



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0620656-5 A2**

(22) Data de Depósito: 22/12/2006
(43) Data da Publicação: 22/11/2011
(RPI 2133)



(51) *Int.Cl.:*
A23J 3/34
A23L 1/30
A23L 1/221
A23J 3/30

(54) **Título:** FLAVORIZANTES DE PROCESSO COM BAIXO TEOR DE ACRILAMIDA

(30) **Prioridade Unionista:** 28/12/2005 EP 05113023.5,
28/12/2005 US 60/754.219

(73) **Titular(es):** DSM IP Assets B.V.

(72) **Inventor(es):** Bertus Noordam, Jan Gerrit Kortes

(74) **Procurador(es):** Orlando de Souza

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006012648 de
22/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/073945 de
05/07/2007

(57) **Resumo:** FLAVORIZANTES DE PROCESSO COM BAIXO TEOR DE ACRILAMIDA. Trata-se de um extrato de levedura, uma levedura autolisada e hidrolisado de proteína novos com uma quantidade de asparagina livre que não é maior do que 1 mg/g. Este extrato de levedura, levedura autolisada ou hidrolisado de proteína podem ser usados vantajosamente na produção de um flavorizante de processo com uma quantidade de acrilamida que não é maior do que 800 ppb. Este flavorizante de processo é particularmente adequado para ser usado na condimentação de alimentos ou alimentação.



PI0620656-5

FLAVORIZANTES DE PROCESSO COM BAIXO TEOR DE ACRILAMIDA

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um extrato de levedura, a uma levedura autolisada, a um hidrolisado de proteína, a processos para produzi-los e ao uso dos mesmos em alimentos ou na alimentação ou em ingredientes de alimentos ou de alimentação. A presente invenção também se refere a um flavorizante de processo, a um processo para produzi-lo e ao seu uso em alimentos ou na alimentação ou em ingredientes de alimentos ou de alimentação.

Fundamentos da Invenção

O uso de alimentos processados e de refeições prontas em nossa sociedade está aumentando a cada dia. Com frequência, diversos tipos de flavorizantes, como proteína vegetal hidrolisada, extratos de levedura, queijo, temperos, etc., são adicionados a tal tipo de alimentos durante ou após o processamento para tornar o alimento mais palatável. Sabe-se que o sabor do alimento é o resultado de uma combinação complexa de diferentes caminhos de reação que ocorrem durante o cozimento. Um problema que pode ser encontrado na produção de alimento processado ou de refeições prontas é que a etapa de aquecimento na produção dos mesmos, pode não ser longa o suficiente para desenvolver um sabor satisfatório. No entanto, a lacuna de sabor que pode ser encontrada no alimento processado pode ser preenchida pela adição a tais alimentos de flavorizantes de processo (também chamados "flavorizantes de reação"). Geralmente, os flavorizantes de processo são adicionados ao alimento processado após a finalização das etapas principais de processamento.

O termo "flavorizante de processo" é usado em todo este relatório para uma composição que tenha um sabor distinto, por exemplo, um sabor de carne, que possa ser obtido por meio do aquecimento de uma mistura de ingrediente compreendendo ao menos um composto contendo nitrogênio na forma de um grupo amina e, de preferência, ao menos um carboidrato redutor, sob condições de pH, temperatura, pressão e tempo de reação suficiente para que se desenvolva um sabor. A mistura de ingredientes usados na produção de flavorizantes de processo pode compreender ainda um ou mais lipídios, compostos contendo enxofre, compostos contendo carbonil, etc.

Os flavorizantes de processo são obtidos por meio de uma combinação complexa de caminhos de reação que ocorrem entre os ingredientes durante a etapa de aquecimento. Uma visão geral de diversos caminhos de reação envolvidos na produção de flavorizantes de processo é dada, por exemplo, em "Savory Flavours", 1995, por T. W. Nagodawithana, Esteekay Associates Inc., Wisconsin, EUA, páginas 103-163.

