



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 769908 E

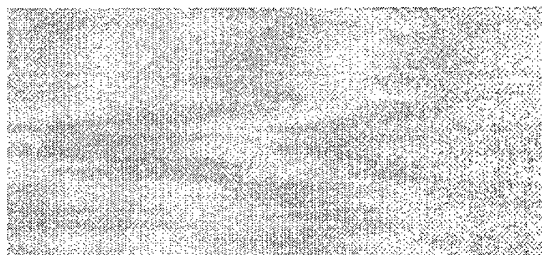
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
A01N063/00 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1995.07.05	(73) Titular(es): LP RESEARCH CENTRE LTD. NIEMENKATU 18 15140 LAHTI FI
(30) Prioridade: 1994.07.14 FI 943366	
(43) Data de publicação do pedido: 1997.05.02	(72) Inventor(es): HARALD RELANDER FI
(45) Data e BPI da concessão: 2000.05.03	(74) Mandatário(s): AMÉRICO DA SILVA CARVALHO RUA CASTILHO 201 3º AND. ESQ. 1070 LISBOA PT

(54) Epígrafe: MÉTODO PARA MELHORAMENTO DA QUALIDADE DE SEMENTES VEGETAIS

(57) Resumo:



Campo das Cebolas - 1100 LISBOA
 Teles.: 01 888 51 51 / 2 / 3
 Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
 E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



INSTITUTO NACIONAL
 DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 769908 (11)		N.º Objectos <input type="checkbox"/>		N.º Desenhos <input type="checkbox"/>	
DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)					
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) LP RESEARCH CENTRE LTD., finlandesa, industrial e comercial, com sede em Niemenkatu 18, 15140 Lahti, Finlândia CÓDIGO POSTAL					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) HARALD RELANDER					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo)		
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
14-07-94	FINLÂNDIA	943366			
EPÍGRAFE (54) "MÉTODO PARA MELHORAMENTO DA QUALIDADE DE SEMENTES VEGETAIS "					
RESUMO (max. 150 palavras) (57)					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

COLAR FIGURA



DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA MELHORAMENTO DA QUALIDADE DE SEMENTES VEGETAIS"

Área de Invenção

A presente invenção relaciona-se com um método de tratamento de sementes vegetais destinadas a serem usadas na indústria de preparação de bebidas fermentadas, alimentar ou de alimentação de animais. Mais precisamente, a invenção relaciona-se com um método no qual uma planta, mais preferivelmente um cereal, em particular um cereal, tal como a cevada ou centeio, para ser usado em maltagem, é tratado com uma preparação bacteriana no tocante a micróbios de modo a melhorar as propriedades de maltagem ou fermentação, tempo de queda ou qualidade microbiana das sementes (grãos). A invenção também se relaciona com o uso de uma preparação bacteriana para pulverização de uma planta no campo ou sob condições de campo à medida que as suas sementes se desenvolvem de modo a melhorar a qualidade das sementes. Além disso, a invenção relaciona-se com um produto de sementes, e.g. um produto cereal e em particular um produto de cevada ou de centeio, por exemplo malte de cevada ou centeio, que tenha sido tratado com o método acima mencionado.

Arte Antecedente

Convencionalmente um cereal destinado a ser usado no fabrico de uma cerveja é maltado de modo a que o amido nele contido se converta em açúcares fermentáveis. Cereal não matado é também por vezes usado no fabrico de cerveja. O cereal mais comumente usado na maltagem é a cevada. Esta é bem aplicável na maltagem e no fabrico de cerveja, desde que a casca do seu grão não saia para o exterior durante a debulha, mas proteja o grão durante a maltagem. Grãos partidos são susceptíveis de criar fungos. A boa germinabilidade da cevada é importante na maltagem, uma vez que os grãos que não tenham germinado não podem ser maltados e são também susceptíveis a criar mofos. A cevada maltada é também usada como matéria prima para o whisky.

W. J. J. J.

Outros cereais, tais como trigo, centeio e arroz, podem também ser usados na preparação de malte.

O objectivo da maltagem é prover mudanças físicas, químicas e biológicas no grão, produzindo desse modo enzimas que no estágio chamado de amassado durante o fabrico da cerveja decompõe o amido do grão numa forma solúvel no mosto. A maltagem compreende vários estádios. Primeiramente, o cereal a ser usado é purificado e peneirado, e é depois embebido em água para fornecer um teor de humidade adequado (ca. 45 %). Quando os grãos estão humedecidos adequadamente, eles são germinados usualmente durante cerca de seis dias. Após a germinação o malte é seco e portanto o teor de humidade diminui para cerca de 4 %. Após a secagem as radículas são removidas.

Num cereal, tal como a cevada, usado em maltagem, os micróbios originados no campo e possivelmente na armazenagem afectam o desenvolvimento e a actividade da flora microbiana na preparação do malte. Grandes quantidades de micróbios, especialmente elevados teores de mofo, podem ser prejudiciais na maltagem de um cereal. O teor de mofo é um dos critérios da qualidade de um cereal usado na maltagem, e é muitas vezes estabelecido um limite máximo para este teor. Outros factores que influenciam a qualidade de malte são as outras características de qualidade do cereal usado como matéria prima, por exemplo o seu teor em proteína, a distribuição de tamanho dos grãos, a energia de germinação e a sensibilidade à água. O tipo de cereal, e a técnica e as condições de maltagem são também significativas.

