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

(21) PI 1006908-9 A2

* B R P I 1 0 0 6 9 0 8 A 2 *

(22) Data do Depósito: 15/01/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: MÉTODO PARA TRATAMENTO DE UM MATERIAL DE PLANTA QUE CONTÉM LIPÍDEO, COMPOSIÇÃO E SEU USO E PRODUTO ALIMENTÍCIO

(51) Int. Cl.: A23L 1/105; A21D 8/04.

(30) Prioridade Unionista: 01/04/2009 EP 09157090.3; 16/01/2009 EP 09150744.2; 16/01/2009 US 61/145,366; 26/01/2009 EP 09151352.3; 26/01/2009 US 61/147,412.

(71) Depositante(es): DANISCO A/S.

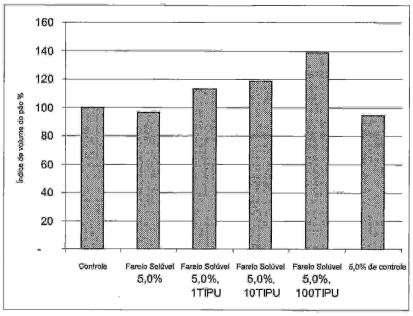
(72) Inventor(es): JENS FRISBÆK SØRENSEN; RENE MIKKELSEN; CHARLOTTE HORSMANS POULSEN; KARSTEN MATTHIAS KRAGH.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010050445 de 15/01/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/081869 de 22/07/2010

(85) Data da Fase Nacional: 15/07/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA TRATAMENTO DE UM MATERIAL DE PLANTA QUE CONTÉM LIPÍDEO, COMPOSIÇÃO E SEU USO E PRODUTO ALIMENTÍCIO. A presente invenção refere-se à modificação de lipídeios em material de planta que contém lipídeo, tal como farelo de cereal para a geração de lipídeos funcionais. A presente invenção refere-se ainda a preparação de composição que compreendem tais lipídeos funcionais assim como o uso dessas composições que compreendem tais lipídeos funcionais e outros compostos funcionais derivados da ação de enzimas que modificam lipídeos para a preparação de uma composição adequada para a preparação de bio-etanol, assim como produtos alimentícios, tal como o pão.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA TRATAMENTO DE UM MATERIAL DE PLANTA QUE CONTÉM LIPÍDEO, COMPOSIÇÃO E SEU USO E PRODUTO ALIMENTÍCIO".**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à modificação de lipídeos em material de planta que contém lipídeo, tal como farelo de cereal para a geração de lipídeos funcionais. A presente invenção refere-se ainda a preparação de composições que compreendem tais lipídeos funcionais assim como o uso dessas composições que compreendem os lipídeos funcionais e outros compostos funcionais derivados da ação de enzimas que modificam lipídeos para a preparação de uma composição adequada para a preparação de bioetanol, assim como produtos alimentícios, tal como o pão.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A utilização de fluxos colaterais do processamento de resíduos de fermentação de materiais de planta, tais como farelo de cereal da moagem ou grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) tem recebido pouca atenção além do uso em rações para animais.

O uso benéfico de enzimas lipolíticas (E.G. 3.1.1.x) em aplicações na indústria alimentícia e/ou de ração para animais é conhecido há muito tempo.

Entretanto, a maioria das técnicas anteriores descreve o uso de enzimas lipolíticas na farinha e na massa e não para produtos colaterais ou subprodutos de processos industriais. Por exemplo, na EP 0 585 988 é reivindicado que a adição de lipase a massa resultou no aperfeiçoamento do efeito antiendurecimento. WO94/04035 ensina que a maciez melhorada do pão pode ser obtida pela adição de lipase à massa sem a adição de qualquer gordura/óleo adicional à massa.

O substrato para lipases em material de planta é uma mistura complexa de lipídeos polares e não polares. Os lipídeos polares podem ser divididos em glicolipídeos e fosfolipídeos. Esses lipídeos são constituídos por glicerol esterificado com dois ácidos graxos e um grupo polar. O grupo polar contribui para a atividade de superfície desses lipídeos.

A clivagem enzimática de um dos ácidos graxos nesses lipídeos leva a lipídeos com atividade superficial muito maior. É bem conhecido que os emulsificantes, tais como DATEM, com atividade de superfície elevada são muito funcionais quando adicionados a massa.

As enzimas lipolíticas hidrolisam um ou mais ácidos graxos dos lipídeos presentes no material de planta o que pode resultar na formação de moléculas emulsificantes poderosas.

Na EP 1 193 314, os inventores descobriram que o uso de enzimas lipolíticas ativas sobre glicolipídeos era particularmente benéfico em aplicações na fabricação de pão.

Morrison et al., J. Sci. Food Agric. 1981, 32, 579-587 descrevem a distribuição de lipídeos da semente do trigo macio nas frações de moídas de farinha.

Há uma necessidade na técnica de uma melhor utilização de produtos colaterais do processamento de materiais de planta, tais como farelo de cereal da moagem, pastas de neutralização do refino de óleos vegetais, grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), na qual menos material de planta vá para aplicações de baixo preço como ração para o gado. Adicionalmente, há uma necessidade há muito sentida de ser capaz de utilizar a fração de farelo de cereais em produtos de cereais tradicionalmente já existentes, sem impacto significativo sobre a aparência/estrutura, a cor ou o sabor do produto e para tornar possível aumentar o efeito sobre a saúde e nutricional de produtos já existentes.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

É um objetivo da presente invenção fornecer métodos para a geração de lipídeos funcionais a partir de material de planta em geral e de produtos colaterais industriais em particular. É um objetivo adicional da presente invenção fornecer métodos adequados que possibilitem a utilização de composições que compreendam os lipídeos funcionais derivados de material de planta, tal como o farelo em produtos alimentícios tradicionais, tais como no pão ou produtos de cereais, sem impacto significativo sobre a aparência/estrutura, a cor ou o sabor do produto e para tornar possível aumentar o

efeito sobre a saúde e nutricional de produtos já existentes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um amplo aspecto, a presente invenção refere-se a métodos para o tratamento de material de planta que contém lipídeos com enzimas que modificam os lipídeos, para a geração de lipídeos modificados, tais como lipídeos funcionais a partir de materiais de planta.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para o tratamento de material de planta, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta que contenha lipídeos parcialmente solubilizados com uma ou mais enzimas que modifiquem o lipídeo.

Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende lipídeos e/ou lipídeos modificados, tal como um lipídeo funcional produzido por um método para o tratamento de material de planta que contém lipídeo, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta que contenha lipídeos parcialmente solubilizados com uma ou mais enzimas que modifiquem o lipídeo.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de uma composição que compreenda lipídeos e/ou lipídeos modificados, tal como um lipídeo funcional produzido por um método para o tratamento de material de planta que contém lipídeo, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta que contenha lipídeos parcialmente solubilizados com uma ou mais enzimas que modifiquem o lipídeo, o uso sendo para a produção de um produto alimentício.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma composição que compreenda lipídeos e/ou lipídeos modificados, tal como um lipídeo funcional produzido por um método para o tratamento de material de planta que contém lipídeo, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta que contenha lipídeos parcialmente solubilizados com uma ou mais enzimas que

modifiquem o lipídeo, o uso sendo para a produção de bioetanol.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um produto alimentício obtido pelo uso de uma composição que compreenda lipídeos e/ou lipídeos modificados, tal como um lipídeo funcional produzido por um método para o tratamento de material de planta que contém lipídeo, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta que contenha lipídeos parcialmente solubilizados com uma ou mais enzimas que modifiquem o lipídeo.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao bioetanol obtido pelo uso de uma composição que compreenda lipídeos e/ou lipídeos modificados, tal como um lipídeo funcional produzido por um método para o tratamento de material de planta que contém lipídeo, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta que contenha lipídeos parcialmente solubilizados com uma ou mais enzimas que modifiquem o lipídeo.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um kit em partes compreendendo

a) uma combinação de enzimas que compreende: uma ou mais enzimas que modificam o lipídeo; uma ou mais enzimas que modifiquem a parede celular e, opcionalmente, uma ou mais enzimas adicionais;

b) instruções para uso em um método de acordo com a invenção; e

c) opcionalmente, outros ingredientes para a preparação de um produto alimentício.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Resultados do teste de cozedura. Vol. rel. dos pães versus branco (%). As colunas representam o volume do pão para os testes números 1-6 de acordo com as tabelas 5 e 6.

Figura 2. Pães obtidos a partir da cozedura com frações obtidas de farelo solúvel. Os números referem-se aos números na tabela 5.

Figura 3. Resultados do teste de cozedura. Vol. rel. dos pães versus branco (%). As colunas representam os experimentos do teste de

cozedura de acordo com a tabela 12.

Figura 4. Pães obtidos a partir da cozedura com frações obtidas de farelo solúvel. Os números referem-se aos números na tabela 12.

Figura 5. Resultados do teste de cozedura. Vol. rel. dos pães versus branco (%). As colunas representam os experimentos do teste de cozedura de acordo com a tabela 17 e 18.

Figura 6. Pães obtidos a partir da cozedura com frações obtidas de farelo solúvel. Os números referem-se aos números na tabela 18.

Figura 7. Pães obtidos a partir da cozedura com frações obtidas de farelo modificado. Os números referem-se aos números na tabela 24.

Figura 8. Pães obtidos a partir da cozedura com extratos de farelo de arroz modificado. Os números referem-se aos números na tabela 30.

Figura 9. Pães obtidos a partir da cozedura com frações obtidas de farelo modificado. Os números referem-se aos números na tabela 36.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Quantidades consideráveis de produtos colaterais do processamento de materiais de planta, tais como farelo de cereal da moagem, pastas de neutralização do refino de óleos vegetais, grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), etc., estão disponíveis como material bruto para gerar lipídeos funcionais que podem servir como emulsificantes em diferentes aplicações como aplicações em alimentos, aplicações em ração, amaciantes na produção de materiais plásticos, etc.

Aqui, mostrou-se que a modificação da fração de lipídeo em, por exemplo, farelo de trigo, é significativamente aumentada se o material for cotratado com outras enzimas como as enzimas que modificam a parede da célula e, em algumas modalidades, também com enzimas que modificam o amido. Pela combinação dessas classes de enzimas, observou-se a funcionalização dos lipídeos que não podem ser obtidos usando apenas as lipases.

Os lipídeos modificados gerados podem ser usados, por exemplo, na panificação, pela adição da fração solúvel isolada ou pela adição da composição completa do farelo tratado com a enzima contendo os lipídeos

modificados que possuem propriedades emulsificantes.

Portanto, as composições geradas pelos métodos de acordo com a presente invenção podem ser usadas como solúveis isolados. Entretanto, as composições também podem ser usadas como uma mistura de solúveis e insolúveis, isto é, material de planta em solução, tal como material residual de farelo. Deve ser compreendido que parte da fração lipídica ainda pode estar presente nessa fração residual em solução.

A expressão "material de planta que contém lipídeo", como usada aqui, refere-se a qualquer material que compreenda quantidades significativas de material derivado de uma planta que contenha quantidades endógenas de lipídeos. Adequadamente, o material de planta pode ser obtido em grandes quantidades, contém uma quantidade significativa de lipídeos e pode ser usado em processos industriais.

Em algumas modalidades, o material de planta que contém lipídeo é um produto colateral ou subprodutos de processos industriais. Em algumas modalidades, o material de planta também pode confer um material de não planta, tal como um subproduto de uma fermentação, que pode conter células de levedura.

Em algumas modalidades particulares, o material de planta que contém lipídeo é um farelo de cereal, tal como, por exemplo, o farelo de trigo da moagem tradicional.

Em algumas modalidades, uma quantidade de pelo menos cerca de 100 mg, tal como pelo menos cerca de 200 mg, tal como pelo menos cerca de 300 mg por 100 g do peso seco do material que contém lipídeo é de fosfolipídeo.

Em algumas modalidades, uma quantidade de pelo menos cerca de 10 mg, tal como pelo menos cerca de 20 mg, tal como pelo menos cerca de 30 mg por 100 g do peso seco do material de planta que contém lipídeo é de fosfatidilinositol (PI).

A frase "material de planta que contém lipídeo parcialmente solubilizado", como usada aqui, refere-se ao material de planta que contém lipídeos e que tenham sido solubilizados pelo menos parcialmente pela ação

enzimática ou mecânica.

A expressão "cereal" como usada aqui refere-se aos frutos de uma planta da família Poaceae, tal semente contendo pelo menos o farelo que compreende a aleurona e o endosperma rico em amido, com ou sem a presença adicional do pericarpo, revestimento da semente (alternativamente chamado de noz) e/ou germe. A expressão inclui, mas não está limitada a espécies tais como o trigo, cevada, aveia, espelta, centeio, sorgo, milho e arroz.

A expressão "farelo", como usada aqui, refere-se a uma fração do cereal derivada da moagem enriquecida com qualquer um ou todos os tecidos a serem selecionados entre a aleurona, pericarpo e revestimento da semente, quando comparada com a semente intacta correspondente.

A expressão "solubilização" como usada aqui refere-se à solubilização de material de planta, tal como farelo de cereal, nos métodos de acordo com a invenção e é pretendido incluir qualquer grau de solubilização. Consequentemente, a "solubilização" pode ser para obter um material 100% solúvel ou ela pode ser para obter um grau de solubilização menor do que 100%, tal como menos do que 70%, tal como na faixa de 30%-60%. Em algumas modalidades, o grau de solubilização é determinado sobre a massa seca versus massa seca de farelo.

A expressão "pelo menos parcialmente solubilizado", como usada aqui, refere-se a um grau de solubilização que é maior do que 1%, tal como tão alto quanto 5%, tal como tão alto quanto 10%. Deve ficar compreendido que a ação das enzimas que modificam o lipídeo pode não funcionar otimamente de acordo com a invenção, se o material de planta não for solubilizado até um certo grau. Nos aspectos específicos de acordo com a presente invenção, nos quais as enzimas que modificam lipídeo são adicionadas para funcionar simultaneamente com o tratamento para obter a solubilização, tal como um tratamento com uma ou mais enzimas que modificam a parede celular, a solubilização e a ação das enzimas que modificam lipídeo ocorrerão ao mesmo tempo.

A expressão "fração de moagem", como usada aqui, refere-se a

todas ou parte das frações que resultam da redução mecânica do tamanho dos grãos através de, por exemplo, mas não limitado ao corte, esmagamento, trituração, quebra ou moagem, com ou sem o fracionamento através de, por exemplo, mas não limitado a peneiramento, seleção, filtração, assopramento, aspiração, filtração centrífuga, filtração por ar, separação eletrostática ou separação por campo elétrico.

No contexto da presente invenção, "lipídeos funcionais" referem-se a lipídeos que possuem um efeito sobre o produto, no qual o lipídeo funcional é usado. Em algumas modalidades particulares, os lipídeos funcionais são emulsificadores ou outros beneficiadores de alimento.

No contexto da presente invenção, "enzima que modifica a parede celular", refere-se a qualquer enzima capaz de hidrolisar ou modificar o complexo da matriz de polissacarídeos da parede celular da planta, tal como qualquer enzima que possua atividade no "ensaio de solubilização da parede celular" incluído aqui. Dentro dessa definição de "enzima que modifica a parede celular" estão incluídas as celulases, tais como a celobiohidrolase I e celobio-hidrolase II, endoglicanases e beta-glicosidases e as enzimas hemicelulolíticas, tais como as xilanases.

A expressão "celulases" ou "enzimas celulolíticas" como usada aqui é entendida como compreendendo as celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91), por exemplo, a celobiohidrolase I e celobiohidrolase II, assim como as endoglicanases (EC 3.2.1.4) e beta-glicosidases (EC 3.2.1.21).

Estão incluídas dentro da definição de celulases: endoglicanases (EC 3.2.1.4) que cortam as cadeias de celulose ao acaso; celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91) que clivam as unidades de celobiosil das terminações da cadeia de celulose e as beta-glicosídases (EC 3.2.1.21) que convertem a celobiose e as celodextrinas solúveis em glicose. Entre essas três categorias de enzimas envolvidas na biodegradação da celulose, as celobio-hidrolases são as enzimas principais para a degradação da celulose cristalina nativa. A expressão "celobiohidrolase I" é definida aqui como uma atividade de celulose 1,4-beta-cebiosidase (também referida como exoglicanase, exo-celobiohidrolase ou 1,4-beta-celobio-hidrolase), como definida na classe de enzi-

mas EC 3.2.1.91, que catalisa a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas na celulose e na celotetraose, pela liberação de celobiose das extremidades não reduzidas das cadeias. A definição da expressão "atividade de celobio-hidrolase II" é idêntica, exceto que a celobio-hidrolase II ataca as extremidades reduzidas das cadeias.

As celulases podem compreender um módulo de ligação a carboidrato (CBM) que intensifica a ligação da enzima com uma fibra que contém celulose e aumenta a eficácia da parte ativa catalítica da enzima. Um CBM é definido como uma sequência de aminoácidos contígua dentro de uma enzima ativa em carboidrato com um enovelamento diferente que possui atividade de ligação ao carboidrato. Para informações adicionais de CBMs veja o servidor da internet CAZy (Supra) ou Tomme et al. (1995) em Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides (Saddler and Penner, eds.), Cellulose- binding domains: classification and properties, pp. 142-163, American Chemical Society, Washington. Em uma modalidade preferida, as celulases ou enzimas celulolíticas podem ser uma preparação celulolítica como definida no pedido U.S. nº 60/941.251, que está incorporado aqui por referencia. Em uma modalidade preferida, a preparação celulolítica compreende um polipeptideo que possui atividade de intensificação celulolítica (GH61A), preferivelmente aquele descrito no WO2005/074656. A enzima que modifica a parede celular pode ser adicionalmente uma beta-glicosidase, tal como uma beta-glicosidase derivada de uma cepa do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* ou *Penicillium*, incluindo a proteína de fusão que possui atividade de beta-glicosidase descrita no pedido U.S. nº 60/832.511 (Novozymes). Em algumas modalidades, a enzima que modifica a parede celular é uma CBH II, tal como a celobiohidrolase II de *Thielavia terrestris* (CEL6A). Em algumas modalidades, a enzima que modifica a parede celular é uma enzima celulase, tal como aquela derivada de *Trichoderma reesei*.

A atividade celulolítica pode, em algumas modalidades, ser derivada de uma fonte fúngica, tal como uma cepa do gênero de *Trichoderma*, tal como uma cepa de *Trichoderma reesei*; ou uma cepa do gênero *Humicola*, tal como uma cepa de *Humicola insolens*.

Em algumas modalidades, a enzima que modifica a parede celular é um polipeptídeo que tem atividade de intensificação celulolítica (GH61A) descrita no WO 2005/074656; uma celobio-hidrolase, tal como uma celobio-hidrolase II de *Thielavia terrestris* (CEL6A), uma beta-glicosidase (por exemplo, a proteína de fusão descrita no pedido U.S. nº 60/832.511) e enzimas celulolíticas, por exemplo, derivadas de *Trichoderma reesei*.

Em algumas modalidades, a enzima que modifica a parede celular é um polipeptídeo que possui atividade de intensificação celulolítica (GH61A) descrita no WO 2005/074656; uma beta-glicosidase (por exemplo, a proteína de fusão descrita no pedido U.S. no. 60/832.511) e enzimas celulolíticas, por exemplo, derivadas de *Trichoderma reesei*. Em algumas modalidades, a enzima que modifica a parede celular é um produto comercialmente disponível, tal como GC220 disponibilizado pela Genencor, A Danisco Division, US ou CELLUCLAST® 1,5L ou CELLUZYME® disponibilizadas por Novozymes A/S, Dinamarca.

As endoglicanases (EC 3.2.1.4) catalisam a endo-hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas na celulose, derivados de celulose (tais como carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose), liquenina, ligações beta-1,4 em beta-1,3 glicanos mistos, tais como beta-D-glicanos ou xiloglicanos de cereal ou de outro material de planta que contenha partes celulósicas. O nome autorizado é endo-1,4-beta-D-glican 4-glicano hidrolase, mas a expressão abreviada endoglicanase é usada no presente pedido. A atividade de endoglicanase pode ser determinada de acordo com o procedimento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59:257-268.

Em algumas modalidades, as endoglicanases podem ser derivadas de uma cepa do gênero *Trichoderma*, tal como uma cepa de *Trichoderma reesei*; ou uma cepa do gênero *Humicola*, tal como uma cepa de *Humicola insolens*; ou uma cepa de *Chrysosporium*, preferivelmente uma cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

A expressão "celobiohidrolase" significa uma 1,4-beta-D-glican celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) que catalisa a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas na celulose, celooligossacarídeos ou qualquer polímero que

contenha glicose beta-1,4 ligada, liberando a celobiose das extremidades reduzidas ou não reduzidas da cadeia.

Exemplos de celobio-hidrolases estão mencionados acima incluindo CBH I e CBH II de *Trichoderma reesei*; *Humicola insolens* e CBH II de celobio-hidrolase de *Thielavia terrestris* (CELL6A).

A atividade de celobiohidrolase pode ser determinada de acordo com os procedimentos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279 e por van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeyssens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288. O método de Lever et al. é adequado para avaliar a hidrólise da celulose na palha do milho e o método de van Tilbeurgh et al. é adequado para determinar a atividade de celobio-hidrolase em um derivado de dissacarídeo fluorescente.