Nos flavorizantes de processo que são produzidos, de acordo com esta invenção, o "ao menos um composto contendo nitrogênio na forma de um grupo amina" pode ser obtido a partir de uma fonte de aminoácidos selecionados a partir de um extrato de levedura, de uma levedura autolisada, de um hidrolisado de proteína ou de uma mistura de um ou mais destes ingredientes, opcionalmente em combinação com um ou mais aminoácidos complementares.

A acrilamida, que tem sido produzida comercialmente há muito tempo para uma série de aplicações

técnicas, é considerada como provavelmente carcinogênica para animais e humanos. Em 1991, a Scientific Committee on Food investigou acrilamida monomérica em materiais de contato com alimentos e, em sua avaliação, foi concluído
5 que a acrilamida é um carcinógeno genotóxico.

Recentemente, a ocorrência de acrilamida em uma série de alimentos e alimentos preparados em forno foi publicada (Tareke et al., Chem. Res. Toxicol. 13, 517-522 (2000)) e isso resultou em preocupação mundial. Pesquisas
10 adicionais revelaram que quantidades consideráveis de acrilamida podem ser detectadas em uma série de alimentos comuns preparados no forno, assados e fritos e foi demonstrado que a ocorrência de acrilamida em alimentos foi o resultado do processo de assadura.

15 A presença de acrilamida em flavorizantes de processo, que são subsequenteiramente usados em diversos tipos de alimentos, é altamente indesejável. Inesperadamente, o requerente descobriu que, infelizmente, os flavorizantes de processo podem compreender uma quantidade considerável de
20 acrilamida (teores que podem ser tão altos quanto, por exemplo, 10000 ppb). A acrilamida nos flavorizantes de processo pode ser produzida mesmo a temperaturas inferiores a 120°C, quando não seria esperada a formação de acrilamida. O problema da presença de acrilamida nos
25 flavorizantes de processo não era conhecido até o momento.

Extratos de levedura, levedura autolisada e hidrolisados de proteína podem ser usados, vantajosamente, como uma fonte de aminoácidos para a produção de flavorizantes de processo.

30 Surpreendentemente, o requerente descobriu que,

quando extratos de levedura regulares, leveduras autolisadas regulares ou hidrolisados de proteína regulares são usados como fonte de aminoácidos na produção de flavorizantes de processo, alto nível de acrilamida pode ser produzido.

Logo, a presente invenção também se refere a extratos de levedura novos, levedura autolisada nova e hidrolisados de proteína novos adequados para a produção de flavorizantes de processo com baixa acrilamida. Além do mais, a presente invenção se refere a flavorizantes de processo novos com baixa acrilamida.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se, em um primeiro aspecto, a um extrato de levedura com uma quantidade de asparagina livre, com base em matéria seca, que não é maior do que 1 mg/g, de preferência, não maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, não maior do que 0,1 mg/g. A quantidade de asparagina livre no extrato de levedura, de acordo com um primeiro aspecto, pode ser tão baixo quanto ~0 mg/g.

Extrato de levedura é definido como uma composição compreendendo componentes solúveis em água extraídos de células de levedura. Em geral, os extratos de levedura compreendem aminoácidos, proteínas, peptídeos, vitaminas, carboidratos e sais tipo fosfatos. Os extratos de levedura podem compreender também 5'-ribonucleotídeos. Os extratos de levedura podem ser divididos, por exemplo, em extratos de levedura autolíticos e hidrolíticos.

Os extratos de levedura autolíticos são concentrados dos materiais solúveis que podem ser obtidos a

partir de levedura após o rompimento das células e digestão (lise) do material de levedura polimérico. As enzimas de levedura ativas liberadas no meio após o rompimento da célula contribuem para a lise. Estes tipos de extrato de levedura são ricos em aminoácidos e geralmente não compreendem 5'-ribonucleotídeos porque durante o processo autolítico, o RNA nativo é decomposto ou modificado em uma forma que não é degradável em 5'-ribonucleotídeos. Eles são usados na indústria de alimentos como provedores básicos de sabor. Os aminoácidos presentes no extrato de levedura acrescentam um sabor de caldo tipo carne.