A flora microbiana natural da cevada compreende mofos tais como *Fusarium*, *Alternaria*, *Cepaslosporium* e *Helminthosporium* e o género de *Rhizopus* e *Mucor*. A ocorrência dos mofos varia dependendo do período de crescimento e do local de crescimento (solo). Tempo húmido e chuvoso durante a emergência da espiga ou colheita da cevada afecta o crescimento de mofos *Fusarium* em particular. Na maltagem a composição dos mofos varia consideravelmente durante a germinação, especialmente a quantidade de mofos *Fusarium* aumenta particularmente durante a molhagem.

Rhizopus e *Mucor* por sua vez estão prevalentes em maltes, uma vez que se multiplicam rapidamente às temperaturas que ocorrem no início da secagem.

A flora bacteriana e levedura original do cereal também afectam a qualidade do material a ser maltado. A enterobactéria natural, espécie *Pseudomonas*, bactéria do ácido láctico e leveduras do cereal multiplicam-se durante a maltagem.

Os microorganismos no cereal e malte têm ambos os efeitos positivos e negativos. Muitos dos efeitos da flora microbiana são úteis. Os efeitos glucanolítico e proteolítico dos mofos e bactérias são os mais comumente relatados. Um teor de β -glucano reduzido e diferença no extracto descrevendo modificação no malte, uma viscosidade reduzida do mosto, uma filterabilidade melhorada do mosto, e um aumento do teor de azoto são características positivas causadas pela actividade enzimática dos micróbios. As desvantagens da flora microbiana de um cereal e malte são o jorramento da cerveja, e a possibilidade de micotoxinas, e a deterioração da germinação.

O jorramento da cerveja é causado por componentes originados nos mofos, especialmente no género *Fusarium* contido no material usado para maltagem. Num cereal que esteja fortemente contaminado por mofo, um micélio de mofo activo forma peptídeos ou compostos contendo peptídeos que sobrevivem ao processo de fabrico da cerveja e produzem o jorramento. Para se obviar a este problema extremamente sério relativo à qualidade, as amostras de cereal usadas na maltagem devem ser analisadas para a contaminação por mofos, e os lotes fortemente contaminados devem ser desprezados.

O controle e a prevenção do jorramento da cerveja é sempre muito problemático. A adição de microbicidas na água de molhagem diminui o crescimento de mofos, mas o uso de preservativos químicos é preferivelmente evitado. Assim é de primordial importância que a qualidade do material a ser maltado seja tão boa quanto possível. É especialmente desejável decrescer a contaminação de mofos *Fusarium*.



A sensibilidade à água da cevada afecta a germinação. Uma razão possível para a sensibilidade à água por parte da cevada é que a densa população microbiana na superfície dos grãos compete com o tecido da planta para o oxigénio a ser usado durante a molhagem. Quando um germe não consegue obter o oxigénio que necessita, a germinação abranda ou é completamente impedida.

A separação dos açúcares do mosto dos restantes sólidos insolúveis do malte moído e a filterabilidade do mosto são principalmente afectadas pela qualidade do malte. A composição dos grãos usados sucessivamente determina a concentração das proteínas gelificantes no malte. As proteínas gelificantes são parcialmente degradadas na maltagem, mas podem-se agregar no estádio de preparação do mosto. A velocidade de filtração é afectada por complexos formados entre as proteínas e pentosanos, β -glucanos, amido residual e lípidos. Adicionalmente, as elevadas quantidades de bactérias podem conduzir a problemas na filtração. Uma boa filterabilidade é portanto um dos factores de qualidade do malte. O melhoramento da filterabilidade também acelera o processo de fermentação.

Os mofos são contaminantes prejudiciais não apenas num cereal destinado a ser usado na indústria de bebidas fermentadas, mas também num cereal e noutras plantas usadas como matérias primas para as indústrias alimentar e de alimentação de animais. Controlar os mofos é importante na armazenagem de um cereal: variações na temperatura e no teor de humidade podem causar um aumento rápido na população de mofos. Por exemplo na indústria de alimentação de animais, mofos tal como *Fusarium* podem causar estragos na matéria prima da alimentação ou na alimentação final.

Para se prevenir o crescimento da flora microbiana, em particular de mofos *Fusarium*, durante a maltagem, têm sido usadas bactérias de ácido láctico [Haikara, Mallas ja Olut 1 (1994) 5-15; Haikara et al., Eur. Brew Conv. Proc. 24th Congr., Oslo 1993, 163-172, and WO 94/16053]. Bactérias do ácido láctico no seu meio de cultura, meio de cultura sem células, ou células separadas do meio de cultura foram adicionadas a grãos secos de cevada antes da maltagem, a águas de molhagem dos grãos, ou no início da germinação. O melhor resultado foi obtido quando as bactérias do ácido láctico



foram adicionadas no seu meio de cultura dois dias antes da maltagem. Através do tratamento foi possível influenciar as propriedades do malte, tais como a filterabilidade e a viscosidade do mosto obtido a partir do malte, e as quantidades de micróbios no malte. O efeito do tratamento no jorramento da cerveja não foi testado. No entanto, o tratamento dos grãos de cevada somente após a colheita e a secagem não pode prevenir o estrago causado por micróbios prejudiciais já no campo, por exemplo a formação dos factores de jorramento, um decréscimo no tempo de queda, e um aumento na sensibilidade à água.