A expressão "beta-glicosidase" significa uma beta-D-glicosídeo glicoidrolase (E.C. 3.2.1.21), que catalisa a hidrólise de resíduos de beta-D-glicose terminais não reduzidos com a liberação de beta-D-glicose. Para os propósitos da presente invenção, a atividade de beta-glicosidase é determinada de acordo com o procedimento básico descrito por Venturi et al., 2002, J. Basic. Microbiol. 42:55-66, exceto por condições diferentes que foram empregadas como aqui descrito. Uma unidade de atividade de beta-glicosidase é definida como 1,0 µmol de p-nitrofenol produzido por minuto a 500C, pH 5 a partir de p-nitrofenol-beta-D-glicopiranosídeo 4 mM como substrato em citrato de sódio 100 mM, TWEEN® 20 0,01%.

Em algumas modalidades, a beta-glicosidase é de origem fúngica, tal como uma cepa do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* ou *Penicillium*. Em algumas modalidades, a beta-glicosidase é derivada de *Trichoderma reesei*, tal como a beta-glicosidase codificada pelo gene bgl1 (veja EP 562003). Em outra modalidade, a beta-glicosidase é derivada de *Aspergillus oryzae* (produzida recombinantemente em *Aspergillus oryzae* de acordo com o WO 02/095014), *Aspergillus fumigatus* (produzida recombinantemente em *Aspergillus oryzae* de acordo com o Exemplo 22 do WO 02/095014) ou *Aspergillus niger* (1981, J. Appl. 3:157-163).

As expressões "enzimas hemicelulolíticas" ou "hemicelulases",

como usadas aqui, referem-se a enzimas que podem quebrar a hemicelulose.

Qualquer hemicelulase adequada para uso na hidrólise da hemicelulose, preferivelmente, em oligossacarídeos de arabinoxilano, pode ser usada. As hemicelulases preferidas incluem as xilanases, arabinofuranosidases, acetil xilano esterase, feruloil esterase, glicuronidases, galactanase, endo-galactanase, manases, endo ou exo arabinases, exo-galactanases, pectinase, xiloglicanase ou misturas de duas ou mais dessas. Um exemplo de hemicelulase adequada para uso na presente invenção inclui Grindamyl Powerbake 930 (disponibilizada por Danisco A/S, Dinamarca) ou VISCOZYM E® (disponibilizada por Novozymes A/S, Dinamarca). Em uma modalidade, a hemicelulase é a xilanase. Em uma modalidade, a xilanase é de origem microbiana, tal como de origem fúngica (por exemplo, *Trichoderma, Meripilus, Humicola, Aspergillus, Fusarium)* ou de uma bactéria (por exemplo, *Bacillus*). Em algumas modalidades, a xilanase é derivada de um fungo filamentoso, preferivelmente derivada de uma cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*; ou de uma cepa de *Humicola*, preferivelmente *Humicola lanuginosa*. A xilanase pode ser, preferivelmente, uma endo-1,4-beta-xilanase, mais preferivelmente uma endo-1,4-beta-xilanase de GH 10 ou GH 11. Exemplos de xilanases comerciais incluem Grindamyl H121 ou Grindamyl Powerbake 930 da Danisco A/S, Dinamarca ou SHEARZYME® e BIOFEED WHEAT® da Novozymes A/S, Dinamarca.

A arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) catalisa a hidrólise de resíduos de alfa-L-arabinofuranosídeo terminais não reduzidos em alfa-L-arabinosídeos. A galactanase (EC 3.2.1.89), arabinogalactana endo-1,4-beta-galactosidase, catalisa a endo-hidrólise de ligações 1,4-D-galactosídicas em arabinogalactanos.

A pectinase (EC 3.2.1.15) catalisa a hidrólise de ligações 1,4-alfa-D-galactossídurônicas em pectato e outros galacturonanos.

A xiloglicanase catalisa a hidrólise de xiloglicano.

A expressão "xilanase", como usada aqui, refere-se a uma enzima que é capaz de hidrolisar a ligação beta-1,4-glicosila em unidades não

terminais de beta-D-xilanopiranosil-1,4-beta-D-xilanopiranosil de xilano ou arabinoxilano. Outros nomes incluem 1,4-beta-D-xilan xilano hidrolase, 1,4-beta-xilan xilano hidrolase, beta-1,4- xilan xilano hidrolase, (1-4)-beta-xilan 4-xilano hidrolase, endo-1,4-beta-xilanase, endo-(1-4)-beta-xilanase, endo-beta-1,4-xilanase, endo-1,4-beta-D-xilanase, endo- 1,4-xilanase, xilanase, beta-1,4-xilanase, beta-xilanase, beta-D-xilanase. As xilanases podem ser derivadas de uma variedade de organismos, incluindo plantas, fungos (por exemplo, espécies de *Aspergillus, Penicillium, Disporotrichum, Neurospora, Fusarium, Humicola, Trichoderma*) ou espécies bacterianas (por exemplo, espécies de *Bacillus, Aeromonas, Streptomyces, Nocardiopsis, Thermomyces*) (veja, por exemplo, WO92/17573, WO92/01793, WO91/19782, WO94/21785).

Em um aspecto da invenção, a xilanase usada nos métodos da invenção é uma enzima classificada como EC 3.2.1.8. O nome oficial é endo-1,4-beta-xilanase. O nome sistemático é 1,4-beta-D-xilano xilano hidrolase. Outros nomes podem ser usados, tais como endo-(1-4)-beta-xilanase; (1-4)-beta-xilan- 4-xilano hidrolase; endo-1,4-xilanase; xilanase; beta-1,4-xilanase; endo-1,4-xilanase; endo-beta-1,4-xilanase; endo-1,4-beta-D-xilanase; 1,4-beta-xilano xilano hidrolase; beta-xilanase; beta-1,4-xilano xilano hidrolase; endo-1,4-beta-xilanase; beta-D-xilanase. A reação catalisada é a endo-hidrólise de ligações 1,4-beta-D-xilosídicas nos xilanos.

Em um aspecto da invenção, a xilanase da invenção é uma xilanase da Família 11 de Glicosídeo Hidrolase (GH). A expressão "da Família 11 de Glicosídeo Hidrolase (GH)" significa que a xilanase em questão é ou pode set classificada na família 11 de GH.

Em um aspecto da invenção, a xilanase usada de acordo com a invenção é uma xilanase que possui atividade de xilanase como medida no "ensaio da Xilanase" como aqui descrito.

De acordo com o site CAZy (ModO), a Família 11 das glicosídeo hidrolases pode ser caracterizada como a seguir:

Atividades Conhecidas: xilanase (EC 3.2.1.8)

Mecanismo: Retenção

Nucleófilo/Base Catalítico: Glu (experimental)

Doador de Próton Catalítico: Glu (experimental)

Estado da Estrutura 3D: Enovelada: β-superenrolada

Clã: GH-C

Como usada aqui, "Clã C" refere-se a agrupamentos de famílias que partilham um enovelamento tridimensional comum e um maquinário catalítico idêntico (veja, por exemplo, Henrissat, B. e Bairoch, A., (1996) Biochem. J., 316, 695-696).

Como usado aqui, "Família 11" refere-se a uma família de enzimas como estabelecido por Henrissat, B. e Bairoch, A., (1993) Biochem. J., 293, 781-788 (veja também Henrissat e Davies (1997) Current Opinion in Structural Biol. 1997, &:637-644). Os aspectos em comum para os membros da família 11 incluem elevada homologia genética, um tamanho de cerca de 20 kDa e um mecanismo de deslocamento catalítico duplo (veja Tenkanen et al., 1992; Wakarchuk et al., 1994). A estrutura das xilanases da família 11 inclui duas folhas β grandes feitas de fitas β e hélices α.

A família 11 das xilanases inclui as seguintes: XynA de *Aspergillus niger*, XynC de *Aspergillus kawachii*, XynA de *Aspergillus tubiensis*, XynA de *Bacillus circulans*, XynA de *Bacilluspunzilus*, XynA de *Bacillus subtilis*, XynA de *Neocalliniastix patriciarum*, XynB de *Streptomyces lividans*, XynC de *Streptomyces lividans*, XynII de *Streptomyces therinoviolaceus*, XynA de *Thermomonospora fusca*, Xyn de *Trichoderma harzianum*, XynI de *Trichoderma reesei*, XynII de *Trichoderma reesei*, Xyn de *Trichodermaviride*.

No contexto da presente invenção, "enzima que modifica o amido" refere-se a qualquer enzima que catalise a hidrólise de ligações α-1,3 e/ou α-1,6 glicosídicas em glicosídeos. Estão incluídas dentro dessa expressão as glicosídeo hidrolases, nomeadas tipicamente depois do substrato sobre o qual elas atuam. Em algumas modalidades de acordo com a invenção, a "enzima que modifica o amido" é selecionada entre lactase, amilase, pululanase, isoamilase, quitinase, sucrase, maltase, neuraminidase, invertase, hialuronidase e lisozima.

Em algumas modalidades, a enzima que modifica o amido é

uma enzima que desramifica o amido.

Em um aspecto da invenção, a enzima que modifica o amido, usada de acordo com a invenção, é uma enzima que possui atividade de desramificação do amido como medida no "ensaio de atividade de desramificação do amido" como aqui descrito.

As enzimas que desramificam o amido incluem a pululanase (EC 3.2.1.41) e a isoamilase (EC 3.2.1.68). Elas hidrolisam as ligações α-1,6-D-glicosídicas, dextrinas β-limite e pululanas. As isoamilases podem ser distinguidas das pululanases (EC 3.2.1.41) pela inabilidade da isoamilase em atacar a pululana e pela ação limitada sobre dextrinas α-limite.

Por "amilase" pretende-se incluir qualquer amilase, tal Omo as glicoamilases, α-amilase, β-amilases e α-amilases de tipo selvagem de *Bacillus* sp., tal como de *B. subtilis* e *B. licheniformes*. "Amilase" deve significar uma enzima que seja, entre outras coisas, capaz de catalisar a degradação do amido. As amilases são hidrolases que clivam as ligações α-D-(l→4) O-glicosídicas do amido. Geralmente, as α-amilases (EC 3.2.1.1; (X-D-(l →4)-glicano glicanohidrolase) são definidas como enzimas endo-atuantes que clivam as ligações α-D-(l— »4) O-glicosídicas dentro da molécula de amido de uma maneira aleatória. As enzimas amilolíticas exo-atuantes, tais como as β-amilases (EC 3.2.1.2; α-D-(l→4)-glucano malto-hidrolase) e algumas amilases específicas para um produto, como a α-amilase maltogênica (EC 3.2.1.133) clivam a molécula de amido da terminação não reduzida do substrato, β- Amilases, α-glicosidases (EC 3.2.1.20; α-D-glicosideo glucohidrolase), glicoamilase (EC 3.2.1.3; α-D-(l-→4)-glicano glicohidrolase), e amilases específicas para um produto podem produzir glicose a partir do amido.

Por "α-amilase variante", "polipeptídeo de α-amilase variante" e "enzima variante" entende-se uma α-amilase que tenha sido modificada pela substituição de resíduos de aminoácidos na terminação amino da proteína α-amilase madura. Como usado aqui, "enzimas parentais", "sequência parental", "polipeptídeo parental", "proteína α-amilase de tipo selvagem" e "polipeptídeos parentais" significam enzimas e polipeptídeos a partir dos quais os polipeptídeos de α-amilase variante são derivados. A enzima parental pode

ser uma enzima de tipo selvagem ou uma α-amilase que tenha sido previamente manipulada recombinantemente. A α-amilase variante pode incluir adicionalmente mutações na sequência de sinal do polipeptídeo parental de α-amilase ou em outro lugar do polipeptídeo parental de α-amilase. Portanto, o polipeptídeo de α-amilase pode ser uma enzima recombinantemente manipulada.

Em um aspecto da invenção, a α-amilase usada de acordo com a invenção é uma α-amilase que possui atividade de α-amilase como medida no "ensaio de α-amilase" aqui descrito.

Em um aspecto da invenção, a beta-amilase usada de acordo com a invenção é uma beta-amilase que possui atividade de beta-amilase como medida no "ensaio de beta-amilase" aqui descrito.

A expressão "pululanase" refere-se a um tipo específico de glicanase, uma endoenzima amilolítica que degrada a pululana. Ela é produzida como, por exemplo, uma lipoproteína ancorada a superfície da célula, extracelular por bactérias Gram negativas do gênero *Klebsiella*. Entretanto, as bactérias Gram-negativas produzem pululanases como proteínas secretadas. As pululanases tipo I atacam especificamente ligações α-1,6, enquanto que as pululanases tipo II também são capazes de hidrolisar as ligações α-1,4. Ela também é produzida por algumas outras bactérias e arquebactérias. A pululanase é usada como um detergente em biotecnologia. A pululanase (EC 3.2.1.41) também é conhecida como pulular-6-glicanohidrolase (enzima desramificadora). A pululana é observada como uma cadeia de unidades de maltotriose ligadas por ligações α-1,6-glicosídicas. A pululanase clivará hidroliticamente a pululana (polissacarídeos de α-glicano).

A expressão "enzima de transglicosilação" refere-se a qualquer enzima que possua atividade de transglicosidase, tal como a transglicosidase. A expressão "transglicosidase" refere-se a qualquer enzima que transfira um resíduo α-D-glicosila em um 1,4-α-D-glicano para o grupo hidroxila primário da glicose, livre ou combinado em um 1,4-α-D-glicano. A transglicosidase aqui descrita tem uma atividade descrita como EC 2.4.1.24, de acordo com a nomenclatura de enzima da IUBMB. O nome sistemático para a

transglicosidase aqui descrita é 1,4-α-D-glicano:1,4-α-D-glicano(D-glicose) 6-α-D-glicosiltransferase. Essa enzima pode ser referida como uma α-glicosidase em certas publicações.

Como observado acima, a enzima transglicosidase geralmente tem uma atividade definida como EC 2.4.1.24 de acordo com a nomenclatura de enzima da IUBMB, cuja atividade transfere os resíduos de glicosila de certos glicanos para o grupo hidroxila primário da glicose. Em algumas modalidades, a enzima também pode ter uma atividade que degrade uma goma de polissacarídeo natural (por exemplo, polissacarídeos que contêm xantana e galactomanana, tais como goma guar ou goma de feijão de lima), pelo corte das cadeias laterais de açúcar ou pela clivagem de ligações internas para quebrar o arcabouço do polissacarídeo. Qualquer enzima transglicosidase adequada encontra uso na presente invenção (veja, por exemplo, Pazur et al., Carbohydr. Res. 1986, 149:137-47; e Nakamura et al., J. Biotechnol. 53:75-84, 1997). Em algumas modalidades, a enzima transglicosidase que encontra uso na presente invenção está disponível comercialmente (por exemplo, incluindo, mas não limitadas a enzimas obtidas de Megazyme, Wicklow, Irlanda; ou Danisco US Inc., Genencor Divisio, Palo Alto, CA). Em algumas modalidades, a enzima é uma transglicosidase de *Aspergillus niger* produzida em células de *Trichoderma reesei*. Em algumas modalidades adicionais, a transglicosidase é uma transglicosidase fúngica de tipo selvagem (por exemplo, incluindo, mas não limitada a transglicosidase fúngica que possui uma sequência de aminoácidos depositada no banco de dados GENBANK® da NCBI como números de acesso: D45356 (GID:2645159; *Aspergillus niger*), BAD06006.1 (GID:4031328; *Aspergillus awamori*), BAA08125.1 {GIO:\054565; *Aspergillus oryzae*), XPJ)OI 210809.1 (GID: 1 15492363; *Aspergillus terreus*), XP_001271891.1 (GID: 121707620; *Aspergillus clavatus*), XPJ)01266999.1 (GID: 1 19500484; *Neosartorya fischeri*), XP 75181 1.1 (GID:70993928; *Aspergillus fumigatus*), XP_659621.1 (GID:67523121; *Aspergillus nidulans*), XP_001216899.1 (GID: 115433524; *Aspergillus terreus*) and XPJ)01258585.1 (GID: 119473371; *Neosartorya fischeri*)) ou uma variante dessas que tenha uma sequência de aminoácidos

que é pelo menos cerca de 70% idêntica, pelo menos cerca de 80% idêntica, pelo menos cerca de 90% idêntica, pelo menos cerca de 95% idêntica ou pelo menos cerca de 98% idêntica a uma transglicosidase de fungo de tipo selvagem.

Em um aspecto da invenção, a transglicosidase usada de acordo com a invenção é uma transglicosidase que possui atividade de transglicosidase como medida no "ensaio de transglicosidase" aqui descrito.

Ensaios de atividade de enzima de acordo com a invenção:

Ensaio de solubilização da parede celular:

Preferivelmente, a solubilidade do farelo é medida usando o seguinte ensaio.

Uma suspensão de farelo de trigo (0,1 M) – tampão fosfato hidrogenado dissódico (0,2 M), pH 5.0, é preparada para uma concentração de farelo de 1,33% (peso/peso). A partir dessa suspensão, alíquotas de 750 µl são transferidas para tubos eppendorph sob agitação. Cada tubo de substrato é preaquecido por 5 minutos a 40°C. Depois disso, 250 µl de solução de enzima são adicionados, tornando a concentração final do substrato de 1%. Três diluições (em duplicata) são feitas a partir de cada composição de enzima de acordo com a invenção, com concentrações crescentes de enzima (por exemplo, 0,33; 1,0 e 3,0 µg de enzima/g de farelo) em cada período de determinação (0, 30, 60 e 240 minutos). Como controle, uma solução desnaturada pelo calor da composição de enzima é usada. A reação é terminada nos períodos determinados, pela transferência dos tubos para uma incubadora ajustada para 95°C. As amostras desnaturadas pelo calor são mantidas a 4°C até que todas as reações enzimáticas tenham terminado. Quando as reações enzimáticas estão finalizadas, os tubos de Eppendorph são centrifugados para se obter um sobrenadante límpido. A capacidade das enzimas de solubilizar o farelo é expressa como o aumento em grupos terminais reduzidos como determinado usando PAHBAH (Lever, 1972).

Se o farelo usado contiver amido residual, as atividades colaterais tais como atividade de amilase, podem interferir com o ensaio acima, o ensaio de solubilização de farelo deve ser realizado apenas em enzimas que

modificam a parede celular modificadas (que não possuem atividade de amilase).

Alternativamente, o grau de solubilização pode ser medido de acordo com o seguinte método:

o grau de solubilização de um material de planta, por exemplo, farelo de cereal, pode ser determinado pela suspensão de material de planta insolúvel em um tampão de extração (tipicamente 10-25% de farelo em tampão (peso/peso)) com e sem enzimas, incubando a suspensão sob agitação e 40° C por um tempo controlado (por exemplo, 30 a 1440 minutos). Depois da solubilização, o material solubilizado é separado do material 9insolúvel por centrifugação (20 min, 25000 x g, temperatura ambiente). O conteúdo de matéria seca no sobrenadante é determinado tanto pela liofilização de parte da amostra quanto pela análise da umidade (Analisador de umidade, AND ML-50, Buch & Holm, Dinamarca). Todo o tampão de extração não pode ser recuperado usando esse protocolo, entretanto, é presumido que a concentração de material solúvel é igual no tampão de extração recuperado e no tampão de extração não recuperado, por que é feita uma correção no tampão de extração usado no total. Havendo determinado o conteúdo de matéria seca na fração solúvel, conhecendo a quantidade de material de planta empregado e a quantidade de tampão de extração, o grau de solubilização pode ser determinado usando a seguinte equação.

Grau de solubilização = (((g de matéria seca/ml de sobrenadante recuperado) x (ml de tampão de extração usado)) x 100%)/g de material de planta empregado

Ensaio de xilanase (atividade de endo-β-1,4-xilanase)

As amostras foram diluídas em ácido cítrico (0,1 M) – tampão fosfato hidrogenado dissódico (0,2 M), pH 5.0, para obter aproximadamente OD_{590} = 0,7 nesse ensaio. Três diluições diferentes da amostra foram incubadas por 5 minutos a 40°C. No tempo = 5 minutos, 1 tablete de Xylazyme (reticulada, substrato de xilano corado, Megazyme, Bray, Irlanda) foi adicionado à solução de enzima em um volume de reação de 1 ml. No tempo = 15 minutos, a reação foi terminada pela adição de 10 ml de TRIS/NaOH 2%, pH

12. Os controles foram preparados usando 1000 µl de tampão ao invés da solução de enzima. A mistura de reação foi centrifugada (1500 x g, 10 minutos, 20°C) e a OD do sobrenadante foi medida a 590 nm. Uma unidade de xilanase (XU) é definida como a atividade de xilanase que aumenta a OD_{590} com 0,025 por minuto.

Atividade de α-amilase:

As α-amilases hidrolisam as ligações α-D-1,4-glicosídicas e sua atividade pode ser detectada como uma taxa de mudança de cor de uma solução de amido-iodo devida à hidrólise das ligações alfa-1,4-D.

Atividade de beta-amilase:

A atividade de beta-amilase pode ser detectada como a liberação de maltose da terminação não reduzida de uma solução de amido.

Atividade de transglicosidase:

A transglicosidase catalisa ambas as reações hidrolítica e de transferência na incubação com α-D-glico-oligossacarídeos. A atividade de transglicosidase pode ser detectada como a formação de isomalto-oligossacarídeos tais como a isomaltose, pansose e isomaltriose depois da incubação com maltose ou maltodextrina.