Os extratos de levedura hidrolíticos são concentrados dos materiais solúveis e podem ser obtidos a partir de levedura após o rompimento das células, digestão (lise) e adição de enzimas exógenas como proteases e/ou peptidases e especialmente nucleases, como 5'-fosfodiesterase e, opcionalmente, deaminase 5'-adenílica, à suspensão de levedura durante a lise. As enzimas de levedura nativa são geralmente desativadas antes da lise. Durante este processo, 5'-ribonucleotídeos de guanina (5'-guanina mono fosfato, 5'-GMP), uracil (5'-uracil mono fosfato, 5'-UMP), citosina (5'-citosina mono fosfato, 5'-CMP) e adenina (5'-adenina mono fosfato, 5'-AMP) podem ser formados. Quando a deaminase adenílica é adicionada à mistura, a 5'-AMP é transformada em 5'-inosina mono fosfato (5'-IMP). Os extratos de levedura hidrolíticos obtidos por este método são, conseqüentemente, ricos em 5'-ribonucleotídeos, especialmente ricos em 5'-GMP e 5'-IMP. Com freqüência, os extratos de levedura também são ricos em glutamato monossódico (MSG). 5'-IMP, 5'-GMP e MSG são

conhecidos por suas propriedades de aprimoramento de sabor. Eles são capazes de melhorar o paladar saboroso e delicioso em certos tipos de alimentos. Este fenômeno é descrito como "impressão sensorial deixada pelo alimento na boca" ou umami (quinto gosto básico).

Em uma modalidade do primeiro aspecto da invenção, o extrato de levedura pode ser um extrato de levedura autolítico ou hidrolítico ou uma mistura dos mesmos. O extrato de levedura pode compreender 5'-ribonucleotídeos. Com o termo "5'-ribonucleotídeos", pretende-se fazer referência a uma mistura de 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-UMP e, adicionalmente, 5'-AMP e/ou 5'-IMP, onde 5'-IMP na mistura é obtido por conversão parcial ou completa de 5'-AMP em 5'-IMP.

Em um segundo aspecto, a invenção se refere a uma levedura autolisada com uma quantidade de asparagina livre, com base na matéria seca, que não é maior do que 1 mg/g, de preferência, não maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, não maior do que 0,1 mg/g. A quantidade de asparagina livre na levedura autolisada pode ser tão baixa quanto ~0 mg/g.

A levedura autolisada é um precursor de um extrato de levedura autolisada. Compreende concentrados dos materiais solúveis, que podem ser obtidos a partir da levedura após o rompimento das células e digestão (lise) do material de levedura polimérico (onde as enzimas de levedura ativas liberadas no meio após o rompimento da célula contribuem para a lise) e os insolúveis formados durante a lise, principalmente devido à fração de parede celular da levedura degradada.

Em um terceiro aspecto, a invenção se refere a um hidrolisado de proteína com uma quantidade de asparagina livre, com base na matéria seca do produto, que não é maior do que 1 mg/g, de preferência, não maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, não maior do que 0,1 mg/g.

Os hidrolisados de proteína são substratos ácidos ou de proteína tratados enzimaticamente contendo misturas de aminoácidos e peptídeos em proporções variadas que são determinadas pelo grau de hidrólise e/ou do tipo de enzimas usado. Substratos de proteína típicos para a preparação de hidrolisados de proteína são proteínas vegetais como glúten de trigo, glúten de milho, proteína de soja, proteína de semente de colza, proteína de ervilha, proteína de alfafa, proteína de girassol, proteína de feijão fabanáceo, proteína de semente de algodão ou de gergelim, proteína de milho, proteína de cevada, proteína de sorgo, proteína de batata, proteína de arroz, proteínas de café. Outros substratos de proteína possíveis são proteínas animais como proteína do leite (por exemplo, caseína, proteína do soro do leite), clara de ovo, proteína do peixe, proteína de carne, incluindo gelatina, colágeno, proteína do sangue (por exemplo, hemoglobina), cabelo, penas e carne de peixe.