Sumário da Invenção

A presente invenção fornece um novo método para diminuir ou evitar os problemas acima descritos e as desvantagens. Foi descoberto inesperadamente que as propriedades de maltagem ou fermentação, tempo de queda ou qualidade microbiana de sementes vegetais podem ser melhoradas quando uma planta destinada a ser usada na indústria de bebidas fermentadas, alimentar ou de alimentação animal é tratada no campo ou sob condições de campo durante o desenvolvimento das sementes com uma preparação bacteriana de ácido láctico que afecta positivamente as ditas características de qualidade das sementes. Isto é especialmente surpreendente, uma vez que o tratamento de uma planta já quando as sementes se estão a desenvolver no campo significa interferir com uma interacção muito complexa entre por exemplo membros diferentes de flora microbiana, e entre a flora microbiana e a planta, sobre o que o resultado foi bastante inesperado. Além disso, o efeito de condições externas tais como o tempo e as condições de crescimento, no sucesso do tratamento não podem ser previstas.

A presente invenção relaciona-se portanto com um método de tratamento de plantas destinadas a serem usadas na indústria de bebidas fermentadas, alimentar ou de alimentação animal de modo a melhorar a qualidade das sementes através da variação da sua flora microbiana. O método é caracterizado por a dita planta ser tratada no campo ou sob condições de campo quando as sementes se desenvolvem por sua pulverização com uma preparação bacteriana de ácido láctico.

Figura

A Figura 1 mostra graficamente o efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico de acordo com a invenção na filtração do mosto.

Descrição detalhada da invenção

De acordo com a invenção, é possível influenciar a qualidade das sementes de uma planta, preferivelmente um cereal, por pulverização deste já no campo com uma preparação bacteriana de ácido láctico que muda a flora microbiana e as características de qualidade das sementes. As características de qualidade de uma planta referem-se a todos os parâmetros que medem a qualidade da planta, os parâmetros mais gerais de e.g. um cereal são o teor de proteína, o tempo de queda, a distribuição de tamanho dos grãos, a energia de germinação, a sensibilidade à água, a quantidade total de micróbios, e o teor de mofo, que sucessivamente afectam por exemplo as propriedades de fermentação da farinha feita do cereal, ou os resultados de uma análise de malte, mosto e cerveja preparados a partir do cereal.

A presente invenção é preferivelmente aplicável no melhoramento da qualidade de um cereal, tal como a cevada, centeio, trigo ou arroz, adequado para indústrias de moagem e fermentação e para maltagem. O cereal a ser processado é preferivelmente cevada ou centeio, mas preferivelmente cevada destinada para maltagem.

O método de acordo com a invenção é particularmente aplicável no tratamento de um cereal a ser usado para maltagem, sobre o qual a quantidade de mofo diminui, especialmente provocada pela espécie *Fusarium*, e as outras características de qualidade do material a ser maltado e do malte final são melhoradas. As variações vantajosas nas sementes do cereal são verificadas por exemplo num tempo de queda melhorado medindo as propriedades de fermentação, e numa sensibilidade à água reduzida no que diz respeito à maltagem. No malte final os efeitos vantajosos são evidentes num rendimento de extracto aumentado, numa modificação do malte melhorada, e numa filterabilidade mais rápida ou activação da separação dos açúcares do mosto. O método também diminui a tendência de jorramento da cerveja fabricada a partir de malte.



Uma planta em crescimento é pulverizada com uma preparação bacteriana de ácido láctico capaz de melhorar a qualidade das sementes através da variação da quantidade total e/ou proporções internas da flora microbiana nas sementes da planta a ser tratada. Um tal preparação pode por exemplo prevenir ou aumentar o crescimento de alguns micróbios contidos na planta, sobre o que a variação das proporções internas e/ou quantidades de uma população microbiana conduz a efeitos positivos nas propriedades das sementes de outra população microbiana.

O método de acordo com a invenção pode utilizar qualquer preparação microbiana de ácido láctico que tenha as propriedades atrás mencionadas e que não reduza as propriedades úteis dos micróbios.

Bactérias de ácido láctico têm sido grandemente usadas como culturas iniciadoras na indústria de laticínios, de carne e de vegetais e na prevenção de forragem. As bactérias do ácido láctico produzem ácidos orgânicos que diminuem o pH da fermentação, e algumas espécies de bactérias do ácido láctico também segregam bacteriocinas ou agentes de baixo peso molecular, inibindo o crescimento de microorganismos.

As bactérias do ácido láctico são vantajosas também devido à sua segurança. O uso de bactérias do ácido láctico na indústria alimentar é vasto e aceite. Além disso, a flora normal de um cereal compreende bactérias de ácido láctico.

A presente invenção pode utilizar qualquer bactéria do ácido láctico geralmente disponível que tenha características de melhoramento da qualidade das sementes. Por exemplo as bactérias do ácido láctico que ocorrem naturalmente num cereal são adequadas para este propósito. Bactérias do ácido láctico úteis incluem o género *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Bactérias do ácido láctico pertencendo aos géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, e suas misturas são preferíveis. Bactérias do ácido láctico que são especialmente preferíveis no método de acordo com a invenção incluem *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*.



