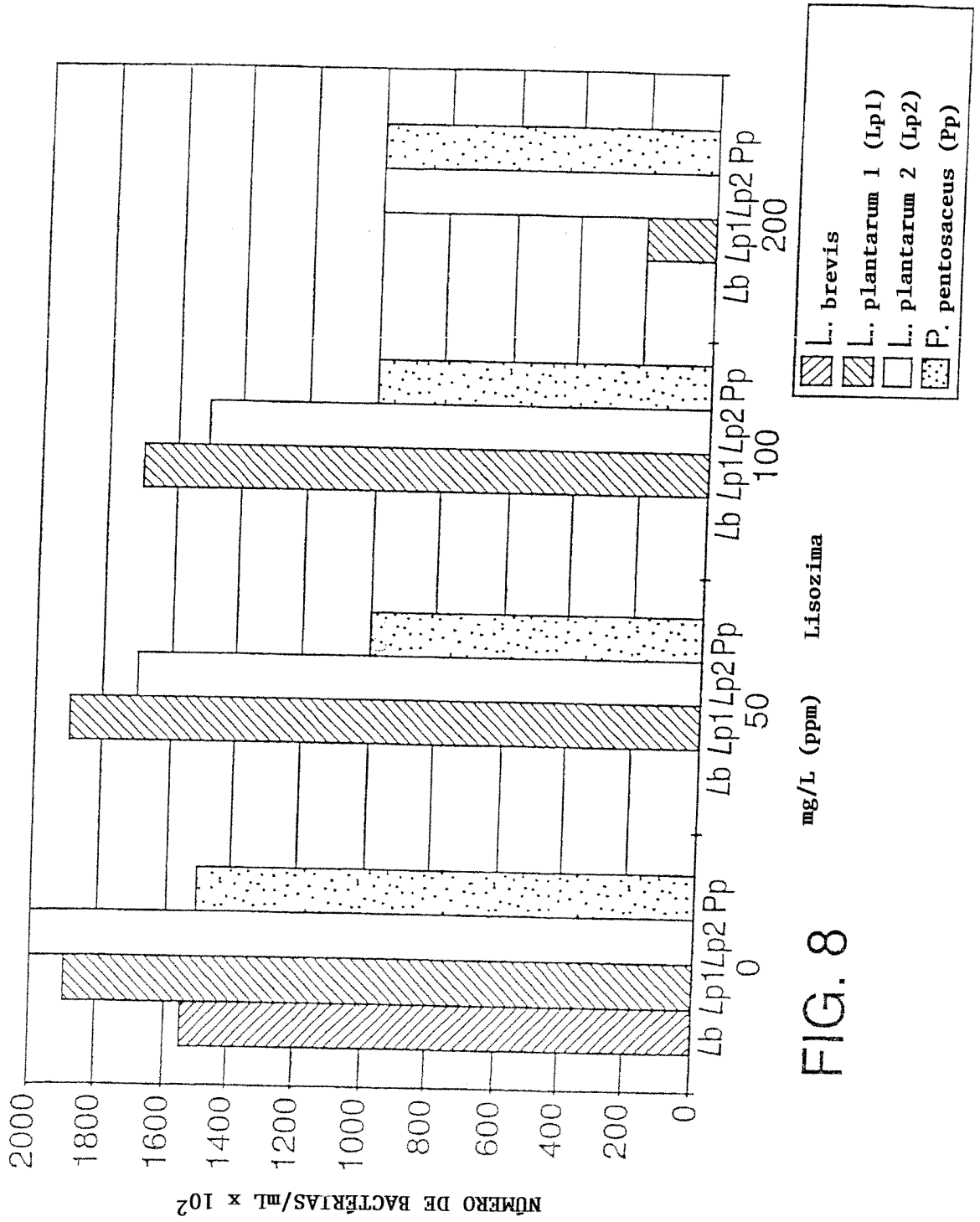


FIG. 8

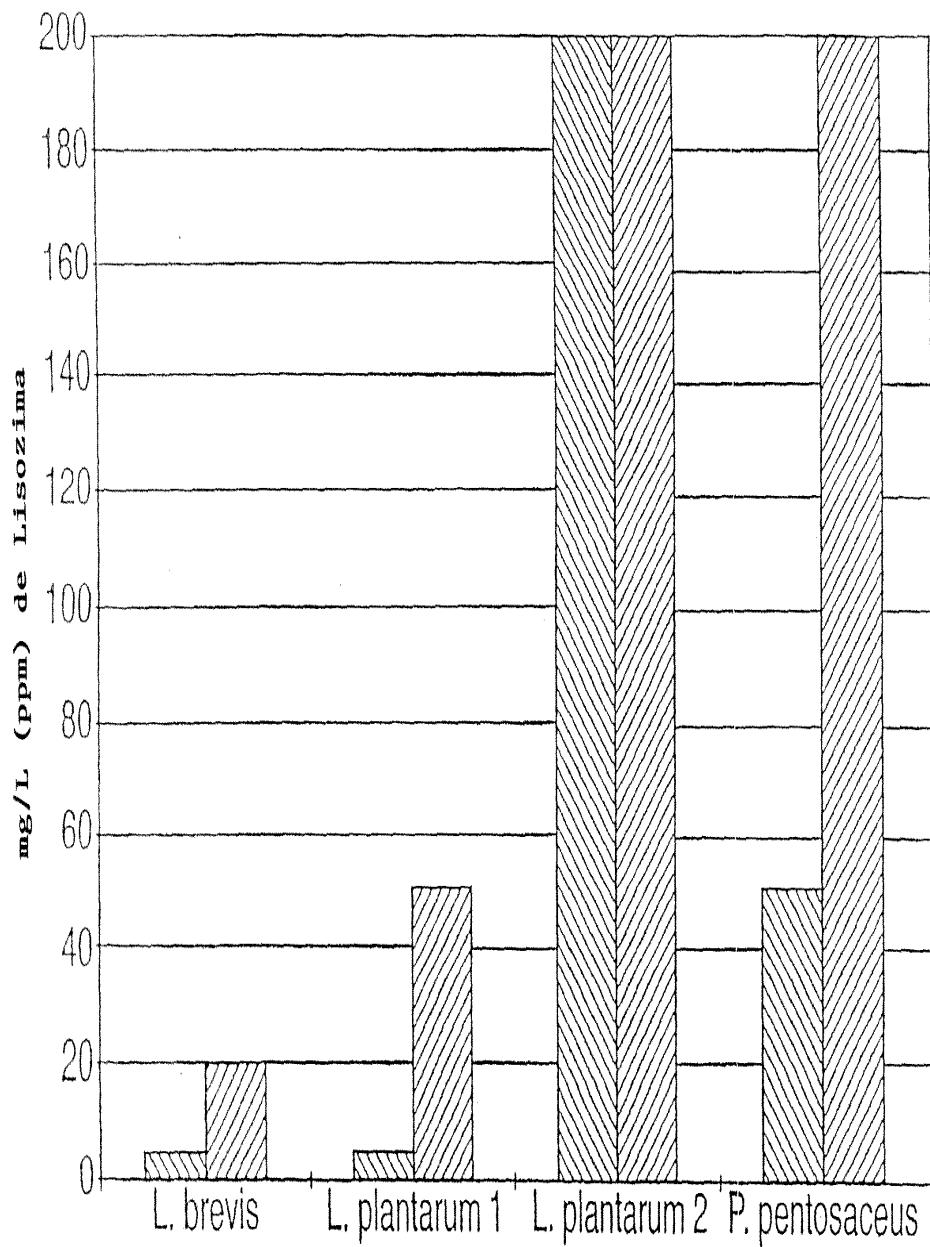
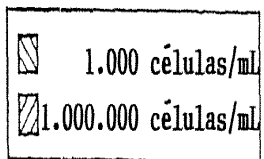


FIG. 9

BACTÉRIAS LÁCTICAS



5/5