O extrato de levedura, a levedura autolisada ou o hidrolisado de proteína podem estar em qualquer forma, por exemplo, dissolvidos em um líquido ou em forma seca. Geralmente, o extrato de levedura, a levedura autolisada ou o hidrolisado de proteína estarão em uma forma seca, por exemplo, em forma pulverizada ou granulada.

Em um quarto aspecto, a invenção se refere a um método para a produção de um extrato de levedura do

| primeiro aspecto, uma levedura autolisada do segundo
aspecto ou um hidrolisado de proteína do terceiro aspecto,
sendo que o método compreende um tratamento de um extrato
de levedura de partida, uma levedura autolisada de partida
5 ou um hidrolisado de proteína de partida, todos contendo
asparagina livre, com uma enzima, com um método físico, com
um método químico ou com uma combinação dos mesmos, capaz
de reduzir a quantidade de asparagina livre no produto
final, e, de preferência, de modo a obter uma quantidade de
10 asparagina livre no produto final que não seja maior do que
1 mg/g, mais preferivelmente, não maior do que 0,2 mg/g,
mais preferivelmente, não maior do que 0,1 mg/g, com base
na matéria seca.

A composição de extrato de levedura de partida,
15 de levedura autolisada de partida ou de hidrolisado de
proteína de partida, todos contendo asparagina livre,
também é referida como "produto de partida" em todo este
relatório. O produto de partida a ser usado no método da
invenção pode ser um produto disponível comercialmente,
20 pode ser um produto final de um processo de preparação ou
pode ser um produto intermediário obtido em uma etapa de um
processo de preparação para um produto final. Logo, em uma
modalidade da invenção, o tratamento com uma enzima, com um
método físico, com um método químico ou com uma combinação
25 dos mesmos, é realizado em um produto intermediário
contendo asparagina livre obtida em uma etapa de processo
de preparação para extrato de levedura ou levedura
autolisada a partir de células de levedura ou para um
hidrolisado de proteína a partir de um substrato de
30 proteína.

O produto de partida a ser usado no método da invenção pode ser qualquer produto de partida contendo asparagina livre, conforme mencionado acima. O produto de partida pode estar em qualquer forma, por exemplo, dissolvido em um líquido ou seco. Geralmente, o produto de partida estará em uma forma seca, por exemplo, em uma forma pulverizada ou granulada.

Em uma modalidade do método de acordo com o quarto aspecto da invenção, o tratamento com uma enzima, com um método físico, com um método químico ou com uma combinação dos mesmos, capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, é realizado sobre um produto de partida, de preferência, após sua suspensão e/ou solubilização em um solvente adequado, onde o produto de partida é um extrato de levedura, uma levedura autolisada ou um hidrolisado de proteína, disponível comercialmente ou como o produto final de um processo de preparação. Geralmente, o solvente pode ser tal que ele é adequado para permitir que a enzima reaja com asparagina livre ou é adequado para ser usado no método físico ou químico. Geralmente, o solvente pode ser um solvente à base de água, mais preferivelmente, o solvente é água.

No contexto da presente invenção, "uma enzima, um método físico, um método químico ou uma combinação dos mesmos capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre" é qualquer enzima ou mistura de enzimas, qualquer método físico ou qualquer método químico ou combinação dos mesmos capaz de remover parte ou toda a asparagina livre e/ou degradar a asparagina livre a uma forma que não pode levar à formação de acrilamida quando aquecida na presença de um

açúcar de redução.

Os métodos físicos que podem ser usados no tratamento para reduzir a quantidade de asparagina livre são métodos que removem parte ou toda a asparagina livre do produto de partida. Tais métodos podem compreender, por exemplo, o uso de técnicas de separação como técnicas cromatográficas. Os métodos químicos são métodos que modificam e/ou degradam a asparagina livre a uma forma que não pode levar à formação de acrilamida. Tais métodos podem compreender, por exemplo, o uso de reações químicas como oxidação, redução, remoção de um grupo amina.