A invenção também se relaciona com o uso de uma preparação bacteriana de ácido láctico para pulverizar um cereal no campo ou solo sob condições de campo quando as suas sementes estão em desenvolvimento de modo a melhorar a qualidade das sementes. O tratamento é adequadamente transportado durante a emergência da espiga por exemplo quando o cereal está prestes a espigar ou já está espigado. A invenção relaciona-se ademais com um produto de cereal, especialmente um produto de cevada ou de centeio, por exemplo malte de cevada ou de centeio, que tenha sido tratado com o método atrás mencionado.

A preparação bacteriana de ácido láctico a ser pulverizada no campo pode ser uma cultura bacteriana, i.e. um meio de cultura contendo as células, assim mesmo ou concentradas, uma preparação celular compreendendo células separadas e possivelmente liofilizadas suspensas em água, um meio de cultura ou um qualquer outro veículo adequado, tal como um salino fisiológico, ou um caldo de cultura do qual forma removidas células microbianas, assim mesmo ou concentrada. A preparação bacteriana de ácido láctico preferivelmente compreende bactérias de ácido láctico vivas.

A preparação a ser pulverizada nos campos preferivelmente compreende uma estirpe de *Lactobacillus plantarum* ou *Pediococcus pentosaceus* num caldo de cultura assim mesmo ou concentrada. A concentração pode ser realizada de uma maneira convencional, por exemplo através de centrifugação, liofilização, filtração ou evaporação. Uma preparação bacteriana de ácido láctico, que na sua utilização prática é adicionada a um meio de cultura adequado ou a um agente de diluição, é também vantajosa para a implementação fácil do método.

A preparação microbiana de ácido láctico usada no tratamento de um cereal pode ser produzida a partir de uma preparação de reserva de acordo com a prática microbiológica convencional através da subcultura e através do aumento gradual do volume até que seja obtida uma densidade microbiana adequada no caldo de cultura. Uma preparação útil na presente invenção contém desde cerca de 1×10^8 até 1×10^{12} CFU/l, preferivelmente desde cerca de 1×10^{10} até 1×10^{12} CFU/l de bactérias do ácido

lático. Em particular é usada uma preparação contendo desde 1×10^{10} até 1×10^{11} CFU/l de bactérias do ácido lático.

Para o utilizador, a preparação mais adequada para pulverização no campo deve ser uma preparação liofilizada, que seja misturada antes da utilização com um agente de diluição adequado, tal como a água, numa concentração apropriada, tal como desde 1×10^9 até 1×10^{11} CFU/l.

No método de acordo com a invenção, a quantidade de preparação microbiana de ácido lático a ser usada na pulverização é calculada na base de um teor bacteriano efectivo desejado que melhora a qualidade das sementes. Para um propósito prático, é adequado usar uma quantidade correspondente de 50 a 100 l/ha, preferivelmente de 100 a 500 l/ha. Uma pessoa perita na arte pode facilmente estimar a quantidade necessária.

De acordo com a presente invenção, uma planta é tratada quando cresce no campo ou sob condições de campo à medida que as sementes se desenvolvem. A expressão "condições de campo" refere-se aqui geralmente a um espaço de crescimento ou cultivo da planta a ser tratada. Por exemplo quando um cereal está a ser tratado, a pulverização pode ser realizada imediatamente após o início da emergência da espiga ou algum tempo depois disso, por exemplo de 5 a 15 dias depois. Por exemplo as condições de tempo afectam a escolha do tempo adequado para a pulverização. Nos exemplos abaixo, a presente invenção será descrita através das suas concretizações preferidas sem ser restrita para esses fins, no entanto.

Exemplo 1

Preparação de culturas bacterianas de ácido lático

Culturas bacterianas de ácido lático usadas no tratamento de um cereal foram preparadas da seguinte maneira. A estirpe VTT-E-78076 de *Lactobacillus plantarum*, isolado a partir da cerveja e a estirpe VTT-E-90390 de *Pedicoccus pentosaceus*, derivado de grãos partidos de cevada, (da colheita de cultura da Secção de Biotecnologia Técnica da Finlândia (VTT)) foram inoculados assepticamente a partir de agar MRS (Oxoid) em 10 ml de caldo MRS (Oxoid) onde foram cultivadas sob

condições anaeróbias a 30 °C durante dois dias sem agitação. As estirpes foram então inoculadas assepticamente em 120 ml de caldo MRS num Erlenmeyer de 250 ml e cultivadas sob condições anaeróbias a 30 °C durante três dias sem agitação. As estirpes foram então inoculadas em 0,6 l de caldo MRS num Erlenmeyer. O cultivo foi continuado sob condições anaeróbias a 30 °C durante três dias sem agitação.

O caldo de cultura resultante continha de 1×10^{10} até 1×10^{11} CFU/l de bactérias do ácido láctico (unidades de colônia formada/litro de caldo de cultura).

O caldo de cultura foi diluído para uma razão de cerca de 1:10 com água. Estes caldos de cultura diluídos foram usados como uma preparação teste na pulverização de campo.

Exemplo 2

Tratamento da cevada em crescimento com bactérias de ácido láctico.