Ensaio de atividade de desramificação do amido:

As enzimas específicas para as ligações α-D-1,6 glicosídicas do amido incluem, atualmente, a isoamilase (EC 3.2.1.68) e pululanases (EC 3.2.1.41). As enzimas que atuam sobre as ligações α-D-1,6 glicosídicas do amido também são classificadas por sua ação sobre a pululana e sua atividade é medida como a hidrólise específica das ligações α-D-1,6 glicosídicas do amido e da pululana.

A expressão "enzima que modifica lipídeo", como usada aqui, refere-se a qualquer enzima que possa modificar um lipídeo.

Em algumas modalidades preferidas, a enzima que modifica o lipídeo é uma enzima lipolítica, tal como a lipase.

A expressão "enzima lipolítica" como usada aqui refere-se a qualquer enzima que hidrolise um ou mais ácidos graxos dos lipídeos presentes em um material de planta, tal como subprodutos de cereal, o que po-

de resultar na formação de lipídeos funcionais dentro do subproduto de cereal, o que fornece valor comercial. As moléculas que contribuem para os efeitos funcionais mais significativos são as moléculas com características emulsificantes, que são os produtos da hidrólise parcial, tais como as moléculas de liso-fosfolipídeos, liso-glicolipídeos e monoglicerídeos. Os produtos da hidrólise de lipídeo polar, tais como os liso-fosfolipídeos e liso-glicolipídeos são particularmente vantajosos na produção de pão e podem dar uma funcionalidade equivalente como emulsificadores, tais como DATEM.

Os substratos para as lipases nos subprodutos de cereal são os lipídeos do farelo que são uma mistura complexa de lipídeos polares e não polares. Os lipídeos polares podem ser divididos em glicolipídeos e fosfolipídeos. Esses lipídeos são os construtores do glicerol esterificado com dois ácidos graxos e um grupo polar. O grupo polar contribui para a atividade de superfície desses lipídeos. A clivagem enzimática de um desses ácidos graxos nesses lipídeos leva a lipídeos com uma atividade de superfície muito maior. É bem sabido que os emulsificadores, tais como DATEM, com atividade de superfície muito alta, são muito funcionais quando adicionados ao alimento.

O uso das lipases (EC 3.1.1.X) em produtos de massa de farinha pode ter um impacto prejudicial sobre a atividade de levedura e/ou um efeito negativo sobre o volume do pão. O efeito negativo sobre o volume do pão é explicado, geralmente, pela superdosagem. A superdosagem pode levar a uma diminuição da elasticidade do glúten o que resulta em uma massa que é muito firme e, portanto, resulta em volumes reduzidos do pão. Adicionalmente ou alternativamente, tais lipases podem degradar a gordura, óleo ou gordura do leite adicionadas à massa, resultando em perda de sabor da massa e do produto assado. A superdosagem e a perda de sabor têm sido atribuídas ao acúmulo de ácidos graxos livres na massa. Em relação a presente invenção, esses efeitos indesejados podem ser evitados já que a lipase é adicionada ao subproduto de cereal como, por exemplo, uma suspensão de farelo de cereal que é usada com ou sem processamento adicional como um beneficiador de massa de farinha. O processamento adicional po-

de ser a diluição, purificação dos lipídeos funcionais. Além disso, os lipídeos funcionais podem ser processados para serem fornecidos como um produto líquido ou como um produto seco formulado, tal como um produto liofilizado.

Nas EP1193314, EP0977869, WO02/094123, WO00/31758 e também no WO01/39602, o uso de enzimas lipolíticas ativas em glicolipídeos foi relatado ser particularmente benéfico na aplicação de produção de pão, já que os produtos da hidrólise parcial, os liso-glicolipídeos, foram encontrados ter uma funcionalidade de emulsificação muito alta, resultando aparentemente em uma proporção maior de funcionalidade de emulsificação positiva comparada com o acúmulo prejudicial de ácidos graxos livres. Entretanto, as enzimas também foram encontradas possuir uma atividade não seletiva significativa sobre os triglicerídeos, o que resultou em aumento desnecessário de ácido graxo livre. Adicionalmente, a aplicação de lipases na fabricação do pão teve a adição de lipase à massa seguida por uma geração in situ de emulsificante na massa.

A lipase pode ser de qualquer origem, por exemplo, de origem animal (tal como, por exemplo, de mamífero), por exemplo, do pâncreas (por exemplo, pâncreas bovino ou porcino) ou de peçonha de cobra ou peçonha de abelha. Alternativamente, a lipase pode ser de origem microbiana, por exemplo, de fungo filamentoso, levedura ou bactérias, tais como o gênero ou espécie *Aspergillus*, por exemplo, *A. niger*, *Dictyostelium*, por exemplo, *D. discoideum*; *Magnaporthe*, por exemplo, *M. grisae*, *Mucor*, por exemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por exemplo, *N. crassa*; *Rhizomucor*, por exemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por exemplo, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, por exemplo, *S. libertiana*; *Trichophyton*, por exemplo, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por exemplo, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por exemplo, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, por exemplo, *C. freundii*; *Enterobacter*, por exemplo, *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por exemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por exemplo, *K. pneumoniae*; *Proteus*, por exemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por exemplo, *P. stuartii*; *Salmonella*, por exemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por exemplo, *S. liquefasciens*, *S. marcescens*; *Shigella*,

por exemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por exemplo, *S. violeceoruber*; *Yersinia*, por exemplo, *Y. enterocolitica*. Portanto, a lipase pode ser fúngica, por exemplo, da classe dos *Pyrenomycetes*, tal como do genero *Fusarium*, tal como uma cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, ou uma cepa de *F. oxysporum*. A fosfolipase também pode ser de uma cepa de fungo filamentoso dentro do genero *Aspergillus*, tal como uma cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus oryzae*.

Uma fonte comercialmente disponivel de enzimas lipolíticas é uma lipase microbiana ou aciltransferase.

Em algumas modalidades, a lipase é de fungos filamentosos, tais como *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.* As lipases isoladas de fungos filamentosos foram encontradas ter características industrialmente aplicáveis e também foram encontradas ser expressas rotineiramente em sistemas de produção heterólogos, tais como em *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* e levedura.

Em algumas modalidades, a lipase é de *Aspergillus turingiensis* como descrito na EP1433852, cuja patente está incorporada aqui por referencia.

Em algumas modalidades, a lipase é de *Fusarium heterosporum* como descrito na EP1722636, cuja patente está incorporada aqui por referencia.

Em algumas modalidades, a lipase é de *Fusarium oxysporum* como identificada na EP 0 130 064 ou em Hoshino et al. (1992) Biosci. Biotech. Biochem. 56:660-664.

Em algumas modalidades, a lipase é a fosfolipase A2 pancreática de porco expressa, por exemplo, em *Aspergillus niger* (Cakenzyme®, DSM).

Em algumas modalidades, a lipase é como descrita na EP0 869 167, em que é descrita a clonagem e a expressão de uma lipase de *Fusarium oxysporum* e seu uso na panificação. A enzima é descrita como possuindo atividade de fosfolipase. Essa enzima é vendida agora pela Novozymes

A/S (Dinamarca) como Lipopan F®.

Em algumas modalidades, a lipase é como descrita no WO 02/00852, que descreve cinco enzimas lipase e seus polinucleotídeos codificadores, isoladas de *F. venenatum, F. sulphureum, A. berkeleyanum, F. culmorum* e *F. solani*. Todas as cinco enzimas estão descritas como possuindo atividade de hidrólise de triacilglicerol, fosfolipase e atividade de galactolipase. Três das enzimas possuem atividade equivalente a da enzima de *F. oxysporum* descrita na EP 0 869 167: *F. venenatum, F. culmorum, F. sulphureum.*

Em algumas modalidades, a enzima que modifica o lipídeo é uma enzima lipolítica variante. Enzimas lipolíticas variantes, com substituições e fusões de aminoácidos específicos, foram produzidas, algumas das quais possuem atividade intensificada sobre lipídeos polares comparadas com enzimas parentais de tipo selvagem. WO01/39602 descreve tal variante, referida como SP979, que é uma fusão da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e a lipase de *Fusarium oxysporum* descrita na EP 0 869 167. Essa variante foi encontrada ter uma taxa significativamente alta de atividade sobre fosfolipídeos e glicolipídeos comparada com triglicerídeos.

Em algumas modalidades, a enzima que modifica o lipídeo é uma lipídeo aciltransferase.

A expressão "lipídeo aciltransferase" como usada aqui significa uma enzima que possui atividade de lipase (geralmente classificada como EC 3.1.1.x de acordo com a Enzyme Nomenclature Recommendations (1992) do Nomenclature Comittee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), assim como possui atividade de aciltransferase (geralmente classificada como EC 2.3.1.x), através da qual a enzima é capaz de transferir um grupo acila de um lipídeo para um ou mais substratos aceptores, tais como um ou mais dos seguintes: um esterol, um estanol, um carboidrato, uma proteína, uma subunidade de proteína, glicerol.

Em algumas modalidades, a lipídeo aciltransferase para uso nos métodos e/ou usos da presente invenção é capaz de transferir um grupo acila de um lipídeo (como definido aqui) para um ou mais dos seguintes subs-

tratos aceptores: um esterol, um estanol, um carboidrato, uma proteína ou suas subunidades ou glicerol.

Em alguns aspectos, o receptor de acila pode ser qualquer composto que compreenda um grupo hidroxi (-OH), tal como por exemplo, alcoóis polivalentes incluindo o glicerol; esterol; estanol; carboidratos; hidróxiácidos incluindo ácidos de frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico e ácido ascórbico; proteínas ou uma subunidade dessa, tal como aminoácidos, hidrolisados de proteína e peptídeos (proteína parcialmente hidrolisada) por exemplo; e suas misturas e derivados.

Em algumas modalidades, o substrato de lipídeo sobre o qual a lipídeo aciltransferase usada de acordo com a presente invenção atua, é um ou mais dos seguintes lipídeos: um fosfolipideo, tal como uma lecitina, por exemplo, fosfatidilcolina, um triglicerídeo, uma cardiolipina, um diglicerídeo ou um glicolipídeo, tal como digalactosildiglicerídeo (DGDG), por exemplo. A expressão lecitina quando usada aqui, abrange a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e fosfatidilglicerol.

Preferivelmente, em alguns aspectos, o substrato de lipídeo sobre o qual a lipídeo aciltransferase atua é um fosfolipideo, tal como lecitina, por exemplo, fosfatidilcolina ou fosfatidilinositol.

Em algumas modalidades, o substrato de lipídeo é um lipídeo alimentício, o que significa dizer que é um componente lipídico de um gênero alimentício.

Adequadamente, a lipídeo aciltransferase usada de acordo com a presente invenção pode exibir uma ou mais das seguintes atividades de lipase: atividade de glicolipase (E.C. 3.1.1.26), atividade de triacilglicerol lipase (E.C. 3.1.1.3), atividade de fosfolipase A2 (E.C. 3.1.1.4) ou atividade de fosfolipase A1 (E.C. 3.1.1.32). A expressão "atividade de glicolipase", como usada aqui, abrange a "atividade de galactolipase".

Adequadamente, a lipídeo aciltransferase usada de acordo com a presente invenção pode exibir uma ou mais das seguintes atividades: atividade de glicolipase (E.C. 3.1.1.26) e/ou atividade de fosfolipase A1 (E.C. 3.1.1.32) e/ou atividade de fosfolipase A2 (E.C. 3.1.1.4).

Preferivelmente, em alguns aspectos, a lipídeo aciltransferase usada de acordo com a presente invenção é capaz de transferir um grupo acila de um glicolipídeo e/ou de um fosfolipídeo para um esterol e/ou um estanol para formar pelo menos um éster de esterol e/ou um éster de estanol.

Receptores de acila de esterol adequado incluem o colesterol e fitoesteróis, por exemplo, alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, campesterol, 5,6-di-hidrosterol, brassicasterol, alfa-espinasterol, beta-espinasterol, gama-espinasterol, delta-espinasterol, fucosterol, dimosterol, ascosterol, serebisterol, episterol, anasterol, hiposterol, condrilasterol, desmosterol, calinosterol, poriferasterol, clionasterol, glicosídeo de esterol e outras formas isoméricas naturais ou sintéticas e derivados.

Preferivelmente, em um aspecto, o receptor de acila é um ou mais dos seguintes: alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, beta-sitostanol, ss-sitostanol ou campesterol.

Preferivelmente, em alguns aspectos, a lipídeo aciltransferase usada de acordo com a presente invenção é capaz de transferir um grupo acila de um glicolipídeo e/ou de um fosfolipídeo para um glicerol para formar pelo menos um diglicerídeo e/ou um monoglicerídeo.

Em alguns aspectos, um ou mais dos esteróis presentes no material de planta que contém lipídeo podem ser convertidos em um ou mais estanóis antes ou ao mesmo tempo em que a lipídeo aciltransferase é adicionada de acordo com a presente invenção. Qualquer método adequado para a conversão de esteróis em estanóis pode ser empregado. Por exemplo, a conversão pode ser realizada pela hidrogenação química. A conversão pode ser conduzida antes da adição da lipídeo aciltransferase de acordo com a presente invenção ou simultaneamente a adição da lipídeo aciltransferase de acordo com a presente invenção. Enzimas adequadas para a conversão de esterol para estanóis são descritas no WO00/061771.

Adequadamente, a presente invenção pode ser empregada para produzir ésteres de fitostanol no lipídeo de material de planta. Os ésteres de fitostanol possuem solubilidade adequada através de membranas lipídicas, bio-disponibilidade e benefícios à saúde aumentados (veja, por exemplo,

WO92/99640).

Protocolo para a determinação do % de atividade de aciltransferase:

O material de planta que contém lipídeo ao qual uma lipídeo aciltransferase tenha sido adicionada de acordo com a presente invenção pode ser extraído depois da reação enzimática com CH_3:CH_3OH 2:1 e a fase orgânica que contém o material lipídico é isolado e analisado por GLC e HPLC de acordo com o procedimento detalhado abaixo. A partir das análises GLC e HPLC, é determinada a quantidade de ácidos graxos livres e um ou mais ésteres de esterol/estanol; ésteres de carboidratos; ésteres de proteína; diglicerídeos ou monoglicerídeos. Um controle do material de planta que contém lipídeo ao qual não tenha sido adicionada a enzima é analisada da mesma maneira.

Cálculo:

A partir das análises GLC e HPLC, o aumento de ácidos graxos livres e ésteres de esterol/estanol e/ou ésteres de carboidrato e/ou ésteres de proteína e/ou diglicerídeos e/ou monoglicerídeos pode ser calculado:

Δ% de ácido graxo = % ácido graxo (enzima) - % de ácido graxo (controle); Mv de ácido graxo = peso molecular médio dos ácidos graxos;

A = Δ% de éster de esterol/Mv de éster de esterol (onde Δ% de éster de esterol = % de éster de esterol/estanol (enzima) - % de éster de esterol/estanol (controle) e Mv de éster de esterol = peso molecular médio dos ésteres de esterol/estanol) – aplicável onde o aceptor de acila é um esterol e/ou um estanol;

B = Δ% de éster de carboidrato/Mv de éster de carboidrato (onde Δ% de éster de carboidrato = % de éster de carboidrato (enzima) - % de éster de carboidrato (controle) e Mv de éster de carboidrato = peso molecular médio dos ésteres de carboidrato) – aplicável onde o aceptor de acila é um carboidrato;

c = Δ% de éster de proteína/Mv de éster de proteína (onde Δ% de éster de proteína = % de éster de proteína (enzima) - % de éster de proteína (controle) e Mv de éster de proteína = peso molecular médio dos ésteres de proteína) – aplicável onde o aceptor de acila é uma proteína; e

D = valor absoluto de diglicerídeo e/ou monoglicerídeo/Mv de di/monoglicerídeo (onde % de diglicerídeo e/ou monoglicerídeo = % de diglicerídeo e/ou monoglicerídeo (enzima) - % de diglicerídeo e/ou monoglicerídeo (controle) e Mv de di/monoglicerídeo = peso molecular médio do diglicerídeo e/ou monoglicerídeo) – aplicável onde o receptor de acila é glicerol.

A atividade de transferase é calculada como um percentual da atividade enzimática total:

$$\% \text{ atividade de transferase} = \frac{A^* + B^* + C^* + D^* \times 100}{A^* + B^* + C^* + D^* + \% \text{ ácido graxo/(Mv de ácido graxo)}}$$

(* - delete como apropriado).

Em um aspecto preferido, a presente invenção fornece um material de planta que contém lipídeo, no qual os lipídeos tenham sido modificados para lipídeos funcionais pela ação de enzimas lipolíticas. Isso pode ser usado com ou sem a purificação dos lipídeos funcionais como um ingrediente alimentício.

Adequadamente, a expressão "gênero alimentício", como usada aqui, significa um alimento em uma forma que está pronta para consumo. Alternativamente ou em adição, entretanto, a expressão gênero alimentício, como usada aqui, pode significar um ou mais materiais alimentícios que são usados na preparação de um alimento. Apenas como exemplo, a expressão gênero alimentício abrange os produtos assados produzidos a partir de uma massa de farinha assim como a massa de farinha usada na preparação dos ditos produtos assados.

Adequadamente, a expressão "gênero alimentício", como usada aqui, significa uma substancia que é adequada para o consumo humano e/ou de um animal.

Em outro aspecto, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser uma ração para animal.

Em algumas modalidades, o gênero alimentício usado de acordo com a presente invenção é selecionado entre um ou mais dos seguintes: ovos, produtos baseados em ovo, incluindo, mas não limitados a maionese, molhos para salada, molhos, sorvetes, ovo em pó, gema de ovo modificada

e produtos feitos com ela; produtos assados, incluindo pães, bolos, produtos de massa doce, massas folhadas, massas líquidas, muffins, donuts, biscoitos, torradas e cookies; produtos de confeitaria incluindo chocolate, caramelos, halawa, gomas, incluindo gomas sem açúcar e adoçadas, goma de mascar, goma de mascar macia, chicletes e pudins; produtos congelados incluindo sorbets, preferivelmente, produtos lácteos congelados, incluindo sorvete e leite gelado; produtos lácteos incluindo queijo, manteiga, leite, creme não lácteo para café, creme batido, creme de pastelaria, bebidas lácteas e iogurtes; musses, cremes batidos de vegetais, produtos com carne, incluindo produtos com carne processada; óleos e gorduras comestíveis, produtos cremosos aerados e não aerados, emulsões de óleo em água, emulsões de água em óleo, margarina, gorduras e coberturas incluindo coberturas com pouca gordura e com muito pouca gordura; molhos, maionese, pastas, molhos a base de creme, sopas a base de creme, bebidas, emulsões condimentadas e purês.

Adequadamente, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser um "alimento refinado" incluindo bolos, pastelaria, confeitaria, chocolates, bombons e semelhantes.

Em um aspecto, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser um produto de massa de farinha, tal como pão, um produto frito, um petisco, bolos, tortas, brownies, cookies, macarrão, macarrão instantâneo, tortilhas, itens para petisco tais como biscoitos, biscoitos de Graham, pretzels e batatas chips, massas e cereais para o desjejum.

Em um aspecto adicional, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser um produto alimentício derivado de planta tal como farinhas, pré-misturas, óleos, gorduras, manteiga de cacau, café cremoso, molhos para salada, margarina, coberturas, manteiga de amendoim, gorduras, sorvetes, óleos de cozinha.

Em outro aspecto, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser um produto derivado do leite incluindo manteiga, leite, creme, queijo tal como queijos naturais, processados e imitações de queijo em uma variedade de formas (incluindo triturado, em bloco, fatias ou ralado),

queijo cremoso, sorvete, sobremesas geladas, iogurtes, bebidas a base de iogurte, manteiga de garrafa, matéria gorda anidra, outros produtos derivados do leite. A enzima usada de acordo com a presente invenção pode melhorar a estabilidade da gordura em produtos a base de leite.

Em outro aspecto, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser um produto alimentício que contenha ingredientes de origem animal, tais como produtos de carne processada, óleos de cozinha e gorduras.

Em um aspecto adicional, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser uma bebida, uma fruta, uma mistura de frutas, um vegetal ou um vinho. Em alguns casos, a bebida pode conter até 20 g/l de fitosteróis adicionados derivados da invenção.

Em outro aspecto, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode ser uma ração para animal. A ração para animal pode ser enriquecida com fitosterol e/ou fitostanóis, preferivelmente com beta-sitosterol/estanol. Adequadamente, a ração para animal pode ser uma ração para aves domésticas. Quando o alimento for uma ração para aves domésticas, a presente invenção pode ser usada para diminuir o conteúdo de colesterol dos ovos produzidos pelas aves alimentadas com o alimento de acordo com a invenção.

Preferivelmente, em um aspecto, o gênero alimentício é selecionado entre um ou mais dos seguintes: ovos, produtos baseados em ovo, incluindo, mas não limitados à maionese, molhos para salada, pastas, sorvetes, ovo em pó, gema de ovo modificada e produtos feitos com ela.

Preferivelmente, o gênero alimentício de acordo com a presente invenção é um gênero alimentício que contém água. Adequadamente, o gênero alimentício pode ser constituído por 10-98% de água, adequadamente por 14-98%, adequadamente por 18-98% de água, adequadamente por 20-98%, adequadamente por 40-98%, adequadamente por 50-98%, adequadamente por 70-98%, adequadamente por 75-98%.