Em uma modalidade preferida do método do quarto aspecto da invenção, o tratamento é realizado com uma enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre no produto final, sob condições de pH, temperatura e tempo de reação suficientes para enzima reagir com a asparagina livre.

De preferência, o tratamento com a enzima é realizado usando-se uma enzima capaz de modificar a cadeia lateral de asparagina livre, mais preferivelmente, com uma enzima capaz de hidrolisar o grupo amida na cadeia lateral da asparagina livre, ainda mais preferivelmente, com a enzima asparaginase (EC 3.5.1.1).

A enzima ou mistura de enzimas usadas na modalidade preferida do método do terceiro aspecto da invenção pode ser adicionada como uma preparação de enzima. A asparaginase pode ser obtida a partir de diversas fontes, como por exemplo, a partir de plantas, animais e microorganismos, como uma bactéria, um fungo ou levedura. Exemplos de microorganismos adequados são *Escherichia*,

Erwinia, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* e *Bacillus*.

Um exemplo de uma cepa *Escherichia* adequada é *Escherichia coli*. Um exemplo de uma cepa *Erwinia* adequada é *Erwinia chrysanthemi*. Exemplos de cepas de *Streptomyces* adequadas
5 são *Streptomyces lividans* ou *Streptomyces murinus*. Exemplos de cepas *Aspergillus* adequadas são *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* ou *Aspergillus niger*. Exemplos de cepas *Bacillus* adequadas são *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus*
10 *circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* ou *Bacillus thuringiensis*. Um exemplo de métodos adequados para obter asparaginase a partir de cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*,
15 *Escherichia* ou *Pseudomonas*, é descrito em WO 03/083043. de preferência, a asparaginase é derivada do *Aspergillus niger* ou *Bacillus subtilis*, mais preferivelmente, do *Aspergillus niger*. Uma asparaginase adequada do *Aspergillus niger* é descrita em WO 2004/030468.

20 A enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre usada na modalidade preferida do método do quarto aspecto da invenção, será usada sob condições de pH, temperatura e tempo de reação suficientes para a enzima reagir com a asparagina livre.

25 Sabe que o pH e a temperatura influenciam a atividade da enzima. Dependendo do tipo de enzima usada, os que são versados na técnica serão capazes de determinar as condições ótimas de pH e temperatura sob as quais a enzima pode reagir. Além do mais, tais condições estão disponíveis
30 via livros e/ou são fornecidas por provedores da enzima. O

tempo de reação suficiente para a enzima reagir com a asparagina livre irá depender, entre outras coisas, da quantidade e do tipo de enzima usada e da quantidade de conversão de asparagina desejada no produto final. Os que
5 são versados na técnica serão capazes de determinar o tempo de reação ótimo.

A quantidade de enzima adicionada ao produto de partida capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre irá depender, entre outras coisas, do tipo de enzima usada
10 e da atividade da enzima. A quantidade apropriada a ser adicionada pode ser determinada por aqueles que são versados na técnica.

Em uma modalidade preferida do método do quarto aspecto da invenção, o tratamento com uma enzima, com um
15 método físico, com um método químico ou com uma combinação dos mesmos, capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, de preferência, com uma enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, é realizado em um produto intermediário contendo a asparagina livre contida em uma
20 etapa de um método para a produção de extrato de levedura ou de uma levedura autolisada oriunda de células de levedura.

Neste caso, o método para a produção de um extrato de levedura ou de uma levedura autolisada a partir
25 de células de levedura pode começar com células de levedura, por exemplo, com uma suspensão aquosa de células de levedura, como um caldo de fermentação de células de levedura. Qualquer tipo de levedura pode ser usado no método da invenção. Em particular, as cepas de levedura que
30 pertencem ao gênero *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ou *Cândida*

podem ser adequadamente usadas. As cepas de levedura que pertencem ao gênero *Saccharomyces*, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* são preferidas.