Cevada finlandesa de uma variedade chamada "Kustaa" foi cultivada em quadrados teste de 10 m² (campos 701 a 704). Para cada preparação teste criaram-se três quadrados teste. Um caldo de cultura preparado de acordo com o Exemplo 1, contendo *Lactobacillus plantarum* VTT-E-78076 e *Pedicoccus pentosaceus* VTT-E-90390, foi pulverizado sobre cevada em crescimento imediatamente após a emergência da espiga, e um caldo de cultura contendo *Pedicoccus pentosacens* VTT-E-90390 foi também pulverizado dez dias após a emergência da espiga. Cada preparação teste usada para pulverização continha de 1×10^9 a 1×10^{10} CFU/l de bactérias de ácido láctico, e a preparação foi usada numa quantidade de 200 l/ha. As pulverizações foram realizadas com um pulverizador Azo propano compreendendo um braço de extensão de 2 m com esguichos a intervalos de 50 cm. O campo de controle não foi nada tratado. A cevada foi debulhada quando estava madura, e foi depois seca. Os grãos foram armazenados num lugar fresco e seco até à maltagem. As condições do teste são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1

Condições do teste do tratamento bacteriano de ácido láctico de cevada em crescimento

Campo N°	Descrição
701	Controle (não tratado)
702	Tratamento com a preparação <i>L. plantarum</i> VTT-E-78076 logo após a emergência da espiga (200 l/ha)
703	Tratamento com a preparação <i>P. pentosaceus</i> VTT-E-90390 logo após a emergência da espiga (200 l/ha)
704	Tratamento com a preparação <i>P. pentosaceus</i> VTT-E-90390 dez dias após a emergência da espiga (200 l/ha)

Exemplo 3

Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico na germinabilidade da cevada

O efeito do tratamento com bactérias do ácido láctico da cevada em crescimento na germinabilidade da cevada foi estimado pela determinação da germinabilidade de grãos de cevada secos, i.e. a capacidade de germinação (H_2O_2) foi determinada em percentagens, tal como a energia de germinação e a sensibilidade à água após 3 a 5 dias em percentagens, utilizando métodos conhecidos da maltagem, descritos por exemplo no EBC-Analytica, 4th edition, Analysis Committee of EBC (ed.), Brauerei-und Getränke Rundschau, Zurich, 1987.

Resumidamente, na determinação da capacidade de germinação os grãos são germinados numa solução 0,75 % de peróxido de hidrogénio de modo a finalizar o repouso da cevada. A capacidade de germinação representa o número de grãos vivos. A energia de germinação que representa a germinabilidade da cevada é determinada através da germinação de grãos numa caixa de Petri num papel absorvente humedecido. A sensibilidade à água é determinada do mesmo modo que a energia de germinação mas utilizando uma quantidade maior de água.

Os resultados são apresentados na Tabela 2, provida com as mesmas abreviaturas da Tabela 1.

Tabela 2

Efeito da pulverização bacteriana de ácido láctico na germinação de cevada

Porcentagem de grãos que germinaram	Campo/preparação			
	701 Controle	702	703	704
Capacidade de Germinação (H ₂ O ₂)(%)	98	98	99	99
Energia de Germinação 3/5 dias (%)	96/98	90/93	90/94	94/97
Sensibilidade à água 3/5 dias (%)	26/36	28/35	42/51	35/47

A pulverização de um cereal em crescimento no campo, em estádios diferentes da emergência da espiga, com bactérias de ácido láctico de acordo com a invenção não tem efeito essencial na capacidade de germinação dos grãos de cevada. Nos testes 702 e 703, o uso de bactérias de ácido láctico reduz ligeiramente a energia de germinação, mas reduz claramente a sensibilidade à água dos grãos, especialmente nos testes 703 e 704.

Exemplo 4

Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico nas quantidades de micróbios na cevada

Os efeitos do tratamento bacteriano de ácido láctico de cevada em crescimento nas quantidades microbianas dos grãos de cevada foi analisada através do ensaio de mofos *Fusarium* contagem total de bactérias, bactérias de ácido láctico e leveduras.

A proporção de grãos contaminados com mofos *Fusarium* foi ensaiada no agar Czapek Iprodion Dicloral (CZ1D-agar, Difco) específico para mofos *Fusarium*, de acordo com um método descrito por Abildgñen et al. [Lett. Appl. Microbiol. 5 (1987) 83-86]. Os mofos *Fusarium* foram identificados com base nas colônias típicas e na morfologia dos esporos.

O teor de bactérias foi ensaiado num agar Plate Count (Difco), e as bactérias de ácido láctico foram ensaiadas em agar MRS (Oxoid) com métodos convencionais em

microbiologia. As leveduras foram ensaiadas em agar Saborand (Oxoid). Os resultados são apresentados na Tabela 3, provida com as mesmas abreviaturas da Tabela 1.

Tabela 3
Efeito da Pulverização bacteriana do ácido láctico nas quantidades de micróbios na cevada

Ensaio Microbiano	Campo/preparação			
	701 Controle	702	703	704
Mofos <u>Fusarium</u> (% de grãos contaminados)	57	43	66	46
Contagem total bacteriana CFU/g ds*	$4,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$
Bactérias do ácido láctico CFU/g ds*	$3,3 \times 10^1$	$2,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$
Leveduras CFU/g ds*	$2,2 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$

* unidades de colónia formada/ grama de substância seca

O tratamento de um cereal em crescimento com bactérias de ácido láctico de acordo com a presente invenção reduz ligeiramente a quantidade de grãos contaminados com mofo *Fusarium* e a quantidade total de bactérias, excepto no teste 703. O uso de bactérias de ácido láctico aumenta ligeiramente a quantidade de leveduras e bactérias de ácido láctico comparado com o controle.