Em um aspecto da invenção, o lipídeo funcional produzido a partir do material de planta que contém lipídeo é um emulsificante. Preferivel-

mente, pelo menos um emulsificante é gerado no material de planta que contém lipídeo.

Em um aspecto da invenção, pelo menos três emulsificantes diferentes são gerados no material de planta que contém lipídeo.

Em um aspecto da invenção, pelo menos quatro emulsificantes diferentes são gerados no material que contém lipídeo.

Adequadamente, o emulsificante de acordo com a presente invenção pode ser, por exemplo, um ou mais dos seguintes: um diglicerídeo, um monoglicerídeo, tal como 1-monoglicerídeo ou uma lisolecitina, tal como lisofosfatidilcolina ou fosfatidilinositol, por exemplo, um monoglicerídeo de digalactosila (DGMG). O emulsificante é produzido, preferivelmente, a partir de um lipídeo doador de acila depois da remoção de um ou mais grupos acila do dito lipídeo doador de acila. A expressão lisolecitina como usada aqui abrange a lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina e lisofosfatidilglicerol. A expressão lisofosfatidilcolina como usada aqui é sinônima da expressão lisolecitina e essas expressões podem ser usadas alternativamente.

Onde um dos emulsificantes é um éster de proteína e/ou um diglicerídeo e/ou um monoglicerídeo, o segundo emulsificante pode ser, por exemplo, um ou mais dos seguintes: um diglicerídeo, um monoglicerídeo, tal como 1-monoglicerídeo, lisofosfatidilcolina ou um monoglicerídeo de digalactosila (DGMG). O segundo emulsificante é produzido, preferivelmente, a partir do lipídeo doador de acila depois da remoção de um ou mais grupos acila do dito lipídeo doador de acila.

Em uma modalidade, os lipídeos funcionais gerados da invenção podem ser usados em um processo para a preparação de um gênero alimentício.

Os lipídeos funcionais de acordo com a presente invenção podem ser usados com uma ou mais enzimas de grau alimentício adequadas. Portanto, está dentro do escopo da presente invenção que, em adição aos lipídeos funcionais da invenção, pelo menos uma enzima adicional seja adicionada ao gênero alimentício. Tais enzimas adicionais incluem enzimas que

degradam o amido tais como endo- e exo-amilases, pululanases, enzimas desramificantes, hemicelulases incluindo as xilanases, celulases, oxidoredutases, por exemplo, glicose oxidase, piranose oxidase, sulfidrila oxidase ou uma carboidrato oxidase tal como aquela que oxida a maltose, por exemplo, hexose oxidase (HOX), lipases, fosfolipases, glicolipases e proteases.

O material de planta que contém lipídeo tratado com as enzimas lipolíticas para gerar lipídeos funcionais de acordo com a presente invenção pode ser usado sem purificação ou com purificação limitada dos lipídeos funcionais junto com uma ou mais enzimas de grau alimentício adequados. Portanto, está dentro do escopo da presente invenção que, em adição aos lipídeos purificados ou não purificados da invenção, pelo menos uma pelo menos uma enzima adicional seja adicionada ao gênero alimentício. Tais enzimas adicionais incluem enzimas que degradam o amido tais como endo- e exo-amilases, pululanases, enzimas desramificantes, hemicelulases incluindo as xilanases, celulases, oxidorreductases, por exemplo, glicose oxidase, piranose oxidase, sulfidrila oxidase ou uma carboidrato oxidase tal como aquela que oxida a maltose, por exemplo, hexose oxidase (HOX), lipases, fosfolipases, glicolipases e proteases.

Em uma modalidade preferida, a enzima lipolítica tem uma ou mais das seguintes atividades de lipase: atividade de glicolipase (E.C. 3.1.1.26), atividade de triacilglicerol lipase (E.C. 3.1.1.3), atividade de fosfolipase A2 (E.C. 3.1.1.4) ou atividade de fosfolipase A1 (E.C. 3.1.1.32). Adequadamente, as enzimas lipase são bem conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, as seguintes lipases: Grindamyl Powerbake 4070 ou 4080 (Danisco A/S), Lysomax Oil (Danisco A/S), Lipopan® F, Lipopan® Xtra, e/ou LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Denmark), fosfolipase A2 (por exemplo, fosfolipase A2 da LIPOMOD® 22L de Biocatalysts, LIPOMAX® da Genencor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca), Panomore® (DSM Nutritional Products), as lipases descritas no WO03/97835, EP 0 977 869 ou EP 1 193 314. Aquele versado na técnica será capaz de combinar proporções de enzimas lipolíticas.

Tradicionalmente, a indústria de bolos usa beneficiadores de bo-

lo para a produção de bolos e para assegurar a alta qualidade dos bolos em termos de sabor, estrutura, qualidade e aspecto do alimento. Esses beneficiadores de bolo são normalmente baseados em emulsificantes liofilizados em um veículo semelhante ao amido e maltodextrina. Alguns beneficiadores de bolo também estão em forma de gel baseados em emulsificantes, açúcares e água. Esses beneficiadores de bolo são muito importantes para a indústria de bolos a fim de produzir um bolo de alta qualidade. Entretanto, os beneficiadores de bolo contêm emulsificantes e outros ingredientes "não naturais" com um "E-number". Devido à demanda dos consumidores para reduzir os números de "E-numbers", a indústria de bolos tem pesquisado modos alternativos de produzir bolos de alta qualidade sem usar esse tipo de emulsificantes.

O material de planta que contêm lipídeo tratado com as enzimas lipolíticas para gerar lipídeos funcionais de acordo com a presente invenção pode ser usado como beneficiadores de alimento sem purificação ou com purificação limitada dos lipídeos funcionais ou como lipídeos funcionais completamente purificados.

Em um aspecto da invenção, o beneficiador de alimento é um beneficiador de bolo.

Em um aspecto da invenção, o beneficiador de alimento é um beneficiador de pão.

O beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode compreender, adequadamente, um ou mais dos seguintes aditivos:

material de proteína de soja; carotenoides, flavonoides, antioxidantes e fito-químicos (especialmente antocianina, carotenoide, bioflavonoide, glutationa, catequina, isoflavona, licopeno, ginsenosideo, picnogenol, alcaloide, fitosterol de pygeum, sulforafona, resveretol, extrato de semente de uva ou alimento que contenha ésteres de estanol), vitamina (especialmente vitamina C, vitamina A, vitamina B3, vitamina D, vitamina E, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cianocobalamina, ácido fólico, biotina, ácido pantotênico ou vitamina K), minerais (especialmente cálcio, iodo, magnésio,

zinco, ferro, selenio, manganês, cromo, cobre, cobalto, molibdenio ou fósforo), ácidos graxos (especialmente ácido gama-linoleico, ácido eicosapentaenóico ou ácido docosaexaenóico), óleo (especialmente óleo de borragem, óleo de canola rico em carotenoide ou óleo de semente de linho), glicerol, sorbitol, aminoácidos (especialmente triptofano, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, leucina, isoleucina, alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, cisteina, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, prolina, hidroxiprolina, serina, taurina ou tirosina), enzima como definida acima (especialmente bromelaina, papaína, amilase, celulase ou coenzima Q), lignina, éster de estanol ou bactérias favoráveis (especialmente *Lactobacillus acidophílus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus bifidus, Lactobacillus plantarum* ou *Streptococcus faecium*), ácido fólico, fibras insolúveis e/ou solúveis.

A presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em produtos com ovo, particularmente maionese: estabilidade térmica aperfeiçoada durante a pasteurização; propriedades organolépticas aperfeiçoadas, consistência melhorada.

A presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em massa de farinha e/ou produtos assados: um volume específico aperfeiçoado da massa ou dos produtos assados (por exemplo, do pão e/ou do bolo); estabilidade aperfeiçoada da massa; uma crosta aperfeiçoada (por exemplo, uma crosta mais fina e/ou mais crocante do pão), um miolo melhorado (por exemplo, uma distribuição mais homogênea do miolo e/ou uma estrutura mais fina do miolo e/ou um miolo mais macio); um aspecto melhorado (por exemplo, uma superfície lisa sem bolhas ou buracos ou substancialmente sem bolhas ou buracos); endurecimento reduzido; maciez aperfeiçoada; odor melhorado; sabor melhorado.

A presente invenção pode fornecer um efeito benéfico a partir dos lipídeos funcionais já que esses funcionam como materiais altamente ativos na superfície em um alimento sem a formação de quantidades substanciais de ácidos graxos livres, que reduzem a habilidade do alimento oxidar depois do armazenamento, por que os ácidos graxos livres são mais propensos a oxidação do que os ésteres de ácidos graxos correspondentes.

Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece o uso de uma enzima lipolítica para gerar outros compostos funcionais de acordo com a presente invenção em um material de planta que contém lipídeo.

Deve ser compreendido que a ação das enzimas que modificam lipídeos, tais como as enzimas lipolíticas sobre o material de planta que contém lipídeo pode gerar não apenas lipídeos funcionais, mas também outros compostos funcionais, tais como com a ação de uma lipídeo transferase, em que um grupo acila de um lipídeo é transferido para um ou mais outros substratos aceptores, tais como um ou mais dos seguintes: um esterol, um estanol, um carboidrato, uma proteína, uma subunidade de proteína e glicerol.

Em algumas modalidades particulares, os compostos funcionais gerados nos métodos de acordo com a presente invenção são ésteres funcionais.

Em algumas modalidades, ambos os lipídeos funcionais e os outros compostos funcionais são gerados pelos métodos de acordo com a presente invenção.

Esses compostos funcionais gerados pelos métodos de acordo com a presente invenção podem então ser usados na fabricação de uma massa de farinha e/ou um produto assado, compreendendo adicionar os ditos compostos funcionais a uma massa de farinha e (opcionalmente) assar a massa para fazer um produto assado com um ou mais dos seguintes: viscosidade reduzida da massa; maquinabilidade aperfeiçoada da massa; redução de bolhas durante o cozimento do produto assado; melhoramento do volume e/ou da maciez do pão; prolongamento da vida útil do produto assado e/ou da massa; aperfeiçoamento do efeito antiendurecimento do produto assado e/ou da massa; aperfeiçoamento da estrutura da crosta do produto assado; redução da heterogenicidade do poro do produto assado; aperfeiçoamento da homogeneidade do poro do produto assado; redução do tamanho médio do poro do produto assado; intensificação do índice de glúten da massa; melhoramento do sabor e/ou do odor do produto assado; aperfeiçoamento da cor da crosta do produto assado.

Em um aspecto, os compostos funcionais gerados pelos méto-

dos de acordo com a presente invenção são purificados ou parcialmente purificados.

Em um aspecto, os compostos funcionais gerados pelos métodos de acordo com a presente invenção não são purificados antes do uso em um alimento.

Em um aspecto, os compostos funcionais gerados pelos métodos de acordo com a presente invenção são formulados como um produto seco.

Em um aspecto, os compostos funcionais são concentrados ou diluídos antes do uso em um alimento.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um método para fazer noodles ou uma massa para noodles ou um produto baseado em noodles, cujo método compreende adicionar um composto funcional de acordo com a presente invenção aos noodles, massa para noodles ou um produto baseado em noodles.

Em um aspecto da presente invenção, é fornecido o uso de um composto funcional de acordo com a presente invenção na fabricação de macarrão ou de um produto baseado em macarrão para aperfeiçoar uma ou mais das características de cor/tom amarelado, estabilidade da cor, redução de brilho, redução do conteúdo de gordura, melhoramento da textura e da mordida (espessura), redução da atividade da água, redução de quebra, aumento da firmeza da cor e aperfeiçoamento da manutenção do tamanho durante o processamento.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um método para fazer tortilha ou massa de farinha para tortilha, cujo método compreende adicionar um beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção a tortilha ou massa de farinha para tortilha.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um método para fazer macarrão ou macarrão de grão inteiro ou massa de farinha para macarrão, cujo método compreende adicionar um beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção ao macarrão ou massa de farinha para macarrão.

Um aspecto adicional da presente invenção fornece o uso de um beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção na fabricação de uma tortilha ou de uma massa para tortilha para aperfeiçoar o enrolamento da tortilha, aumentar a flexibilidade de uma tortilha, aperfeiçoar as propriedades antiendurecimento da tortilha e/ou da massa de farinha para tortilha, aperfeiçoar a maciez e/ou reduzir a perda de sabor da tortilha e/ou massa de farinha para tortilha.

A funcionalidade do beneficiador de alimento pode ser aperfeiçoada pela combinação com emulsificantes tais como DATEM.

Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em um gênero alimentício: aspecto melhorado, paladar melhorado, estabilidade aperfeiçoada, em particular uma estabilidade térmica aperfeiçoada, sabor melhorado, maciez melhorada, elasticidade melhora e emulsificação melhorada.

Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados em produtos derivados do leite, tais como sorvetes: um paladar aperfeiçoado (preferivelmente um paladar mais cremoso); sabor melhorado e fusão melhorada.

Adequadamente, a presente invenção pode fornecer um ou mais dos seguintes efeitos técnicos inesperados no ovo ou em produtos fabricados com ovo: estabilidade aperfeiçoada da emulsão; estabilidade térmica da emulsão; sabor melhorado; redução do odor; propriedades de espessamento melhoradas; consistência melhorada

Efeitos técnicos específicos associados com o uso do beneficiador de alimento como aqui definido na preparação de um alimento estão listados na tabela abaixo:

	Alimento	Efeito
1	Pão, Muffins e Donuts	Reforça a massa e aumenta a resistência mecânica e aumenta a capacidade de absorção de água. Aumenta o volume de produtos de panificação e mantém a maciez do miolo.
2	Massa congelada	Evita a decomposição durante a refrigeração

	Alimento	Efeito
3	Pão de ló	Beneficia o volume do bolo e a textura macia uniforme
4	Biscoito, bolacha e cookie	Torna as emulsões de gordura mais estáveis e evita a aderência a máquina. Evita a laminação de produtos muito gordurosos
5	Pastelaria e panificação	Aperfeiçoa a textura de produtos fritos
6	Noodles	Evita que aderência da massa à máquina. Aumenta o conteúdo de água e diminui a perda no cozimento
7	Noodles instantâneo	Evita que os noodles grudem um no outro
8	Macarrão	Condicionador de massa evita a adesão no cozimento
9	Creme de pastelaria	Torna a pasta de amido macia e com textura cremosa e previne a desidratação
10	Creme não lácteo para café	Evita a separação de óleo e água
11	Creme batido	Fornece emulsão estável
12	Chocolate	Evita ou reduz a laminação
13	Caramelo, bala e nougat	Melhora a emulsificação do açúcar derretido e do óleo. Evita a separação do óleo
14	Carne processada, salsichas	Melhora a capacidade de retenção de água das salsichas e do presunto e evita a separação da fase oleosa de pastas e purês.

Em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido o uso de uma enzima lipolítica em um processo para a preparação de lipídeos funcionais.

Em outro aspecto da presente invenção, é fornecido um processo para a preparação de um lisofosfolipídeo, por exemplo, lisolecitina, cujo processo compreende tratar um material de planta que contém lipídeo com a enzima lipolítica de acordo com a presente invenção.

Em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido o uso de uma enzima lipolítica em um processo para a preparação de um lisoglicolipídeo (por exemplo, monoglicerídeo de digalactosila (DGMG) ou monoglicerídeo de monogalactosila (MGMG)), pelo tratamento de um material

de planta que contém lipídeo com a enzima lipolítica de acordo com a presente invenção.

Em algumas modalidades da invenção, a suspensão líquida de pelo menos parte do material de planta que contém lipídeo parcialmente solubilizado é essencialmente livre de amido.

Em algumas modalidades da invenção, menos do que cerca de 50%, tal como menos do que cerca de 40%, tal como menos do que cerca de 30%, tal como menos do que cerca de 20%, tal como menos do que cerca de 10%, tal como menos do que cerca de 6%, tal como menos do que cerca de 3%, tal como menos do que cerca de 1% (peso/peso) da suspensão líquida de material de planta que contém lipídeo parcialmente solubilizado é amido ou componentes que contêm amido, tal como farinha.

Consequentemente, em algumas modalidades, compreende-se que as enzimas são para ter um efeito enzimático sobre o material de planta que contém lipídeo que está essencialmente isento de amido ou que contém apenas amido residual de uma etapa de processamento prévia. A presente invenção não é pretendida abranger o tratamento enzimático de composições com preparações adicionais de farinha adicionada, tais como em aplicações enzimáticas in situ na fabricação de pão.

Determinação de atividade de galactolipase (ensaio de atividade de glicolipase):

Substrato:

Digalactosildiglicerídeo 0,6% (Sigma D 4651), Triton-X 100 0,4% (Sigma X-100) e $CaCl_2$ 5 mM foram dissolvidos em tampão HEPES 0,05 M pH 7.

Procedimento do ensaio:

400 µL de substrato foram adicionados a um tubo Eppendorf de 1,5 mL e colocados em um Eppendorf Thermomixer a 37°C por 5 minutos. No tempo t=0 min, 50 µL de solução de enzima foram adicionados. Um controle com água ao invés de enzima também foi analisado. A amostra foi misturada a 10*100 rpm em um Eppendorf Thermomixer a 37°C por 10 minutos. No tempo t=10 min, o tubo de Eppendorf foi colocado em outro misturador

térmico a 99°C por 10 min. para parar a reação. O ácido graxo livre nas amostras foi analisado usando o kit NEFA C da WAKO GnbH.

A atividade de enzima GLU em pH 7 foi calculada como micromoles de ácido graxo produzidos por minuto sob as condições do ensaio.

Determinação da atividade de fosfolipase (ensaio de atividade de fosfolipase):

A atividade de fosfolipase foi medida usando dois métodos diferentes que fornecem resultados comparáveis. Qualquer um desses métodos pode ser usado para determinar a atividade de fosfolipase de acordo com a presente invenção.

"Ensaio PLU" para determinação da atividade de fosfolipase

Substrato:

L-α fosfatidilcolina 95% Plant 0,6% (Avanti #441601), Triton-X 100 0,4% (Sigma X-100) e $CaCl_2$ 5 mM foram dissolvidos em tampão HEPES 0,05 M pH 7.

Procedimento do ensaio:

400 µL de substrato foram adicionados a um tubo Eppendorf de 1,5 mL e colocados em um Eppendorf Thermomixer a 37°C por 5 minutos. No tempo t=0 min., 50 µL de solução de enzima foram adicionados. Um controle com água ao invés de enzima também foi analisado. A amostra foi misturada a 10*100 rpm em um Eppendorf Thermomixer a 37°C por 10 minutos. No tempo t=10 min., o tubo de Eppendorf foi colocado em outro misturador térmico a 99°C por 10 min. para parar a reação. O ácido graxo livre nas amostras foi analisado usando o kit NEFA C da WAKO GnbH.

A atividade de enzima PLU-7 em pH 7 foi calculada como micromoles de ácido graxo produzidos por minuto sob as condições do ensaio.

"Ensaio TIPU" para determinação da atividade de fosfolipase

1 TIPU (Unidade de Titulação de Fosfolipase) é definido como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo livre por minuto nas condições de ensaio.

A fosfolipase A1 e A2 catalisam a conversão de lecitina em lisolecitina com a liberação de ácido graxo livre das posições 1 e 2, respectiva-

mente. A atividade de fosfolipase pode ser determinada pela titulação contínua dos ácidos graxos liberados da lecitina durante a enzimação, já que o consumo de álcali iguala a quantidade de ácido graxo liberado.

Substrato:

Lecitina 4%, Triton-X 100 4% e $CaCl_2$ 6 mM: 12 g de lecitina em pó (Avanti Polar Lipids #44160) e 12 g de Triton-X 100 (Merck 108643) foram dispersos em aproximadamente 200 ml de água desmineralizada durante agitação magnética. 3,0 ml de $CaCl_2$ 0,6 mM (p.a. Merck 1.02382) foram adicionados. O volume foi ajustado para 300 mL com água desmineralizada e a emulsão foi homogeneizada usando um Ultra Thurax. O substrato era preparado recentemente a cada dia. Procedimento do ensaio:

uma solução de enzima foi preparada para dar uma curva de titulação entre 0,06 e 0,18 ml/min. com a adição de 300 µL de enzima. Uma amostra de controle de atividade conhecida está incluída. As amostras foram dissolvidas em água desmineralizada e agitadas por 15 min. a 300 rpm. 25,00 ml de substrato tiveram a temperatura ajustada para 37°C por 10-15 min. antes do pH ser ajustado para 7.0 com NaOH 0,05 M. 300 µL de solução de enzima foram adicionados e a titulação contínua com NaOH 0,05 M foi realizada usando um titulador pH-Stat (Phm 290, Mettler Toledo). Duas determinações de atividade foram feitas em cada escala. Depois de 8 minutos, a titulação é finalizada e a inclinação da curva de titulação é calculada entre 5 e 7 minutos. O limite de detecção é de 3 TIPU/ml de solução de enzima.

A atividade de fosfolipase (TIPU/g de enzima) foi calculada da seguinte maneira:

$$TIPU/g = \frac{\alpha \cdot N \cdot 10^{6} \frac{\mu mol}{mol} \cdot 10^{-3} \frac{l}{ml} \cdot V_1}{m \cdot V_2} = \frac{\alpha \cdot N \cdot 10^{3} \cdot V_1}{m \cdot V_2}$$

onde:

α é a inclinação da curva de titulação entre 5 e 7 minutos do tempo de reação (ml/min.).

N é a normalidade do NaOH usado (mol/l).

V1 é o volume no qual a enzima é dissolvida (ml).

m é a quantidade de enzima adicionada a V1 (g).

V2 é o volume de solução de enzima adicionada ao substrato (ml).

Determinação da atividade de triacilglicerídeo lipase:ensaio baseado em triglicerídeo (tributirina) como substrato (LIPU):

A atividade de lipase baseada em tributirina é medida de acordo com o Food Chemical Codex, Fourth Edition, National Academic Press, 1996, p. 803, com as modificações de que a amostra é dissolvida em água deionizada ao invés de tampão glicina e o pH de ajuste estatístico é de 5.5 ao invés de 7.

1 LIPU é definido como a quantidade de enzima que pode liberar 1 mol de ácido butírico por minuto sob as condições de ensaio.

Em um aspecto da invenção, a enzima lipolítica usada de acordo com a presente invenção pode ser obtida de um fungo filamentoso. Mais preferivelmente, a enzima lipolítica fúngica é obtida (preferivelmente obtida) de *Fusarium* spp. Preferivelmente, a enzima lipolítica fúngica usada de acordo com a presente invenção pode ser obtida (preferivelmente obtida) de *Fusarium heterosporum* ou *Fusarium semitectum*. Adequadamente, a enzima lipolítica fúngica usada de acordo com a presente invenção pode ser obtida (preferivelmente obtida) de *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83) ou *Fusarium semitectum* (IBT 9507).

Portanto, em um aspecto, a enzima lipolítica fúngica usada de acordo com a presente invenção é, preferivelmente, uma enzima lipolítica de fungo filamentoso, preferivelmente uma enzima lipolítica de fungo filamentoso de tipo selvagem.

Em algumas das aplicações mencionadas aqui, particularmente as aplicações em alimentos, tais como aplicações em panificação, o beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode ser usado com um ou mais emulsificantes convencionais, incluindo, por exemplo, monoglicerídeos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono e diglicerídeos de ácidos graxos, estearoil lactilato de sódio (SSL) e lecitinas.

O beneficiador de alimento gerado pelos métodos de acordo

com a presente invenção é especialmente preferido em receitas de pão com adição de gordura.

Adicionalmente ou alternativamente, o beneficiador de alimento gerado pelos métodos de acordo com a presente invenção pode ser usado com uma ou mais enzimas de grau alimentício adequadas. Portanto, está dentro do escopo da presente invenção que, em adição à enzima lipolítica da presente invenção, pelo menos uma enzima adicional pode ser adicionada ao produto assado e/ou a massa de farinha. Tais enzimas adicionais incluem enzimas que degradam o amido tais como as endo ou exoamilases, pululanases, enzimas desramificantes, hemicelulases incluindo as xilanases, celulases, oxidoredutases, por exemplo, glicose oxidase, piranose oxidase, sulfidrila oxidase ou uma carboidrato oxidase tal como aquela que oxida a maltose, por exemplo, hexose oxidase (HOX), lipases, fosfolipases, galactolipases e hexose oxidase, proteases e aciltransferases (tais como aquelas descritas no WO04/064987, por exemplo).

É particularmente preferido que a enzima lipolítica usada de acordo com a presente invenção seja usada em combinação com alfa-amilases na produção de produtos alimentícios. Em particular, a amilase pode der uma amilase não maltogênica, tal como um polipeptídeo que possua atividade de exo-amilase não maltogênica, em particular, atividade de glicano 1,4-alfa-maltotetra-hidrolase (EC 3.2.1.60) (como descrita no WO05/003339). Uma amilase não maltogênica adequada está disponível comercialmente como Powersoft® (disponibilizada por Danisco A/S, Dinamarca). As amilases maltogênicas tais como Novamyl® (Novozymes A/S, Dinamarca) também podem ser usadas. Em uma modalidade, o uso combinado de alfa-amilases e do beneficiador de alimento da invenção pode ser usado em uma massa de farinha e/ou na produção de um produto assado tal como pão, bolos, donuts, bolo de donuts ou bagels. A combinação de alfa-amilases e do beneficiador de alimento da invenção também é considerada como preferível para uso nos métodos de produção de tortilhas, tais como tortilhas de trigo e/ou milho.

Em outra modalidade preferida, o beneficiador de alimento gera-

do de acordo com a presente invenção pode ser usado em combinação com uma xilanase na produção de produtos alimentícios. GRINDAMYL® e POWERBake 7000 são exemplos de enzimas xilanases comercialmente disponíveis da Danisco A/S. Outros exemplos de enzimas xilanases podem ser encontrados no WO03/020923 e WO01/42433.

Preferivelmente, o beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode ser usado em combinação com uma xilanase e uma alfa-amilase. Adequadamente, a alfa-amilase pode ser uma alfa-amilase maltogênica ou não maltogênica (tal como GRINDAMYL® ou POWERSoft, disponibilizadas por Danisco A/S) ou uma combinação dessas.

O beneficiador de alimento da invenção também pode, preferivelmente, ser usado em combinação com uma enzima oxidante, tal como uma enzima que oxida a maltose (MOX), por exemplo, a hexose oxidase (HOX). Métodos adequados estão descritos no WO03/099016. Enzimas que oxidam a maltose comercialmente disponibilizadas pela Danisco A/S são GRINDAMYL™ e SUREBake.

Opcionalmente, uma alfa-amilase, tal como uma exo-amilase não maltogênica e/ou uma amilase maltogênica e/ou uma enzima que oxida a maltose (MOX) em combinação com a enzima, pode ser usadas nos métodos de acordo com a presente invenção para a preparação de uma massa de farinha, um produto assado, tortilha, bolo, macarrão, macarrão instantâneo/petiscos fritos ou um produto derivado do leite tal como o queijo.

O beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção é incluído no alimento, tipicamente, por métodos conhecidos na técnica. Tais métodos incluem a adição do beneficiador de alimento diretamente no alimento ou na composição, adição do beneficiador de alimento em combinação com um estabilizador e/ou veículo e adição de uma mistura que compreenda o beneficiador de alimento e um estabilizador e/ou veículo.

Estabilizadores adequados para uso com a presente invenção incluem, mas não são limitados a sais inorgânicos (tais como NaCl, sulfato de amônia), sorbitol, emulsificantes e detergentes (tais como Tween 20, Tween 80, Panodan AB100 sem triglicerídeos, éster de poliglicerol, mono-

oleato de sorbitana), óleo (tal como óleo de canola, óleo de girassol e óleo de soja), pectina, trealose, sorbitol e glicerol.

Veículos adequados para uso com a presente invenção incluem, mas não são limitados a amido, farinha de cereal, trigo moído, farinha de trigo, NaCl e citrato.

Para produtos assados, tais como pão, pão de vapor e pão de forma branco americano, por exemplo, a adição de um beneficiador de alimento da presente invenção pode resultar em um ou mais dos seguintes: volume e maciez do pão aumentados, vida útil prolongada e/ou efeito anti-decomposição, estrutura do miolo melhorada, heterogenicidade do poro reduzida, tamanho médio do poro reduzido, índice de glúten intensificado, sabor e/ou odor aperfeiçoados e cor da crosta melhorada.

Vantajosamente, o beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode ser usado para substituir emulsificantes em alimentos, tais como massa de farinha e/ou produtos assados.

O beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode ter sinergia com os emulsificantes tais como DATEM, SSL, CSL, monoglicerídeos, polissorbatos e Tween. Portanto, o beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode ser usado em combinação com um ou mais emulsificantes. Vantajosamente, o uso do beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção em combinação com um ou mais emulsificantes pode reduzir a quantidade total de emulsificante usado comparada com a quantidade necessária quando nenhum beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção é usado.

O beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção também pode ter sinergia com hidrocoloides, Guar, xantana e pectina e com enzimas que oxidam a maltose, tais como a hexose oxidase.

Para donuts, bolo de donuts, bagels, bolinhos e muffins, por exemplo, o uso do beneficiador de alimento da presente invenção pode resultar em um efeito sinérgico quando usado em combinação com uma ou mais alfa-amilases, alfa-amilase maltogênica e alfa-amilase não maltogênica.

Para bolos, pão de ló e torta de dendê, por exemplo, o uso do beneficiador de alimento da presente invenção pode resultar em um efeito sinérgico quando usado em combinação com um ou mais hidrocoloides tais como Guar e/ou um ou mais emulsificantes tal como DATEM.

Para biscoitos, por exemplo, o uso do beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção confere propriedades aperfeiçoadas de capacidade de enrolamento e manuseio, particularmente quando frios (enrolamento a frio).

Vantajosamente, na maionese e outros produtos baseados em ovo, por exemplo, o uso de um beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode levar a melhora da textura, redução do tamanho médio da partícula e/ou redução da distribuição do tamanho médio da partícula, aperfeiçoamento da estabilidade térmica, melhor desempenho no micro-ondas e/ou estabilidade.

Em bolos, o uso da presente invenção leva, vantajosamente, a maciez aperfeiçoada, volume, propriedades de armazenamento e vida útil aperfeiçoadas.

Para macarrão ou produtos baseados em macarrão, por exemplo, macarrão instantâneo, o beneficiador de alimento da presente invenção pode conferir uma ou mais das seguintes características: cor/tom amarelado aperfeiçoado, características mais estáveis da cor, redução de brilho, redução do conteúdo de gordura, melhoramento da textura e da mordida (espessura), redução da atividade da água, redução de quebra, aumento da firmeza da cor e aperfeiçoamento da manutenção do formato durante o processamento.

Preferivelmente, o beneficiador de alimento da presente invenção pode ser usado para reduzir o conteúdo de gordura de um macarrão ou um produto de macarrão, por exemplo, macarrão instantâneo.

Em tortilhas, por exemplo, o uso de um beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção pode resultar em um ou mais dos seguintes: capacidade de enrolamento reduzida da tortilha, por exemplo, pelo aumento da flexibilidade, propriedades antidecomposição aperfeiçoa-

das, maciez aperfeiçoada e/ou redução da falta de sabor.

Vantajosamente, a capacidade de enrolamento e/ou flexibilidade aperfeiçoadas pode levar a uma probabilidade reduzida de despedaçamento da tortilha quando enrolada.

O beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção é particularmente útil na preparação de produtos assados, tais como aqueles preparados a partir de uma massa de farinha, incluindo pães, bolos, produtos de massa doce, massas folhadas, massas líquidas, muffins, donuts, biscoitos, bolachas e cookies.

O beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção é particularmente útil na preparação de cereais para o desjejum, tais como aqueles preparados a partir de uma massa de farinha.

O beneficiador de alimento também pode ser usado como aditivo para o melhoramento do pão, por exemplo, composições de massa de farinha, aditivo para massa, condicionadores de massa, pré-misturas e preparações similares convencionalmente adicionados à farinha e/ou a massa de farinha durante os processos de fabricação do pão ou outros produtos assados, para fornecer propriedades aperfeiçoadas ao pão ou a outros produtos assados.

Portanto, a presente invenção refere-se a uma composição para o melhoramento do pão e/ou uma composição para o melhoramento de massa de farinha que compreenda um beneficiador de alimento gerado de acordo com a presente invenção; e também a uma massa de farinha ou produto assado que compreenda tal composição para o melhoramento do pão e/ou melhoramento da massa de farinha.

A composição para o melhoramento do pão e/ou a composição para o melhoramento da massa de farinha pode compreender, em adição a uma enzima lipolítica fúngica de acordo com a presente invenção, outras substancias, cujas substancias são convencionalmente usadas na panificação para aperfeiçoar as propriedades da massa de farinha e/ou produtos assados.

A composição para o melhoramento do pão e/ou a composição

para o melhoramento da massa de farinha pode compreender um ou mais agentes convencionais para panificação, tais como um ou mais dos seguintes constituintes:

Leite em pó, glúten, um emulsificante, gordura granulada, um oxidante, um aminoácido, açúcar, sal, farinha ou amido.

Exemplos de emulsificantes adequados são: monoglicerídeos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- ou diglicerídeos de ácidos graxos, ésteres de açúcar, estearoil lactilato de sódio (SSL) e lecitinas.

A composição para o melhoramento do pão e/ou massa de farinha pode compreender outra enzima, tal como uma ou mais enzimas de grau alimentício adequadas, incluindo enzimas que degradam o amido tais como endo ou exoamilases, pululanases, enzimas desramificantes, hemicelulases incluindo as xilanases, celulases, oxidorredutases, por exemplo, glicose oxidase, piranose oxidase, sulfidrila oxidase ou uma carboidrato oxidase tal como aquela que oxida a maltose, por exemplo, hexose oxidase (HOX), lipases, fosfolipases, galactolipases e hexose oxidase, proteases e aciltransferases (tais como aquelas descritas no WO04/064987, por exemplo).

A expressão "produto assado" como usada aqui, inclui um produto preparado a partir de uma massa de farinha. Exemplos de produtos assados (do tipo branco, light ou escuro) que podem ser vantajosamente produzidos pela presente invenção incluem um ou mais dos seguintes: pão (incluindo pão branco, integral e de centeio), tipicamente na forma de fatias ou rolos ou torrada, pão tipo baguete francesa, pão pita, tortilhas, tacos, bolos, panquecas, biscoitos, macarrão, noodles e semelhantes).

A massa de farinha de acordo com a presente invenção pode ser uma massa fermentada ou uma massa a ser submetida à fermentação. A massa pode ser fermentada de várias maneiras tais como pela adição de bicarbonato de sódio ou semelhantes ou pela adição de uma cultura de levedura adequada tal como uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão).

A massa de farinha de acordo com a presente invenção pode

ser uma massa de farinha para a preparação de um produto de cereal desidratado, torrada, biscoito ou bolacha.

Modalidades específicas da invenção:

Como discutido acima, a presente invenção refere-se a um método para o tratamento de material de planta que contém lipídeo, o método compreendendo a etapa de tratar uma suspensão líquida de pelo menos um material de planta contendo lipídeo parcialmente solubilizado com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo.

Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente uma etapa precedente ou simultânea de tratar uma suspensão líquida de um material de planta que contém lipídeo para obter o dito material de planta parcialmente solubilizado.

Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente uma etapa subsequente de tratar uma suspensão líquida para obter o dito material de planta solubilizado.

Em algumas modalidades, o tratamento para obter pelo menos um material de planta parcialmente solubilizado é um tratamento com uma ou mais enzimas que modificam a parede celular.

Em algumas modalidades, o tratamento para obter pelo menos um material de planta parcialmente solubilizado é um tratamento por sonicação, tal como tratamento ultrassônico e/ou extrusão.

Em algumas modalidades, a suspensão líquida de material de planta pelo menos parcialmente solubilizada contém material de planta insolúvel.

Em algumas modalidades, o material de planta é tratado sob as ditas etapas do método simultaneamente.

Em algumas modalidades, o material de planta é tratado sob as ditas etapas do método de acordo com a presente invenção sem a remoção de uma quantidade substancial de qualquer componente.

Em algumas modalidades, a suspensão líquida é tratada adicionalmente com um ou mais enzimas adicionais.

Em algumas modalidades, a enzima adicional é uma ou mais

enzimas de transglicosilação.

Em algumas modalidades, a enzima adicional é uma protease.

Em algumas modalidades, uma ou mais enzimas que modificam o lipídeo é uma enzima lipolítica selecionada do grupo que consiste em: uma triacilglicerol lipase, uma fosfolipase e uma galacto-lipase.

Em algumas modalidades, uma ou mais enzimas que modificam o lipídeo contém duas ou três atividades selecionadas do grupo que consiste em: atividade de triacilglicerol lipase, atividade de fosfolipase e atividade de galacto-lipase.

Em algumas modalidades, uma ou mais enzimas que modificam o lipídeo é uma, duas, três, quatro ou cinco enzimas que modificam lipídeo diferentes.

Em algumas modalidades, o método de acordo com a presente invenção compreende uma etapa adicional de isolamento da fração solúvel.

Em algumas modalidades, uma ou mais enzimas que modificam a parede celular são selecionadas do grupo que consiste em uma xilanase e uma celulase, tal como celobio-hidrolases, endoglicanases e beta-glicanase.

Em algumas modalidades, a celulase é selecionada a partir de uma endocelulase, uma exocelulase, uma celobiase, uma celulase oxidativa, uma celulose fosforilase.

Em algumas modalidades, uma ou mais enzimas adicionais são enzimas que modificam o amido, selecionadas do grupo que consiste em uma alfa-amilase, uma pululanase, isoamilase e uma beta-amilase.

Em algumas modalidades, uma ou mais enzimas de transglicosilação são selecionadas do grupo que consiste em enzimas da classe de enzima EC 3.2.1.20.

Em algumas modalidades, o material de planta é fornecido em partículas, nas quais o tamanho médio da partícula do dito material de planta particulado está abaixo de 3000 µm, tal como abaixo de 1000 µm, tal como abaixo de 500 µm.

Em algumas modalidades, o material de planta é um farelo de cereal.

Em algumas modalidades, o farelo de cereal é selecionado entre trigo, cevada, aveia, centeio, triticale, arroz e milho.

Em algumas modalidades, o método de acordo com a presente invenção compreende, adicionalmente, uma etapa precedente de i) fracionar o grão de cereal obtido para obter o endosperma, farelo e germe; ii) separar e distribuir o endosperma, farelo e germe para possibilitar que eles sejam tratados; e iii) moer o farelo.

Em algumas modalidades, o farelo de cereal é obtido a partir de um processo de moagem industrial e moído posteriormente para obter um tamanho médio da partícula abaixo de 500 µm, tal como abaixo de 400 µm, tal como abaixo de 200 µm.

Em algumas modalidades, o material de planta é um produto colateral do processamento de material de planta, tal como pasta de neutralização do refino de óleos vegetais, grãos usados para fermentação ou grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS).

Em algumas modalidades, a composição obtida compreendendo os lipídeos modificados, tais como lipídeos funcionais, são tratadas adicionalmente para inativar a atividade enzimática adicional.

Em algumas modalidades, o grau de solubilização obtido do dito material de planta, como determinado sobre a matéria seca *versus* a matéria seca de material de planta, é maior do que 15%, tal como maior do que 25%, tal como maior do que 35%, tal como maior do que 40%, tal como maior do que 50%, tal como na faixa entre 40% a 60%, tal como na faixa entre 50% a 60%.

Em algumas modalidades, o conteúdo total de lipídeos e lipídeos modificados, tal como lipídeos funcionais, como determinado sobre a matéria seca versus a matéria seca de material de planta na fração solúvel obtida é de pelo menos cerca de 0,05%, tal como pelo menos cerca de 1,0%, tal como na faixa entre 0,05 a 5%.

Em algumas modalidades, o método de acordo com a presente invenção compreende ainda uma etapa de desidratar a composição obtida que compreende lipídeos e/ou lipídeos modificados, tais como lipídeos fun-

cionais.

Em algumas modalidades, o método de acordo com a presente invenção compreende ainda uma etapa de secar por pulverização a composição obtida que compreende lipídeos e/ou lipídeos modificados, tais como lipídeos funcionais.

Em algumas modalidades, o método de acordo com a presente invenção compreende ainda uma etapa de liofilização da composição obtida que compreende lipídeos e/ou lipídeos modificados, tais como lipídeos funcionais.

Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo gera lipídeos funcionais, tais como emulsificantes.

Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo gera outros compostos funcionais, tais como ésteres de esterol funcional.

Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo gera mais do que 5%, tal como mais do que 10%, tal como mais do que 25%, tal como mais do que 50% de conversão de fosfatidilinositol em lisofosfatidilinositol (liso-PI).

Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo hidrolisa pelo menos 5% dos fosfolipídeos, tal como pelo menos 10% dos fosfolipídeos, tal como pelo menos 20% dos fosfolipídeos, tal como pelo menos 50% dos fosfolipídeos, tal como pelo menos 75% dos fosfolipídeos.

Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo hidrolisa pelo menos 5% dos glicolipídeos, tal como pelo menos 10% dos glicolipídeos, tal como pelo menos 20% dos glicolipídeos, tal como pelo menos 50% dos glicolipídeos, tal como pelo menos 75% dos glicolipídeos.

Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo hidrolisa pelo menos 5% dos triglicerídeos, tal como pelo menos 10% dos triglicerídeos, tal como pelo menos 20% dos tri-

glicerídeos, tal como pelo menos 50% dos triglicerídeos, tal como pelo menos 75% dos triglicerídeos.

Em algumas modalidades, a composição que compreende os lipídeos e/ou lipídeos modificados, tais como os lipídeos funcionais obtidos no método de acordo com a invenção é adicionada diretamente como uma mistura de material de planta solúvel e insolúvel na produção de um produto alimentício.

Em algumas modalidades, o produto alimentício de acordo com a presente invenção é selecionado do grupo que consiste em pão, um cereal para o desjejum, um macarrão, biscoitos, cookies, petiscos e cerveja.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Exemplo 1. Modificação em Escala Laboratorial de farelo de trigo Comercial e lipídeos de farelo de trigo seguida pela avaliação na panificação:

Farelo:

As frações de farelo de trigo obtidas de um moinho comercial foram usadas. As frações consistiam em uma fração de farelo fino e uma fração de farelo grosseiro. Antes do uso, a fração de farelo grosseiro foi moída para obter um tamanho de partícula menor, o que aumentará a superfície específica do farelo, aumentando eventualmente a eficiência da solubilização enzimática do farelo. A moagem foi realizada em um moedor Retch para obter um tamanho médio de partícula de 500 µm. Entretanto, deve ser observado que um tamanho de partícula menor pode ser preferível, em relação ao grau de solubilização.