Exemplo 5

Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico na qualidade e no rendimento da cevada

O efeito do tratamento de acordo com a presente invenção no rendimento e qualidade dos grãos de cevada foi ensaiado de acordo com as direcções definidas numa decisão pelo Ministério da Agricultura da Finlândia à cerca da determinação da qualidade do cereal, publicada em Helsinquia, 1 de Julho, 1991. O rendimento (Kg/ha), o peso de um milhar de grãos (g), e o peso de um hectolitro (Kg) foram determinados por pesagem. O tempo de queda e o teor de proteína são factores conhecidos de

descrição da qualidade de um cereal, e foram determinados com os métodos geralmente utilizados na arte. Os resultados são apresentados na Tabela 4, provida com as mesmas abreviaturas da Tabela 1.

Tabela 4
Efeito da pulverização bacteriana de ácido láctico no rendimento e na qualidade da cevada

Ensaio	Campo/preparação			
	701	702	703	704
	Controle			
Rendimento (Kg/ha)	5670	5810	5540	5640
Peso de um milhar de grãos (g)	44,8	45,0	44,6	44,5
Peso de um hectolitro (Kg)	72,3	72,2	72,4	72,9
Tempo de queda	99	108	114	120
Proteína	11,4	11,2	11,6	11,5

O tratamento de um cereal em crescimento com bactérias de ácido láctico de acordo com a invenção teve um efeito claramente positivo no tempo de queda para todas as preparações. O tempo de queda aumentou o máximo (20 %) como resultado de um tratamento com *Pediococcus pentosaceus*. O tratamento não teve efeito essencial nos outros parâmetros de descrição do rendimento e qualidade da cevada quando comparados com o controle.

Exemplo 6

Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico nas quantidades de micróbios no malte de cevada.

Cevada tratada de acordo com a invenção foi usada para produzir malte, de modo a que o efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico no malte da cevada pudesse ser analisado. Os grãos originados em cada cultura de cevada e na cultura controle foram maltados em porções de um quilograma num dispositivo de teste de maltagem (Seeger) com um método padrão.

O malte preparado a partir da cevada foi ensaiado para bactérias totais, bactérias de ácido láctico e leveduras do modo descrito no Exemplo 4. Os resultados são apresentados na Tabela 5, provida com as mesmas abreviaturas do Exemplo 1.

Tabela 5
Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico nas quantidades de micróbios no malte

Ensaio Microbiano	Campo/preparação			
	701	702	703	704
	Controle			
Contagem bacteriana Total ^a CFU/g ds ^b	1,0 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	9,2 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷
Bactérias do ácido láctico ^c CFU/g ds ^b	4,8 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶
Leveduras ^d CFU/g ds ^b	1,3 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁴	7,3 x 10 ⁴

^a ensaio em agar de contagem Plate (Difco)

^b unidades de colônia formada/ grama de substância seca

^c ensaio em agar MRS (Oxoid)

^d ensaio em agar Saborau (Oxoid)

O tratamento de um cereal em crescimento com bactérias de ácido láctico de acordo com a invenção não teve efeito essencial nas quantidades de micróbios no malte preparado a partir da cevada.

Exemplo 7

Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico na qualidade e nas propriedades do malte

A qualidade físico-química do malte preparado de acordo com o Exemplo 6 a partir de cevada tratada no campo de acordo com a invenção foi analisada com métodos conhecidos da maltagem, descritos em detalhe na EBC-Analytica, 4th edition, Analysis Committee of EBC(ed.), Brauerei- und Getränke Rundschau, Zurich, 1987. A qualidade dos maltes foi também examinada a partir do mosto preparado através de filtração de Büchner com uma modificação de um método por Brown et al. (Proc. 3rd Aviemore

Conf. Malt. Brew. Distill. Aviemore 1990, (Institute of Brewing, 313-318), a modificação sendo descrita por Sjöholm et al. [Monatsschrift für Brauwissenschaft 5 (1994) 165-171].

Tabela 6

Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico nos valores analíticos do malte

Análise de malte	Campo/preparação			
	701 Controle	702	703	704
Humidade (%)	4,2	4,1	4,1	4,1
Extracto da farinha (%/ds)	80,8	81,1	81,2	81,2
Cor do mosto °EBC	4,1	4,1	4,4	4,4
pH do mosto	6,02	6,01	5,99	5,98
Diferença do grão de farinha/bruto (%/ds)	2,3	1,8	1,5	1,7
Friabilidade da farinha (%)	80	81	83	81
Friabilidade (%) (>2,2 mm)	4,4	3,8	2,2	3,2
Modificação do malte (%) (calcoflúor)	89	94	93	89
Homogeneidade (%) (calcoflúor)	69	77	66	68
Viscosidade do mosto (mPas)	1,48	1,49	1,48	1,48
Tempo de filtração do grão bruto/farinha (min)	60/240	42/150	45/120	45/120
β -glucano do mosto (ml/l)	222	189	184	194
Azoto solúvel (mg/100 g)	812	822	820	826
Proteína (%/ds)	11,5	11,4	11,5	11,1
Grau de solubilidade da proteína (Kolbach) (%)	44	45	45	47
FAN (mg/l)	166	183	176	187
Tempo de amidificação (min)	< 10	< 10	< 10	< 10
α -amilase (DU/g ds)	67	69	74	74
Pó daist. (WK/100 g ds)	370	350	350	350