Enzimas

Tabela 1. Enzimas usadas para a modificação do farelo de trigo

Atividade da Enzima	ID da Enzima
Xilanase	Xilanase bacteriana
Celulase/glicanase	Genencor GC220
Amilase	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)

Atividade da Enzima	ID da Enzima
Pululanase	Genencor Optimax L-1000 (401-05349-002)
Beta-amilase	Genencor Optimalt BBA (EDS 221)
Fosfo-galacto lipase	Grindamyl Powerbake 4070
Transglicosidase	Genencor TGL-500 (1600675782)

Protocolo:

Tabela 2. Protocolo usado para a modificação do farelo

O farelo de trigo foi suspenso em NaPi 50 mM, pH 5 (13% peso/peso) em um recipiente/reator com tampa fechada

A suspensão de farelo é aquecida a 100°C sob agitação e fervida por 2 min.

A amostra é colocada sob agitação (com a tampa fechada) a 50 °C e deixada para equilibrar em relação à temperatura

As enzimas são adicionadas e a reação é continuada a 50°C por 24 h (temperatura e tempo podem ser otimizados posteriormente)

Sobrenadante é separado dos resíduos sólidos

Sobrenadante é fervido para inativar atividade enzimática adicional

Amostra é resfriada e armazenada para evitar a contaminação

Pélete é liofilizado

Sobrenadante é analisado

Testes:

As modificações a seguir foram feitas no farelo (tabela 3)

Tabela 3: Quantidade de farelo, g, tratado com diferentes enzimas

			Gramas de amostra de enzima/10g de farelo						
Teste	Farelo, g	Tampão, g	Xilanase	GC220	Amilase	Pululanase	Beta-amilase	Transgli.	Fosfolipase
1	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	-
2	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	0,000002
3	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	0,000017
4	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	0,000172

Análise:

A fração solúvel do farelo (o sobrenadante) é analisada com relação a:

Conteúdo de matéria seca (%):

Uma amostra quantitativa do farelo solúvel obtido é liofilizada. Depois da liofilização, o tamanho da amostra é novamente quantificado e a quantidade de matéria seca é calculada. Como controle, o tampão é incluído na análise.

Avaliação da modificação do lipídeo usando testes de cozimento:

Receita de cozimento:

O desempenho no cozimento da farinha, farinha com adição de farelo solubilizado foi avaliado em testes de cozimento em pequena escala (50 g de mistura e fatias de 10 g) usando a receita abaixo (tabela 4).

Tabela 4. Receita usada para a avaliação do desempenho da farinha, farinha com adição de com farelo solubilizado e farinha reconstituída com adição de farelo insolúvel. Sal/açúcar é uma mistura 1:1 (peso/peso) de sal e açúcar. A água é a água de absorção determinada pela análise Farinográfica.

Ingredientes	Mini escala
	ml ou g
Farinha	50
Fermento seco	1
Sal/Açúcar	1,6
Água	400BU -2%

Fabricação da massa e cozimento

A farinha (ou a mistura de farinha e farelo) e os ingredientes secos são misturados por um minuto, depois do que a água é adicionada e a misturação é continuada por outros cinco minutos.

Depois da misturação, quatro blocos de massa foram pesados, cada um contendo 10 gramas de farinha. Esses foram moldados em forma de pão usando um moldador manual. As fatias foram colocadas em assadeiras e colocadas em um recipiente fechado (com uma tampa) e deixadas sobre a mesa por 10 minutos. Depois disso, o pão é fermentado a 34°C RH de

85% por 45 minutos e finalmente assado a 230°C por cinco minutos em um forno Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). Durante a expansão da massa, a viscosidade foi avaliada subjetivamente em uma escala de 1 (muito viscosa) a 5 (seca).

O pão foi resfriado por 20 minutos antes da avaliação (pesagem, medida do volume, avaliação do miolo, da crosta e sensorial).

Testes de cozimento

Os testes de cozimento abaixo foram realizados (tabela 5).

Tabela 5. Estrutura experimental do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha tanto com a adição de farelo solubilizado quanto reconstituída com farelo insolúvel, os números entre parênteses referem-se ao tratamento da farinha de acordo com a tabela 3. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Farelo (g) é a quantidade de farelo usada para a reconstituição. Farelo Sol. (ml) é a quantidade de farelo solubilizado adicionado à farinha ao invés de água. Água (ml) é a quantidade de água adicionada a farinha "Farelo" (%) é a quantidade de farelo, tanto de farelo solubilizado quanto insolúvel baseado no peso da farinha. TIPU refere-se à Unidade de Titulação de Fosfolipase como descrita acima.

Cozimento	ID	Farinha, g	Farelo, g	Farelo Sol., g	Água, ml	% "Farelo" na farinha
1	Controle	50	0	0	29,00	-
2	Farelo Sol.5,0% (1)	50	0	29,00	-	5,22
3	Farelo Sol.5,0%, 1TIPU (2)	50	0	29,00	-	
4	Farelo Sol.5,0%, 10TIPU (3)	50	0	29,00	-	
5	Farelo Sol.5,0%, 100TIPU (4)	50	0	29,00	-	
6	Farelo 5,0%	47,5	2,5	-	29,00	5,00

Resultados:

Grau de solubilização do farelo:

Com base na matéria seca, a quantidade de farelo solubilizado nos testes foi de aproximadamente 54%.

Resultados do cozimento:

Como pode ser visto na tabela 6 e na figura 1, a adição de fibras solúveis têm pouco ou nenhum efeito sobre o volume específico do pão. Entretanto, a combinação da solubilização do farelo com a fosfolipase tem um efeito significativo sobre o volume do pão.

Tabela 6. Resultados do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha tanto com a adição de farelo solubilizado quanto reconstituída com farelo insolúvel. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Farelo (g) é a quantidade de farelo usada para a reconstituição. Volume Específico (mg/ml) é o volume específico absoluto dos pães. Volume relativo versus controle (%) é o volume relativo dos pães versus o pão 1 (controle)

Cozimento	ID	Volume Específico, ml/g	Volume relativo versus controle
1	Controle	3,58	100
2	Farelo Sol.5,0%	3,46	97
3	Farelo Sol.5,0%, 1TIPU	4,05	113
4	Farelo Sol.5,0%, 10TIPU	4,24	118
5	Farelo Sol.5,0%, 100TIPU	4,97	139
6	Farelo 5,0%	3,38	94

Os pães resultantes podem ser vistos na figura 2.

Exemplo 2. Modificação em Escala laboratorial de lipídeos de farelo de trigo comercial seguida pela avaliação no cozimento:

Para avaliar o efeito da modificação da fração lipídica que gera lipídeos funcionais com propriedade emulsificantes. Outro experimento usando doses diferentes e lipases diferentes foi realizado.

Farelo:

Frações de farelo de trigo obtidas de um moinho comercial foram usadas. As frações consistiam em uma fração de farelo fino e uma fração de farelo grosseiro. Antes do uso, a fração de farelo grosseiro foi moída para obter um tamanho de partícula menor, o que aumentará a superfície especí-

fica do farelo, aumentando eventualmente a eficiência da solubilização enzimática do farelo. A moagem foi realizada em um moedor Retch para obter um tamanho médio de partícula de 500 µm. Entretanto, deve ser observado que um tamanho de partícula menor pode ser preferível, em relação ao grau de solubilização.

Enzimas:

Tabela 7: Enzimas usadas para a modificação do farelo de trigo

Atividade Enzimática	ID da Enzima
Fosfo-galacto lipase	Grindamyl Powerbake 4070
Lipase	EDS 321

Protocolo:

Tabela 8. Protocolo usado para a modificação do farelo

O farelo de trigo foi suspenso em NaPi 50 mM, pH 5 (13% peso/peso) em um recipiente/reator com tampa fechada

A suspensão de farelo é aquecida a 100°C sob agitação e fervida por 2 min.

A amostra é colocada sob agitação (com a tampa fechada) a 50°C e deixada para equilibrar em relação à temperatura

As enzimas são adicionadas e a reação é continuada a 50°C por 24 h (temperatura e tempo podem ser otimizados posteriormente)

Sobrenadante é separado dos resíduos sólidos

Sobrenadante é fervido para inativar atividade enzimática adicional

Amostra é resfriada e armazenada para evitar a contaminação

Pélete é liofilizado

Sobrenadante é analisado

Testes:

As seguintes modificações foram feitas no farelo (tabela 9)

Tabela 9: Quantidade de farelo, g, tratado com diferentes enzimas

			Gramas de amostra de enzima/ 10g de farelo	
Teste	Farelo, g	Tampão, g	Fosfolipase	Lipase
1	10	66,7	0,000017	
2	10	66,7	0,000172	
3	10	66,7		7,28E-09
4	10	66,7		7,28E-08
5	10	66,7		7,28E-07
6	10	66,7	0,000017	7,28E-08

Análise:

A fração solúvel do farelo (o sobrenadante) é analisada com relação a:

Conteúdo de matéria seca (%):

Uma amostra quantitativa do farelo solúvel obtido é liofilizada. Depois da liofilização, o tamanho da amostra é novamente quantificado e a quantidade de matéria seca é calculada. Como controle, o tampão é incluído na análise.

Avaliação da modificação do lipídeo usando testes de cozimento:

Receita de cozimento:

O desempenho no cozimento da farinha, farinha com adição de farelo modificado solubilizado foi avaliado em testes de cozimento em pequena escala (50 g de mistura e fatias de 10 g) usando a receita abaixo (tabela 10).

Tabela 10. Receita usada para a avaliação do desempenho do cozimento da farinha, farinha com adição de com farelo solubilizado e farinha reconstituída com adição de farelo insolúvel. Sal/açúcar é uma mistura 1:1 (peso/peso) de sal e açúcar. A água é a água de absorção determinada pela análise Farinográfica.

Ingredientes	Mini escala
	ml ou g
Farinha	50
Fermento seco	1

Ingredientes	Mini escala
Sal/Açúcar	1,6
Água	400BU -2%

Fabricação da massa e cozimento

A farinha (ou a mistura de farinha e farelo) e os ingredientes secos são misturados por um minuto, depois do que a água é adicionada e a misturação é continuada por outros cinco minutos.

Depois da misturação, quatro blocos de massa foram pesados, cada um contendo 10 gramas de farinha. Esses foram moldados em forma de pão usando um moldador manual. As fatias foram colocadas em assadeiras e colocadas em um recipiente fechado (com uma tampa) e deixadas sobre a mesa por 10 minutos. Depois disso, o pão é fermentado a 34°C RH de 85% por 45 minutos e finalmente assado a 230°C por cinco minutos em um forno Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). O pão foi resfriado por 20 minutos antes da avaliação (pesagem, medida do volume, avaliação do miolo, da crosta e sensorial).

Testes de cozimento

Os testes de cozimento abaixo foram realizados (tabela 11).

Tabela 11. Estrutura experimental do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha com a adição de farelo solubilizado, os números entre parênteses referem-se ao tratamento da farinha de acordo com a tabela 9. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Extrato de Farelo (ml) é a quantidade de farelo solubilizado adicionado à farinha ao invés de água. Água (ml) é a quantidade de água adicionada à farinha.

Cozimento	ID	Farinha, g	Extrato de farelo, ml	Água, ml
1	Controle	50	0	28
2	Lipídeo do farelo de controle	50	29,00	-
3	Lipídeo do farelo 10 TIPU (1)	50	29,00	-
4	Lipídeo do farelo 100 TIPU (2)	50	29,00	-
5	Lipídeo do farelo 3 LIPU (3)	50	29,00	-

Cozimento	ID	Farinha, g	Extrato de farelo, ml	Água, ml
6	Lipídeo do farelo 30 LIPU (4)	50	29,00	-
7	Lipídeo do farelo 300 LIPU (5)	50	29,00	-
8	Lipídeo do farelo 10TIPI+3 LIPU (6)	50	29,00	-

Resultados:

Grau de solubilização do farelo:

Com base na matéria seca, a quantidade de farelo solubilizado nos testes foi de aproximadamente 30%.

Resultados do cozimento:

Como pode ser visto na tabela 12 e na figura 3, a adição de fibras solúveis têm pouco ou nenhum efeito sobre o volume específico do pão. Entretanto, a combinação da solubilização do farelo com a fosfolipase tem um efeito significativo sobre o volume do pão.

Tabela 12. Resultados do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha com a adição de farelo solubilizado, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 9. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Volume Específico(mg/ml) é o volume específico absoluto dos pães. Volume relativo versus controle (%) é o volume relativo dos pães versus o pão 1 (controle)

Cozimento	ID	VolumeEspecífico, ml/g	Volume relativo versus controle
1	Controle	3,39	100
2	Lipídeo do farelo de controle	3,16	93
3	Lipídeo do farelo 10 TIPU (1)	3,29	97
4	Lipídeo do farelo 100 TIPU (2)	3,44	101
5	Lipídeo do farelo 3 LIPU (3)	3,18	94
6	Lipídeo do farelo 30	3,20	94

Cozimento	ID	VolumeEspecífico, ml/g	Volume relativo versus controle
7	LIPU (4) Lipídeo do farelo 300 LIPU (5)	3,29	97
8	Lipídeo do farelo 10TIPI+3 LIPU (6)	3,52	104

Os pães resultantes podem ser vistos na figura 4.

Como pode ser observado a partir dos resultados acima no experimento 2, nenhum efeito significativo foi obtido no desempenho no cozimento nesse experimento. Comparada com o exemplo 1, a estrutura do exemplo 2 diferiu na ausência de parede celular e de enzimas que modificam o amido. Então, pode ser concluído que deve haver um efeito sinérgico entre as enzimas que modificam a parede celular, o amido e lipídeos em relação a geração de lipídeos funcionais a partir de farelo de trigo.

Exemplo 3. Modificação em Escala Laboratorial de farelo de trigo comercial e lipídeos de farelo de trigo pela avaliação no cozimento -2:

Para avaliar adicionalmente o efeito sinérgico da modificação de farelo de trigo com enzimas que modificam a parede celular, o amido e lipídeos, esse experimento foi realizado.

Farelo:

Frações de farelo de trigo obtidas de um moinho comercial foram usadas. As frações consistiam em uma fração de farelo fino e uma fração de farelo grosseiro. Antes do uso, a fração de farelo grosseiro foi moída para obter um tamanho de partícula menor, o que aumentará a superfície específica do farelo, aumentando eventualmente a eficiência da solubilização enzimática do farelo. A moagem foi realizada em um moedor Retch para obter um tamanho médio de partícula de 500 µm. Entretanto, deve ser observado que um tamanho de partícula menor pode ser preferível, em relação ao grau de solubilização.

Enzimas:

Tabela13: Enzimas usadas para a modificação do farelo de trigo

Atividade Enzimática	ID da Enzima
Xilanase	Xilanase bacteriana
Celulase/glicanase	Genencor GC220
Amilase	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galacto lipase	Grindamyl Powerbake 4070

Protocolo:

Tabela 14. Protocolo usado para a modificação do farelo

O farelo de trigo foi suspenso em NaPi 50 mM, pH 5 (13% peso/peso) em um recipiente/reator com tampa fechada

A suspensão de farelo é aquecida a 100°C sob agitação e fervida por 2 min.

A amostra é colocada sob agitação (com a tampa fechada) a 50°C e deixada para equilibrar em relação à temperatura

As enzimas são adicionadas e a reação é continuada a 50°C por 24 h (temperatura e tempo podem ser otimizados posteriormente)

Sobrenadante é separado dos resíduos sólidos

Sobrenadante é fervido para inativar atividade enzimática adicional

Amostra é resfriada e armazenada para evitar a contaminação

Pélete é liofilizado

Sobrenadante é analisado

Testes:

As seguintes modificações foram feitas no farelo (tabela 15)

Tabela 15: Quantidade de farelo, g, tratado com diferentes enzimas

			Gramas de amostra de enzima/10g de farelo			
Teste	Farelo, g	Tampão, g	Xilanase	GC220	Amilase	Fosfolipase
1	10	66,7				
2	10	66,7	1,12			0,000172
3	10	66,7	1,12	0,05		0,000172
4	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,000172
5	10	66,7		0,05		0,000172
6	10	66,7			0,04	0,000172
7	10	66,7				0,000172

Análise:

A fração solúvel do farelo (o sobrenadante) é analisada com relação a:

Conteúdo de matéria seca (%):

Uma amostra quantitativa do farelo solúvel obtido é liofilizada. Depois da liofilização, o tamanho da amostra é novamente quantificado e a quantidade de matéria seca é calculada. Como controle, o tampão é incluído na análise.

Avaliação da modificação do lipídeo usando testes de cozimento:

Receita de cozimento:

O desempenho no cozimento da farinha, farinha com adição de farelo modificado solubilizado foi avaliado em testes de cozimento em pequena escala (50 g de mistura e fatias de 10 g) usando a receita abaixo (tabela 16).

Tabela 16. Receita usada para a avaliação do desempenho da farinha, farinha com adição de com farelo solubilizado e farinha reconstituída com adição de farelo insolúvel. Sal/açúcar é uma mistura 1:1 (peso/peso) de sal e açúcar. A água é a água de absorção determinada pela análise Farinográfica.

Ingredientes	Mini escala
	ml ou g
Farinha	50
Fermento seco	1

Sal/Açúcar	1,6
Água	400BU -2%

Fabricação da massa e cozimento

A farinha (ou a mistura de farinha e farelo) e os ingredientes secos são misturados por um minuto, depois do que a água é adicionada e a misturação é continuada por outros cinco minutos.

Depois da misturação, quatro blocos de massa foram pesados, cada um contendo 10 gramas de farinha. Esses foram moldados em forma de pão usando um moldador manual. As fatias foram colocadas em assadeiras e colocadas em um recipiente fechado (com uma tampa) e deixadas sobre a mesa por 10 minutos. Depois disso, o pão é fermentado a 34°C RH de 85% por 45 minutos e finalmente assado a 230°C por cinco minutos em um forno Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). O pão foi resfriado por 20 minutos antes da avaliação (pesagem, medida do volume, avaliação do miolo, da crosta e sensorial).

Testes de cozimento

Os testes de cozimento abaixo foram realizados (tabela 17).

Tabela 17. Estrutura experimental do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha com a adição de farelo solubilizado, os números entre parênteses referem-se ao tratamento da farinha de acordo com a tabela 15. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Extrato de Farelo (ml) é a quantidade de farelo solubilizado adicionado à farinha ao invés de água. Água (ml) é a quantidade de água adicionada a farinha. Cozimento no. 9 é uma repetição do cozimento 5, entretanto com a adição de 0,2 mg de xilanase e 0,5 mg de fosfolipase/kg de farinha durante a misturação da massa.

Cozimento	ID	Farinha, g	Enz. extra, mg/kg	Extrato de farelo, ml	Água, ml
1	Controle	50		0	28
2	Farelo de controle (1)	50		0	29
3	Farelo BS3, KLM1 (2)	50		29	
4	Farelo BS3, GC 220, KLM1 (3)	50		29	
5	Farelo BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (4)	50		29	

Cozimento	ID	Farinha, g	Enz. extra, mg/kg	Extrato de farelo, ml	Água, ml
6	Farelo GC220, KLM1 (5)	50		29	
7	Farelo Spezyme, KLM1 (6)	50		29	
8	Bran KLM1 (7)	50		29	
9	Farelo, BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (+BS3, KLM1)	50	0,2 + 0,5	29	

Resultados:

Grau de solubilização do farelo:

Com base na matéria seca, a quantidade de farelo solubilizado nos testes foi, em média, de aproximadamente 30 a 54%.

Resultados do cozimento:

Como pode ser visto na tabela 18 e na figura 5, a adição de fibras solúveis têm pouco ou nenhum efeito sobre o volume específico do pão. Entretanto, a combinação da solubilização do farelo com a fosfolipase tem um efeito significativo sobre o volume do pão.

Tabela 18. Resultados do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha com a adição de farelo solubilizado, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 15. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Volume Específico(mg/ml) é o volume específico absoluto dos pães. Volume relativo versus controle (%) é o volume relativo dos pães versus o pão 1 (controle)

Cozimento	ID	Volume Específico, ml/g	Volume relativo versus farelo de controle
1	Farelo	3,38	110
2	Farelo de controle (1)	3,08	100
3	Farelo BS3, KLM1 (2)	3,14	102
4	Farelo BS3, GC 220, KLM1 (3)	3,57	116
5	Farelo BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (4)	3,84	125
6	Farelo GC220, KLM1 (5)	3,57	116
7	Farelo Spezyme, KLM1 (6)	3,26	106
8	Farelo KLM1 (7)	3,10	101

Cozimento	ID	Volume Específico, ml/g	Volume relativo versus farelo de controle
9	Farelo, BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (+BS3, KLM1)	4,98	162

Os pães resultantes podem ser vistos na figura 6.

Como pode ser observado a partir dos resultados acima no experimento 3, um efeito significativo foi obtido no desempenho no cozimento nesse experimento pela combinação do tratamento do farelo com enzimas que modificam a parede celular, amido e lipídeos.

Exemplo 4. Modificação em escala laboratorial de farelo de trigo comercial e de lipídeos de farelo de trigo seguida pela avaliação do farelo modificado no cozimento:

Para avaliar o efeito sinérgico do farelo de trigo modificado com enzimas que modificam a parede celular, amido e lipídeo, foi testado o efeito da geração *in situ* de lipídeos modificados que possuem propriedades emulsificantes, sobre a adição de farelo de trigo em relação ao desempenho no cozimento. É bem sabido que a adição de farelo à farinha ou a farinha de grão inteiro, tem um potencial de cozimento menor do que a farinha com endosperma.

Farelo:

Frações de farelo de trigo obtidas de um moinho comercial foram usadas. As frações consistiam em uma fração de farelo fino e uma fração de farelo grosseiro. Antes do uso, a fração de farelo grosseiro foi moída para obter um tamanho de partícula menor, o que aumentará a superfície específica do farelo, aumentando eventualmente a eficiência da solubilização enzimática do farelo. A moagem foi realizada em um moedor Retch para obter um tamanho médio de partícula de 500 µm. Entretanto, deve ser observado que um tamanho de partícula menor pode ser preferível, em relação ao grau de solubilização.

Enzimas:

Tabela19: Enzimas usadas para a modificação do farelo de trigo

Atividade Enzimática	ID da Enzima
Xilanase	Xilanase bacteriana Danisco (1223449, 4010866762)
Celulase/glicanase	Genencor GC220
Amilase	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galacto lipase	Grindamyl Powerbake 4070 Danisco

Protocolo:

Tabela 20. Protocolo usado para a modificação do farelo

O farelo de trigo foi suspenso em NaPi 50 mM, pH 5 (13% peso/peso) em um recipiente/reator com tampa fechada

A suspensão de farelo é aquecida a 100°C sob agitação e fervida por 2 min.

A amostra é colocada sob agitação (com a tampa fechada) a 50°C e deixada para equilibrar em relação a temperatura

As enzimas são adicionadas e a reação é continuada a 50°C por 24 h (temperatura e tempo podem ser otimizados posteriormente)

O farelo modificado é fervido para inativar atividade enzimática adicional

Amostra é resfriada e armazenada para evitar a contaminação

Testes:

As seguintes modificações foram feitas no farelo (tabela 21)

Tabela 21: Quantidade de farelo, g, tratado com diferentes enzimas

			Gramas de amostra de enzima/10g de farelo			
Teste	Farelo, g	Tampão, g	Xilanase	GC220	Amilase	Danisco Fosfo-galactolipase
1	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
2	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,0003

Avaliação da modificação do lipídeo usando testes de cozimento:

Receita de cozimento:

O desempenho no cozimento da farinha e da farinha com adição de farelo modificado foi avaliado em testes de cozimento em pequena escala (50 g de mistura e fatias de 10 g) usando a receita abaixo (tabela 22).

Tabela 22. Receita usada para a avaliação do desempenho da farinha, farinha com adição de com farelo modificado. Sal/açúcar é uma mistura 1:1 (peso/peso) de sal e açúcar. A água é a água de absorção determinada pela análise Farinográfica.

Ingredientes	Mini escala
	ml ou g
Farinha	50
Fermento seco	1
Sal/Açúcar	1,6
Água	400BU -2%

Fabricação da massa e cozimento

A farinha e os ingredientes secos são misturados por um minuto, depois do que a água (ou água e farelo modificado) é adicionada e a misturação é continuada por outros cinco minutos.

Depois da misturação, quatro blocos de massa foram pesados, cada um contendo 10 gramas de farinha. Esses foram moldados em forma de pão usando um moldador manual. As fatias foram colocadas em assadeiras e colocadas em um recipiente fechado (com uma tampa) e deixadas sobre a mesa por 10 minutos. Depois disso, o pão é fermentado a 34°C RH de 85% por 45 minutos e finalmente assado a 230°C por cinco minutos em um forno Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). O pão foi resfriado por 20 minutos antes da avaliação (pesagem, medida do volume, avaliação do miolo, da crosta e sensorial).

Testes de cozimento

Os testes de cozimento abaixo foram realizados (tabela 23).

Tabela 23. Estrutura experimental do teste de cozimento. ID refere-se à composição da massa de farinha, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 21. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Extrato de Farelo (ml) é a quantidade de farelo solubilizado adicionado à farinha ao invés de água. Água (ml) é a quantidade de água adicionada à farinha.

Cozimento	ID	Farinha, g	Extrato de farelo, ml	Água, ml
1	Controle (Trigo)	50	0	29
2	Enzima parede celular W Bran (com insolúveis) (1)	50	30	0
3	Enz. parede celular W Bran (com insolúveis) + Lipase (com insol.) (2)	50	30	0

Resultados:

Resultados do cozimento:

Como pode ser visto na tabela 24 e na figura 7, a adição de fibras modificadas teve um efeito negativo sobre o volume específico do pão. Entretanto, a adição de farelo também modificado com fosfolipase, gerando lipídeos funcionais, possui um efeito muito menos prejudicial sobre o volume do pão comparado com a adição apenas de farelo com parede celular modificado.

Tabela 24. Resultados do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 21. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Volume Específico(mg/ml) é o volume específico absoluto dos pães. Volume relativo versus controle (%) é o volume relativo dos pães versus o pão 1 (controle)

Cozimento	ID	Vol Especif., ml/g	Vol rel versus controle
1	Controle (trigo)	3,40	100
2	Enz. parede celular W Bran (com insolúveis) (1)	3,14	92
3	Enz. parede celular W Bran (com insolúveis) + Lipase (com insol.) (2)	3,51	103

Os pães resultantes podem ser vistos na figura 7.

Como pode ser observado a partir dos resultados acima, um efeito significativo foi obtido no desempenho no cozimento nesse experimento pela combinação do tratamento do farelo com enzimas que modificam a parede celular, amido e lipídeos antes da adição à massa de farinha.

Exemplo 5. Modificação em escala laboratorial de farelo de arroz e lipídeos de farelo de arroz pela avaliação do farelo solubilizado e dos lipídeos do farelo modificado no cozimento:

Para avaliar adicionalmente os achados surpreendentes com relação à solubilização de farelo combinada com a modificação dos lipídeos do farelo, foi testado o efeito do farelo de arroz solubilizado e dos lipídeos do farelo de arroz modificado em testes de cozimento.

Farelo:

Uma fração de farelo de arroz comercial foi usada no experimento.

Enzimas:

Tabela 25: Enzimas usadas para a modificação do farelo de arroz

Atividade Enzimática	ID da Enzima
Xilanase	Xilanase bacteriana Danisco (1223449, 4010866762)
Celulase/glicanase	Genencor GC220
Amilase	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galacto lipase	Grindamyl Powerbake 4070 Danisco

Protocolo:

Tabela 26. Protocolo usado para a modificação do farelo

O farelo de arroz foi suspenso em NaPi 50 mM, pH 5 (13% peso/peso) em um recipiente/reator com tampa fechada

A suspensão de farelo é aquecida a 100°C sob agitação e fervida por 2 min.

A amostra é colocada sob agitação (com a tampa fechada) a 50°C e deixada para equilibrar em relação a temperatura

As enzimas são adicionadas e a reação é continuada a 50°C por 24 h (temperatura e tempo podem ser otimizados posteriormente)

Sobrenadante é separado dos resíduos sólidos

Sobrenadante é fervido para inativar atividade enzimática adicional

Amostra é resfriada e armazenada para evitar a contaminação

Testes:

As seguintes modificações foram feitas no farelo de arroz (tabela 27)

Tabela 27: Quantidade de farelo de arroz, g, tratado com diferentes enzimas

			Gramas de amostra de enzima/10g de farelo			
Teste	Farelo, g	Tampão, g	Xilanase	GC220	Amilase	Danisco Fosfo-galactolipase
1	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
2	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,0003

Avaliação da modificação do lipídeo usando testes de cozimento:

Receita de cozimento:

O desempenho no cozimento da farinha e da farinha com adição de farelo modificado foi avaliado em testes de cozimento em pequena escala (50 g de mistura e fatias de 10 g) usando a receita abaixo (tabela 28).

Tabela 28. Receita usada para a avaliação do desempenho de diferentes composições de massa de farinha (+/- farelo solubilizado). Sal/açúcar é uma mistura 1:1 (peso/peso) de sal e açúcar. A água é a água de absorção determinada pela análise Farinográfica.

Ingredientes	Mini escala
	ml ou g
Farinha	50
Fermento seco	1

Ingredientes	Mini escala
Sal/Açúcar	1,6
Água	400BU -2%

Fabricação da massa e cozimento

A farinha e os ingredientes secos são misturados por um minuto, depois do que a água (ou água e farelo modificado) é adicionada e a misturação é continuada por outros cinco minutos.

Depois da misturação, quatro blocos de massa foram pesados, cada um contendo 10 gramas de farinha. Esses foram moldados em forma de pão usando um moldador manual. As fatias foram colocadas em assadeiras e colocadas em um recipiente fechado (com uma tampa) e deixadas sobre a mesa por 10 minutos. Depois disso, o pão é fermentado a 34°C RH de 85% por 45 minutos e finalmente assado a 230°C por cinco minutos em um forno Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). O pão foi resfriado por 20 minutos antes da avaliação (pesagem, medida do volume, avaliação do miolo, da crosta e sensorial).

Testes de cozimento

Os testes de cozimento abaixo foram realizados (tabela 29).

Tabela 29. Estrutura experimental do teste de cozimento. ID refere-se à composição da massa de farinha, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 27. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Extrato de Farelo (ml) é a quantidade de farelo solubilizado adicionado à farinha ao invés de água. Água (ml) é a quantidade de água adicionada a farinha.

Cozimento	ID	Farinha, g	Extrato de farelo, ml
1	Controle (Trigo)	50	0
2	Enz. parede celular R Bran (1)	50	30
3	Enz. parede celular R Bran + Lipase (2)	50	30

Resultados:

Resultados do cozimento:

Como pode ser visto na tabela 30 e na figura 8, a adição de fibras solúveis modificadas não teve um efeito negativo sobre o volume específico do pão, na realidade teve um efeito positivo em relação ao volume do pão. Entretanto, a adição de fibras solúveis também modificadas com fosfolipase, gerando lipídeos funcionais, possui um efeito muito melhor sobre o volume do pão comparado com a adição apenas de fibras solúveis modificadas.

Tabela 30. Resultados do teste de cozimento. ID refere-se à composição da farinha, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 27. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Volume Específico(mg/ml) é o volume específico absoluto dos pães. Volume relativo versus controle (%) é o volume relativo dos pães versus o pão 1 (controle)

Cozimento	ID	Vol Especif., ml/g	Vol relelativo versus controle
1	Controle (trigo)	3,40	100
2	Enz. parede celular R Bran (1)	4,16	123
3	Enz. parede celular R Bran + Lipase (2)	4,54	134

Os pães resultantes podem ser vistos na figura 8.

Como pode ser observado a partir dos resultados acima, um efeito significativo foi obtido no desempenho no cozimento nesse experimento pela adição de farelo solúvel e lipídeos modificados obtidos pela combinação do tratamento prévio do farelo de arroz com enzimas que modificam a parede celular, amido e lipídeos.

Exemplo 6. Modificação em escala laboratorial de farelo de trigo comercial e lipídeos de farelo de trigo usando diferentes lipases, seguida pela avaliação no cozimento.

Para avaliar adicionalmente os achados surpreendentes com relação à solubilização de farelo combinada com a modificação dos lipídeos do farelo,foram testadas outras lipases diferentes da Fosfo-galacto lipase da Danisco, seguido pela avaliação dos lipídeos modificados gerados em testes de cozimento.

Farelo:

Frações de farelo de trigo obtidas de um moinho comercial foram usadas. As frações consistiam em uma fração de farelo fino e uma fração de farelo grosseiro. Antes do uso, a fração de farelo grosseiro foi moída para obter um tamanho de partícula menor, o que aumentará a superfície específica do farelo, aumentando eventualmente a eficiência da solubilização enzimática do farelo. A moagem foi realizada em um moedor Retch para obter um tamanho médio de partícula de 500 µm. Entretanto, deve ser observado que um tamanho de partícula menor pode ser preferível, em relação ao grau de solubilização.

Enzimas:

Tabela31: Enzimas usadas para a modificação do farelo de trigo

Atividade Enzimática	ID da Enzima
Xilanase	Xilanase bacteriana Danisco (1223449, 4010866762)
Celulase/glicanase	Genencor GC220
Amilase	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galacto lipase	Grindamyl Powerbake 4070 Danisco
Fosfo-galacto lipase	Novozymes Lipopan F (lipopan F)
Fosfo-galacto lipase	DSM'S Panamore (Panamore)

Protocolo:

Tabela 32. Protocolo usado para a modificação do farelo

O farelo de trigo foi suspenso em NaPi 50 mM, pH 5 (13% peso/peso) em um recipiente/reator com tampa fechada

A suspensão de farelo é aquecida a 100°C sob agitação e fervida por 2 min.

A amostra é colocada sob agitação (com a tampa fechada) a 50°C e deixada para equilibrar em relação à temperatura

As enzimas são adicionadas e a reação é continuada a 50°C por

24 h (temperatura e tempo podem ser otimizados posteriormente)

Sobrenadante é separado dos resíduos sólidos

Sobrenadante é fervido para inativar atividade enzimática adicional

Amostra é resfriada e armazenada para evitar a contaminação

Testes:

As seguintes modificações foram feitas no farelo (tabela 33)

Tabela 33: Quantidade de farelo, g, tratado com diferentes enzimas

			Gramas de amostra de enzima/10g de farelo			
Teste	Farelo, g	Tampão, g	Xilanase	GC220	Amilase	Fosfolipase
1	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
2	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
3	10	66,7	019	0,05	0,04	0,0003 (Danisco)
4	10	66,7	019	0,05	0,04	0,00013 (Lipopan F)
5	10	66,7	019	0,05	0,04	0,0002 (Panamore)

Avaliação da modificação do lipídeo usando testes de cozimento:

Receita de cozimento:

O desempenho no cozimento da farinha e da farinha com adição de farelo modificado solubilizado (+/- lipídeos modificados) foi avaliado em testes de cozimento em pequena escala (50 g de mistura e fatias de 10 g) usando a receita abaixo (tabela 34).

Tabela 34. Receita usada para a avaliação do desempenho no cozimento de farinha, farinha com adição de farelo solubilizado e farinha com adição de farelo solubilizado e lipídeos modificados. Sal/açúcar é uma mistura 1:1 (peso/peso) de sal e açúcar. A água é a água de absorção determinada pela análise Farinográfica.

Ingredientes	**Mini escala**
	ml ou g
Farinha	50

Ingredientes	Mini escala
Fermento seco	1
Sal/Açúcar	1,6
Água	400BU -2%

Fabricação da massa e cozimento

A farinha e os ingredientes secos são misturados por um minuto, depois do que a água é adicionada e a misturação é continuada por outros cinco minutos.

Depois da misturação, quatro blocos de massa foram pesados, cada um contendo 10 gramas de farinha. Esses foram moldados em forma de pão usando um moldador manual. As fatias foram colocadas em assadeiras e colocadas em um recipiente fechado (com uma tampa) e deixadas sobre a mesa por 10 minutos. Depois disso, o pão é fermentado a 34°C RH de 85% por 45 minutos e finalmente assado a 230°C por cinco minutos em um forno Bago (Bago-line, Fáborg, Dinamarca). O pão foi resfriado por 20 minutos antes da avaliação (pesagem, medida do volume, avaliação do miolo, da crosta e sensorial).

Testes de cozimento

Os testes de cozimento abaixo foram realizados (tabela 35).

Tabela 35. Estrutura experimental do teste de cozimento. ID refere-se à composição da massa de farinha, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 33. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Extrato de Farelo (ml) é a quantidade de farelo solubilizado adicionado a farinha ao invés de água. Água (ml) é a quantidade de água adicionada a farinha.

Cozimento	ID	Farinha, g	Extrato de farelo, ml	Água, ml
1	Controle (trigo)	50	0	29
2	Enz. parede celular R Bran (1)	50	30	
3	Enz. parede celular R Bran + Danisco (2)	50	30	
4	Enz. parede celular R Bran + Lipopan F (3)	50	30	

Cozimento	ID	Farinha, g	Extrato de farelo, ml	Água, ml
5	Enz. parede celular R Bran + Panamore (4)	50	30	

Resultados:

Resultados do cozimento:

Como pode ser visto na tabela 36 e na figura 9, a adição de fibras solúveis teve pouco ou nenhum efeito sobre o volume específico do pão. Entretanto, a combinação da solubilização do farelo com fosfolipase, teve um efeito significativo sobre o volume do pão; todo o pão assado com farelo tratado com as lipases em combinação com as enzimas que modificam a parede celular e o amido, teve um aumento de volume comparado com a farinha do controle.

Tabela 36. Resultados do teste de cozimento. ID refere-se à composição da massa de farinha, os números entre parênteses referem-se ao tratamento do farelo de acordo com a tabela 33. Farinha (g) é a quantidade de farinha no pão. Volume Específico(mg/ml) é o volume específico absoluto dos pães. Vol rel versus controle (%) é o volume relativo dos pães versus o pão 1 (controle)

Cozimento	ID	Volume Específico, ml/g	Volume rel versus controle
1	Controle (trigo)	3,40	**100**
2	Enz. parede celular W Bran (1)	3,33	**98**
3	Enz. parede celular W Bran + Danisco (2)	3,38	**114**
4	Enz. parede celular R Bran + Lipopan F (3)	3,84	**113**
	Enz. parede celular R Bran + Panamore (4)	3,91	**115**

Os pães resultantes podem ser vistos na figura 9.

Como pode ser observado a partir dos resultados acima no experimento 6, um efeito significativo foi obtido no desempenho no cozimento nesse experimento pela combinação do tratamento do farelo com enzimas que modificam a parede celular, amido e lipídeos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de um material de planta que contém lipídeo, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de tratar uma suspensão líquida de um material de planta pelo menos parcialmente solubilizado que contém lipídeo com uma ou mais enzimas que modificam lipídeo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a suspensão líquida de um material de planta pelo menos parcialmente solubilizado que contém lipídeo é essencialmente livre de amido.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que menos do que cerca de 50%, tal como menos do que cerca de 40%, tal como menos do que cerca de 30%, tal como menos do que cerca de 20%, tal como menos do que cerca de 10%, tal como menos do que cerca de 6%, tal como menos do que cerca de 3%, tal como menos do que cerca de 1% (peso/peso) da suspensão líquida de um material de planta pelo menos parcialmente solubilizado que contém lipídeo é amido ou componentes que contêm amido, tal como farinha.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que ainda compreende uma etapa precedente ou simultânea de tratar uma suspensão líquida de material de planta que contém lipídeo para obter o dito material de planta pelo menos parcialmente solubilizado, em que o dito tratamento para obter um material de planta pelo menos parcialmente solubilizado é um tratamento com uma ou mais enzimas que modificam a parede celular selecionada do grupo que consiste em xilanase e uma celulase, tal como celobio-hidrolases, endoglicanases e beta-glicanase.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a dita uma ou mais enzimas que modificam lipídeo é selecionada do grupo que consiste em: uma triacilglicerol lipase, uma fosfolipase e uma galactolipase.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

5, caracterizado pelo fato de que o dito material de planta é um farelo de cereal.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito farelo de cereal é obtido a partir de um processo de moagem industrial e adicionalmente moído para obter um tamanho médio de partícula abaixo de 500 µm, tal como abaixo de 400 µm, tal como abaixo de 200 µm.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o dito material de planta é um produto colateral do processamento de material de planta, tal como pasta de neutralização do refinamento de óleos vegetais, grãos usados para fermentação ou grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS).

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a composição obtida que compreende lipídeos modificados, tais como lipídeos funcionais, é tratada adicionalmente para inativar atividade adicional de enzima.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o grau de solubilização do dito material de planta como determinado na matéria seca versus a matéria seca de material de planta obtido, é maior do que 15%, tal como maior do que 25%, tal como maior do que 35%, tal como maior do que 40%, tal como maior do que 50%, tal como na faixa entre 40% a 60%, tal como na faixa entre 50% a 60%.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o conteúdo total de lipídeos e lipídeos modificados, tais como lipídeos funcionais, como determinado na matéria seca versus a matéria seca de material de planta na fração solúvel obtida é pelo menos cerca de 0,05%, tal como pelo menos cerca de 1,0%, tal como na faixa de 0,05 a 5%.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento com uma ou mais enzimas que modificam lipídeos converte mais do que 5%, tal como mais do que 10%, tal como mais do que 25%, tal como mais do que 50% de

fosfatidilinositol em lisofosfatidilinositol (liso-PI).

13. Composição, caracterizada pelo fato de ser produzida por um método, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

14. Uso de uma composição como definida na reivindicação 13, caracterizado pelo fato de ser na produção de um produto alimentício ou na produção de bioetanol.