Tabela 7

**Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico nas propriedades do malte
(filtração de Büchner)**

Propriedade	Campo/preparação			
	701	702	703	704
	Controle			
Teor de extracto do mosto (%)	16,09	16,14	16,14	16,20
Rendimento de extracto actual (%/ds)	21,6	32,5	34,3	34,6
pH do mosto	5,69	5,70	5,68	5,69

Os resultados das Tabelas 6 e 7 mostram que o tratamento que bacteriano de ácido láctico na cevada em crescimento de acordo com a invenção tem os seguintes efeitos vantajosos na qualidade do malte preparado a partir da cevada: o teor de extracto e o rendimento, tal como de FAN e de α -amilase aumentaram, de acordo com várias análises diferentes (% de modificação do malte, diferença do grão da farinha/ bruto, friabilidade e teor β -glucano do mosto), a modificação do malte aumentou e a filterabilidade do mosto tornou-se consideravelmente mais rápida. O mais importante destes é na prática o efeito vantajoso na velocidade de filtração (ver Fig. 1). O método de acordo com a invenção não teve efeito nos outros valores de análise do malte.

Exemplo 8

Efeito do tratamento na tendência para jorramento da cerveja

O efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico de cevada em crescimento de acordo com a invenção na tendência de jorramento da cerveja foi determinado com o método rápido de Carlsberg do modo descrito por Vaag et al. [Eur. Brew. Conv. Proc. 24th Congr., Oslo (1993) 155-1629].

Amostras de a e c foram preparadas do modo seguinte. As amostras de cevada tratadas com bactérias de ácido láctico de acordo com a invenção foram maltadas do modo descrito no Exemplo 6. 100 gramas de cada amostra de malte resultante foram misturadas com 400 ml de água destilada num misturador de laboratório à velocidade

máxima. A suspensão foi centrifugada a 500 rpm, e o líquido sobrenadante foi concentrado por evaporação até cerca de metade do seu volume. O filtrado foi arrefecido, e o volume foi ajustado a 200 ml com água destilada. 50 ml de cerveja foram removidos a partir de três garrafas de cerveja para uma temperatura baixa (4-10 °C) e repostos com 50 ml de extracto de malte. As garrafas foram agitadas cuidadosamente de modo a repor o ar no gargalo da garrafa com espuma, e as garrafas foram então arrolhadas e pasteurizadas durante 20 minutos a 60 °C. Após o arrefecimento as garrafas foram agitadas numa posição horizontal durante três dias antes de serem testadas para induzir o jorramento.

As garrafas foram pesadas e deixadas em repouso durante dez minutos. Depois foram viradas para baixo três vezes, deixadas em repouso durante 30 segundos e finalmente abertas. Se ocorresse jorramento, as garrafas seriam pesadas novamente, e a quantidade de cerveja que tinha escapado das garrafas era calculada. Malte A jorrante, que contém mofo *Fusarium poae* (Carlsberg, Copenhaga, Dinamarca) foi usado como o padrão para o jorramento.

Os resultados são apresentados na Tabela 8, provida com as mesmas abreviaturas do Exemplo 1.

Tabela 8
Efeito do tratamento bacteriano de ácido láctico na tendência de jorramento de cerveja

	Quantidade de jorramento (g)			
	701	702	703	704
Controle				
Amostra a	43,1	14,0	31,0	0,1
Amostra b	55,0	0,1	24,0	23,1
Amostra c	38,9	14,7	11,9	21,6
Média	45,7	9,8	22,3	14,9
Padrão de jorramento	54,2			

15
Américo da Silva Carvalho

A tendência de jorramento de todos os maltes preparados a partir de cevada tratada com bactérias de ácido láctico de acordo com a invenção decresceu substancialmente. O decréscimo máximo ocorreu no malte a partir da cevada pulverizada no campo (702) com um caldo de cultura contendo *Lactobacillus plantarum* VTT-E-78076: a tendência de jorramento diminuiu para quase um quinto quando comparada com o malte preparado a partir de cevada não tratada, e para quase um sexto quando comparada com o padrão de jorramento. Os valores de jorramento obtidos com o malte preparado a partir da cevada pulverizada no campo com um caldo de cultura contendo *Pediococcus pentosaceus* VTT-E-90390 (703) logo após a emergência da espiga, ou dez dias mais tarde, decresceu 51 % e 67 %, respectivamente quando comparado com o controle e 59 % e 73 %, respectivamente, quando comparado com o padrão de jorramento.

Lisboa, 17 MAIO 2000

Américo da Silva Carvalho

Américo da Silva Carvalho
Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 261 - 3.º E - 1870 LISBOA
Telefs. 385 13 39 - 385 46 13

I
W. J. J. J.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para tratamento de vegetais destinados a serem usados na indústria de bebidas fermentadas, alimentar ou de alimentação animal de modo a melhorar as propriedades de maltagem ou de fermentação, tempo de queda ou qualidade microbiana das sementes, caracterizado por a planta ser tratada no campo ou sob condições de campo quando as sementes se desenvolvem através da sua pulverização com uma preparação bacteriana de ácido láctico.
2. Um método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por uma planta a ser tratada ser um cereal.
3. Um método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o tratamento a ser realizado num cereal durante a emergência da espiga.
4. Um método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o cereal a ser tratado ser um cereal adequado para maltagem ou para a indústria de moagem ou de fermentação.
5. Um método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o cereal ser cevada adequada para maltagem.
6. Um método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a preparação bacteriana de ácido láctico ser uma preparação contendo uma bactéria de ácido láctico pertencente ao género *Lactobacillus* ou *Pediococcus*, ou contendo uma mistura destes.
7. Um método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a preparação bacteriana de ácido láctico ser uma preparação contendo *Lactobacillus plantarum* ou *Pediococcus pentosaceus*.