15. Produto alimentício, caracterizado pelo fato de ser obtido por um uso, como definido na reivindicação 14.

FIG. 1

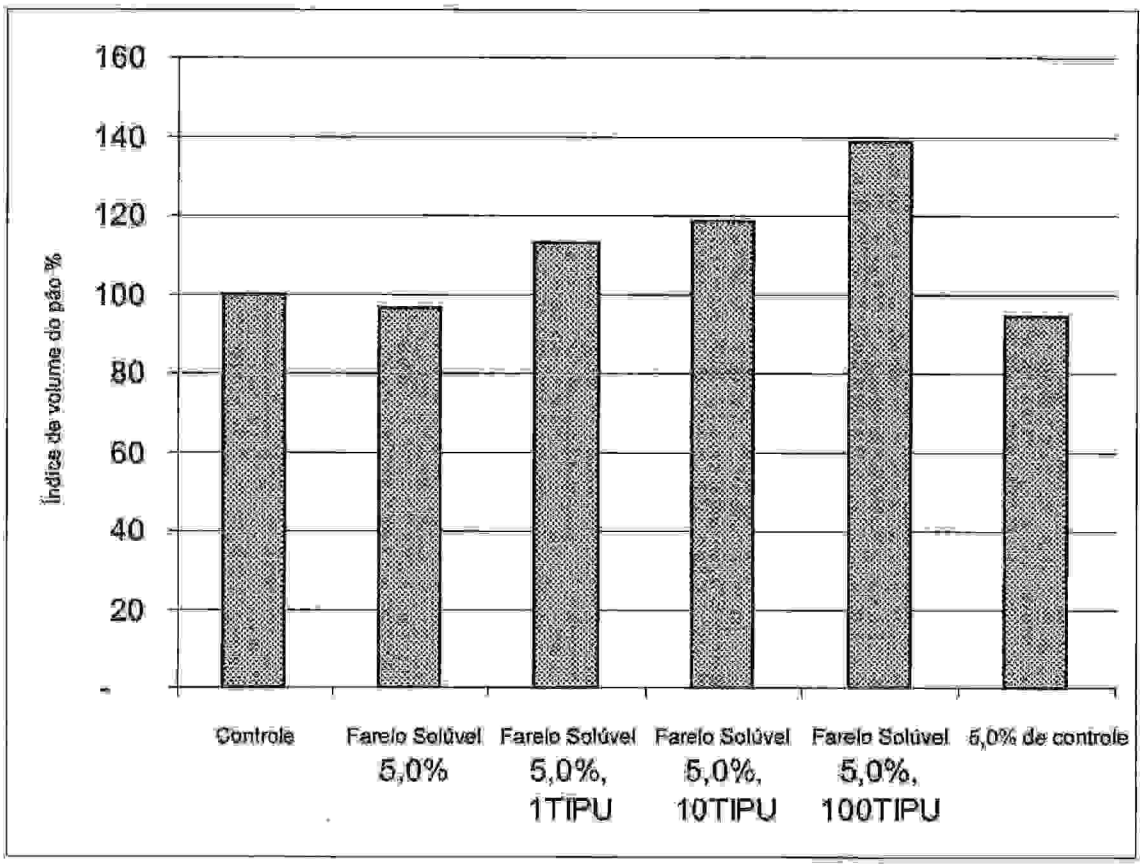

160
140
120
100
80
60
40
20
-
Índice de volume do pão %
Controle
Farelo Solúvel 5,0%
Farelo Solúvel 5,0%, 1TIPU
Farelo Solúvel 5,0%, 10TIPU
Farelo Solúvel 5,0%, 100TIPU
5,0% de controle

FIG. 2

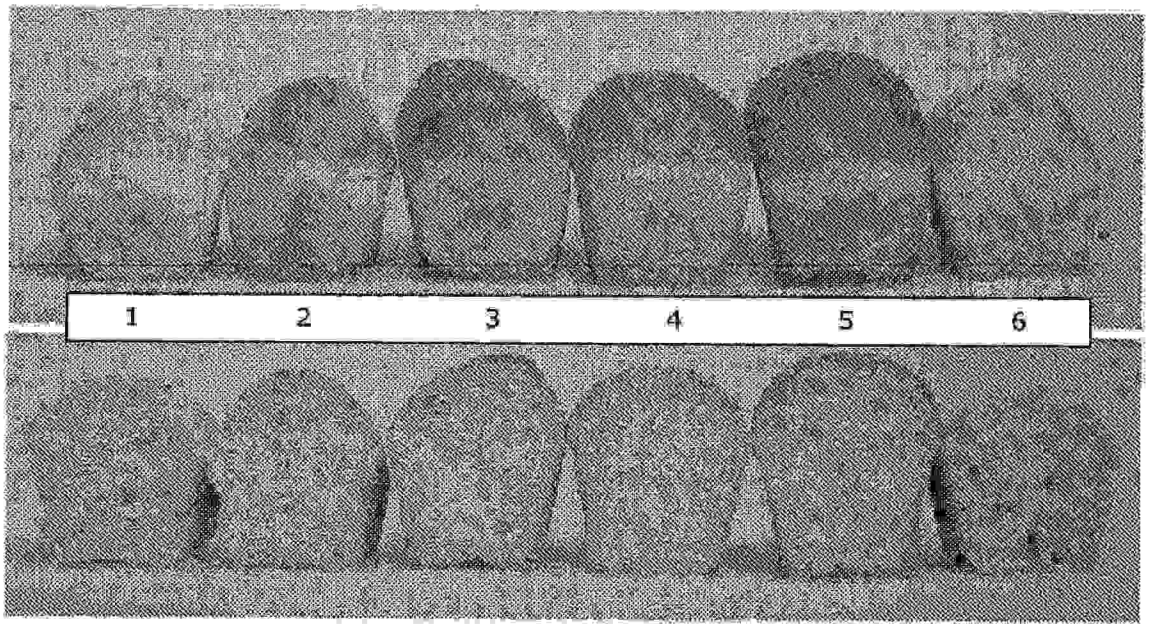


FIG. 3

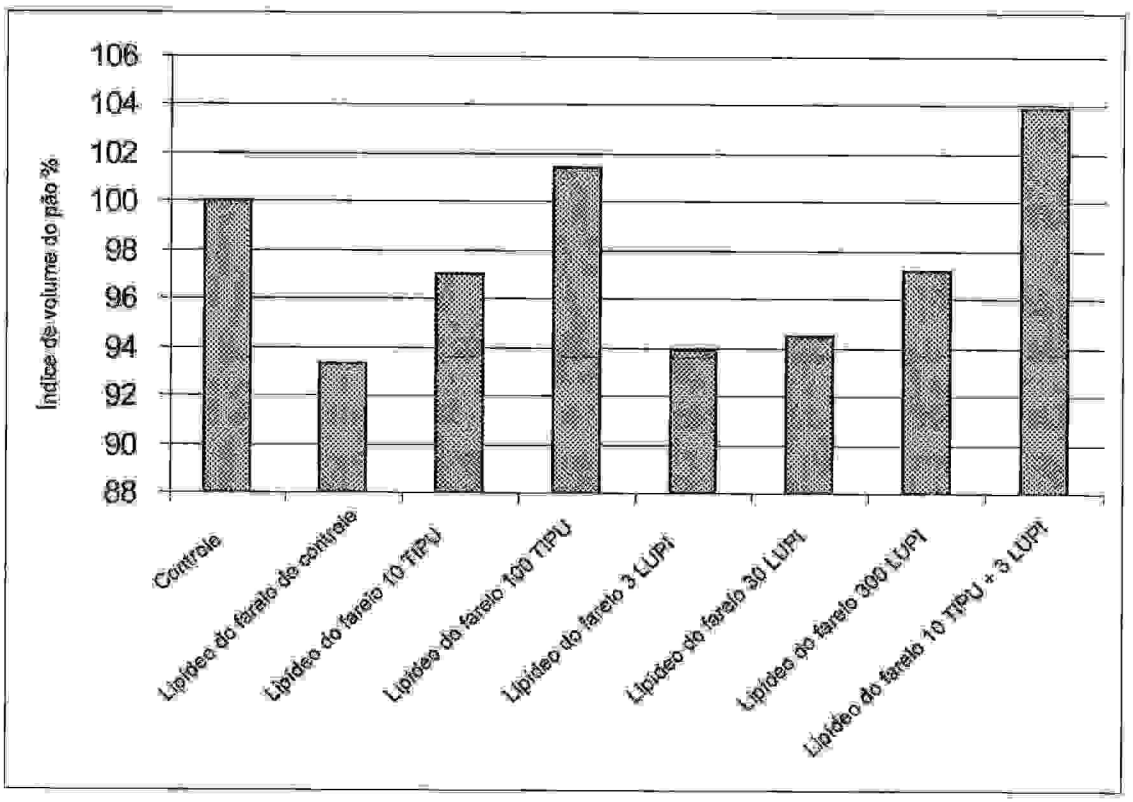

Índice de volume do pão %
106
104
102
100
98
96
94
92
90
88
Controle
Lipídeo do farelo de controle
Lipídeo do farelo 10 TIPU
Lipídeo do farelo 100 TIPU
Lipídeo do farelo 3 LUPI
Lipídeo do farelo 30 LUPI
Lipídeo do farelo 300 LUPI
Lipídeo do farelo 10 TIPU + 3 LUPI

FIG. 4

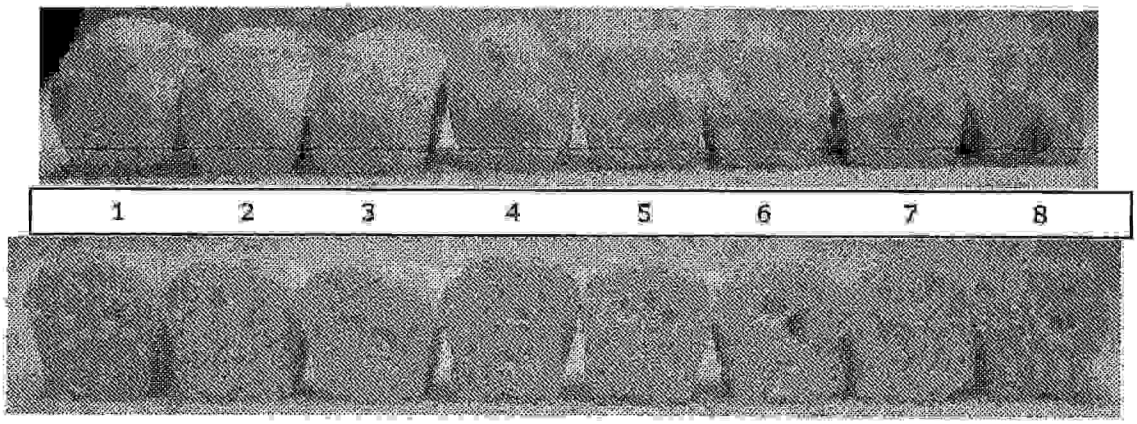


FIG. 5

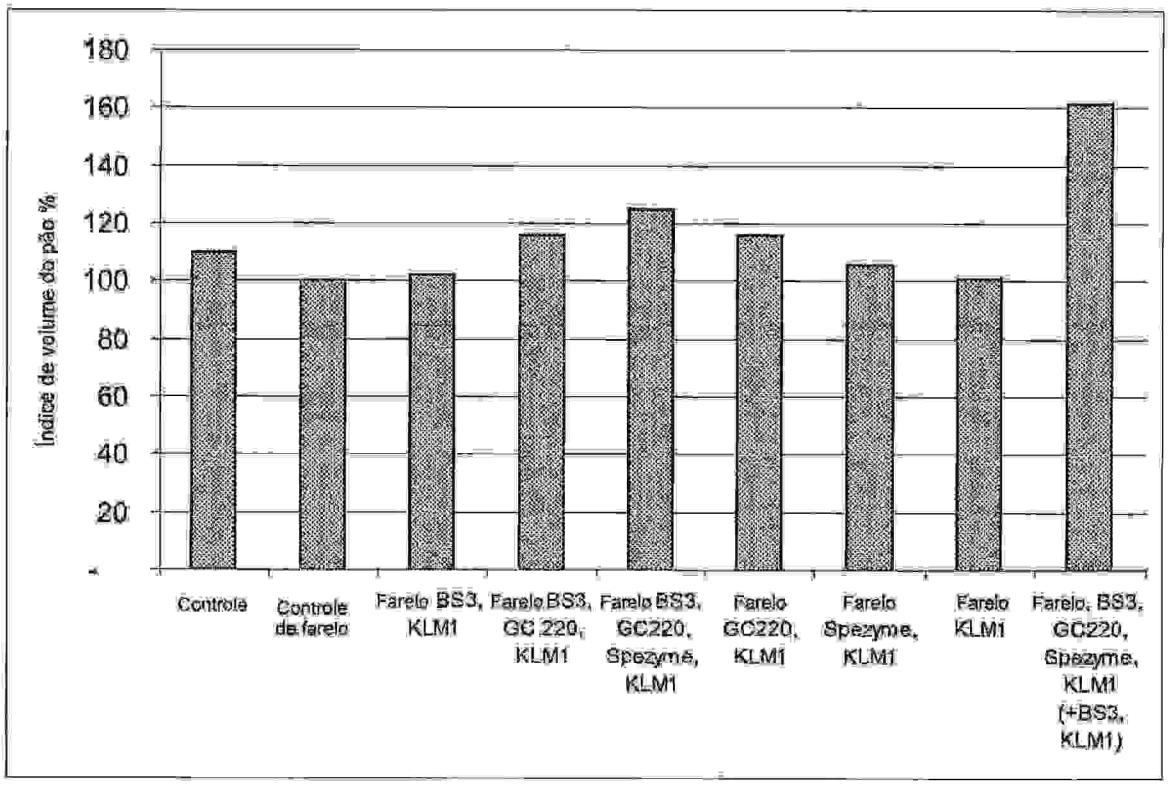

Índice de volume do pão %
180
160
140
120
100
80
60
40
20
-
Controle
Controle de farelo
Farelo BS3, KLM1
Farelo BS3, GC 220, KLM1
Farelo BS3, GC220, Spezyme, KLM1
Farelo GC220, KLM1
Farelo Spezyme, KLM1
Farelo KLM1
Farelo, BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (+BS3, KLM1)

FIG. 6

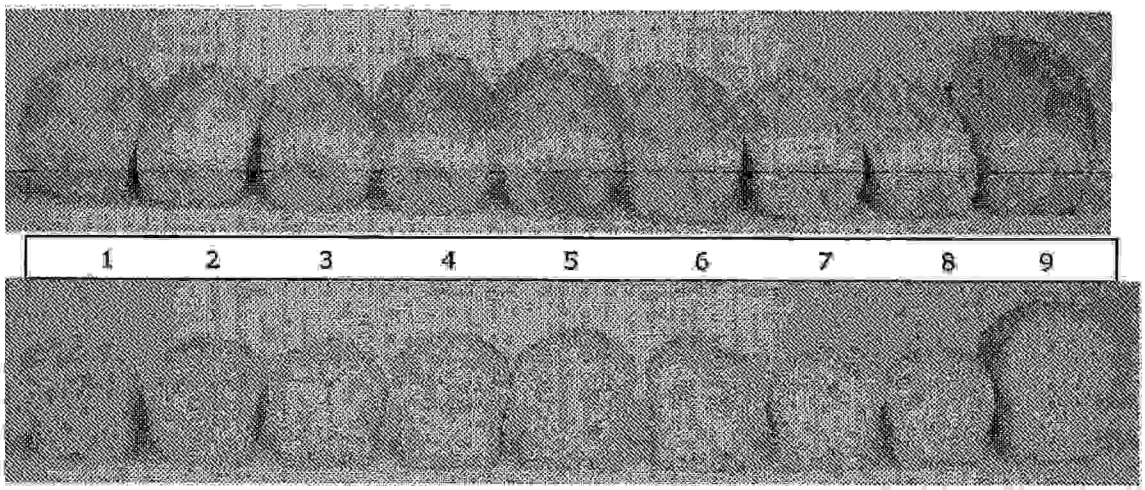


FIG. 7

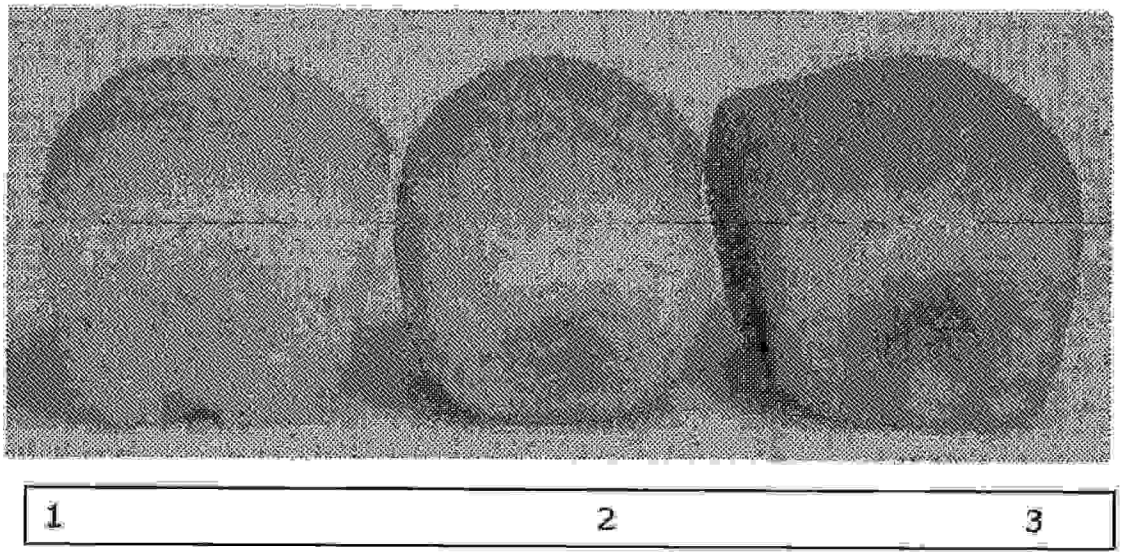


FIG. 8

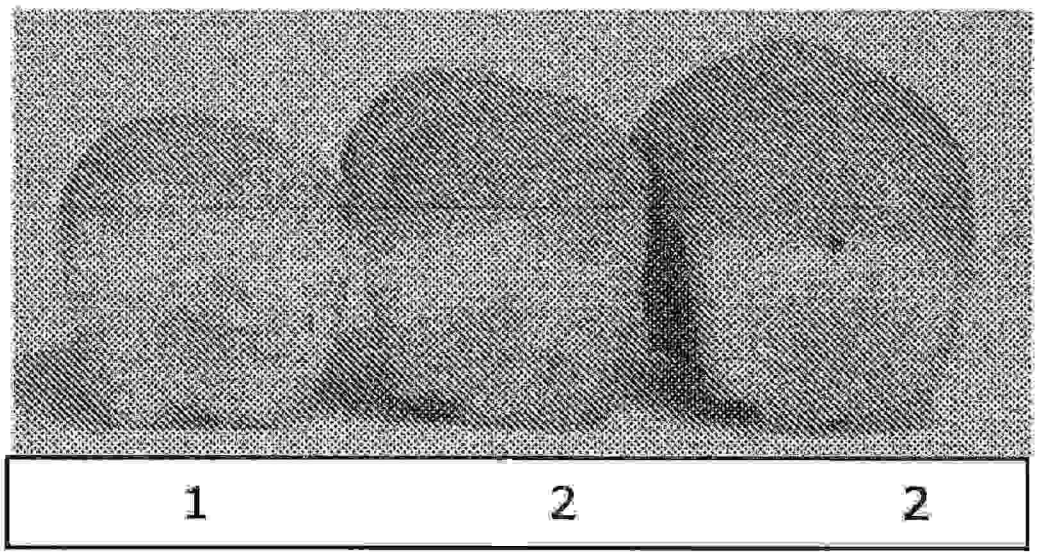
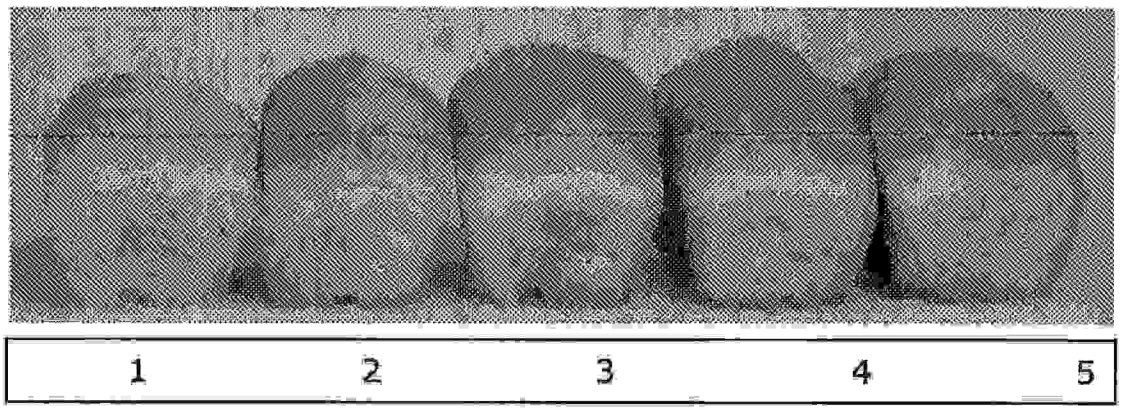


FIG. 9



RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA TRATAMENTO DE UM MATERIAL DE PLANTA QUE CONTÉM LIPÍDEO, COMPOSIÇÃO E SEU USO E PRODUTO ALIMENTÍCIO".**

A presente invenção refere-se à modificação de lipídeos em material de planta que contém lipídeo, tal como farelo de cereal para a geração de lipídeos funcionais. A presente invenção refere-se ainda a preparação de composições que compreendem tais lipídeos funcionais assim como o uso dessas composições que compreendem os lipídeos funcionais e outros compostos funcionais derivados da ação de enzimas que modificam lipídeos para a preparação de uma composição adequada para a preparação de bio-etanol, assim como produtos alimentícios, tal como o pão.