Américo ²

8. O uso da preparação bacteriana de ácido láctico para pulverização de uma planta destinada ao uso na indústria de bebidas fermentadas, alimentar ou de alimentação de animais no campo ou sob condições de campo quando as sementes se desenvolvem de modo a melhorar as propriedades de maltagem ou de fermentação, tempo de queda ou qualidade microbiana das sementes.
9. O uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a preparação bacteriana de ácido láctico ser usada para o tratamento de um cereal, em particular um cereal adequado para maltagem ou para a indústria de moagem ou de fermentação.
10. Um produto semente, caracterizado por a planta da qual as sementes derivam ter sido tratada com o método de acordo com a reivindicação 1.

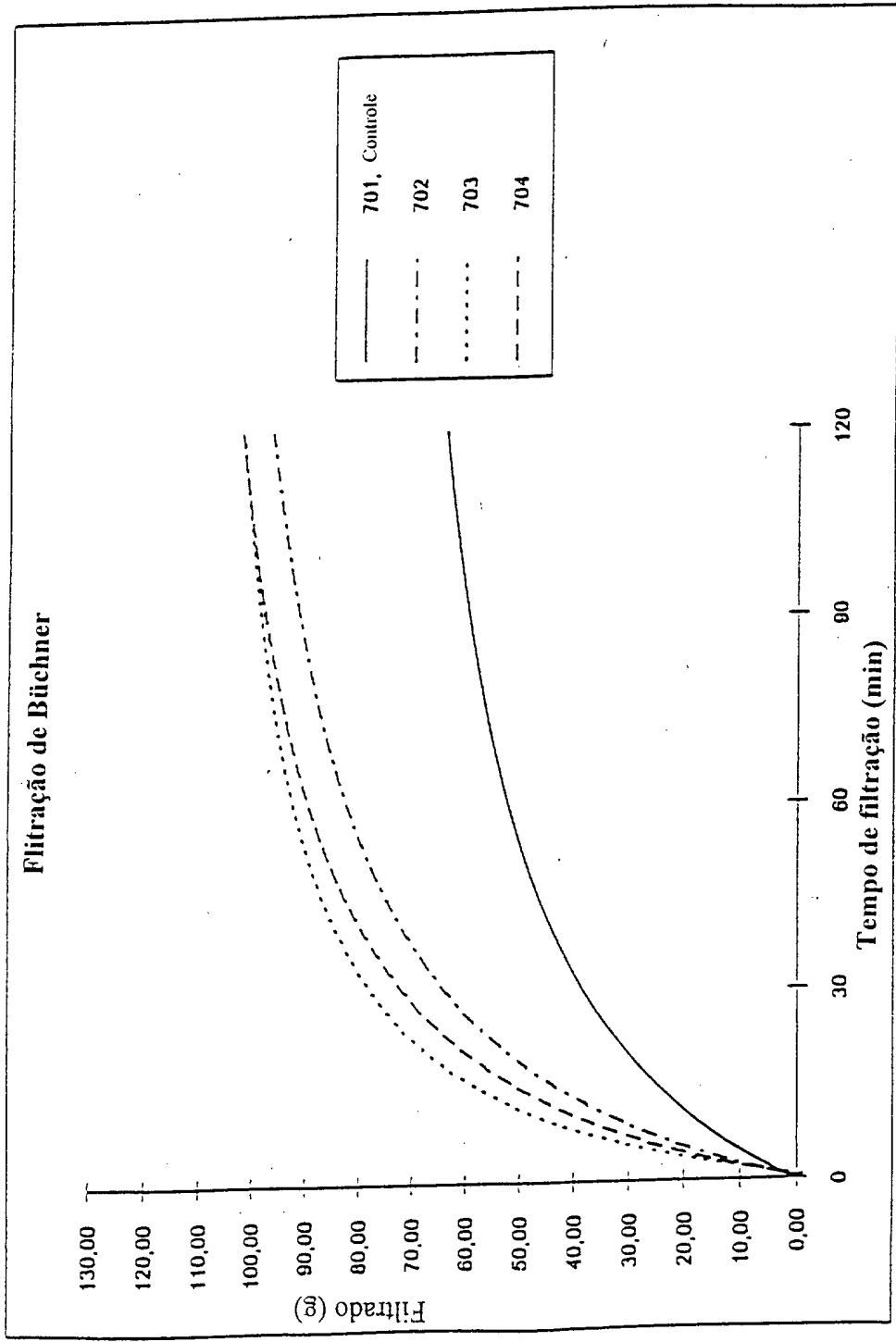
Lisboa, 17 MAIO 2000

Américo da Silva Carvalho

Américo da Silva Carvalho
Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 201 - 3.º E - 1070 LISBOA
Telefs. 385 13 39 - 385 46 13

W. Sjöholm

Figura 1. Efeito de culturas de iniciação na filterabilidade de mosto preparado a partir do malte



Por filtração de Büchner (Brown et al., 1990 Sjöholm et al., 1994)