Os processos de fermentação adequados para
5 produzir suspensões de células de levedura são conhecidos na técnica. Em alguns casos, o caldo de fermentação pode ser concentrado antes do uso no método para a produção de um extrato de levedura ou de uma levedura autolisada a partir de células de levedura, por exemplo, por
10 centrifugação ou por filtração. Por exemplo, levedura em creme (levedura de Baker, que tenha sido concentrada a 15-27% p/p/teor de matéria seca) pode ser usada.

Em uma modalidade preferida do método do quarto aspecto da invenção, o tratamento com uma enzima, com um
15 método físico, com um método químico ou com uma combinação dos mesmos, capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, é realizado em um produto intermediário contendo asparagina livre obtida em uma etapa de um método para a produção de um extrato de levedura ou de uma levedura
20 autolisada a partir de células de levedura, de preferência durante o tratamento, mais preferivelmente após o tratamento, das células de levedura de modo a liberar e, opcionalmente, ao menos parcialmente degradar o conteúdo da célula. Assim, as paredes das células são (parcialmente)
25 danificadas e/ou rompidas resultando na liberação do conteúdo da célula e, opcionalmente, o conteúdo da célula, como proteínas e/ou RNA e/ou polissacarídeos, são ao menos parcialmente degradados.

De modo a liberar o conteúdo da célula e,
30 opcionalmente, degradar ao menos parcialmente o conteúdo da

célula, as células podem ser tratadas quimicamente, mecanicamente, enzimaticamente ou por meio de uma combinação de dois ou mais destes métodos usando métodos conhecidos daqueles que são versados na técnica. Os tratamentos mecânicos incluem técnicas de homogeneização. Nesta finalidade, é possível usar homogeneizadores de alta pressão. Outras técnicas de homogeneização podem envolver mistura com partículas, por exemplo, areia e/ou contas de vidro ou usar aparelhos de moagem (por exemplo, um triturador de contas). Os tratamentos químicos incluem o uso de sais, álcali e/ou um ou mais tenso-ativos ou detergentes. Os tratamentos químicos podem ser, em alguns casos, menos preferidos porque eles podem levar à degradação parcial do RNA, especialmente quando se usa álcali, com a conseqüente formação de 2'-ribonucleotídeos e 3'-ribonucleotídeos.

De preferência, as células são tratadas enzimaticamente, opcionalmente após tratamento químico e/ou mecânico. O tratamento enzimático pode ser realizado submetendo-se as células de levedura à ação de enzimas de levedura nativa e/ou enzimas exógenas adicionadas. O tratamento enzimático pode ser realizado a um pH entre 4 e 10 e/ou a uma temperatura entre 40°C e 70°C, dependendo do tipo de enzima(s) usada(s). Geralmente, o tratamento enzimático pode ser realizado por um período de tempo entre 1 e 24 horas. O tratamento enzimático pode não apenas liberar o conteúdo da célula ao (parcialmente) danificar e/ou romper as paredes da célula, mas, dependendo das enzimas envolvidas, também pode contribuir para a degradação do conteúdo da célula, como proteínas, RNA e

polissacarídeos.

Uma ou mais enzimas exógenas podem ser adicionadas às células de levedura para realizar o tratamento enzimático. De preferência, uma protease, mais preferivelmente, uma endoprotease, pode ser usada como uma enzima exógena. Opcionalmente, a uma ou mais enzimas exógenas são adicionadas após as enzimas de levedura nativa terem sido desativadas. Aqueles que são versados na técnica sabem como tornas inativas as enzimas de levedura nativas. A desativação pode ser efetuada, por exemplo, por um tratamento de pH ou um choque térmico, sendo o último método preferido. Um choque térmico pode ser realizado, adequadamente, por meio do tratamento das células de levedura a uma temperatura de 80 a 97°C por 5 a 10 minutos. Quando um extrato de levedura autolítica ou uma levedura autolisada tiver que ser produzida com o método da invenção, as enzimas de levedura nativas geralmente não são desativadas.

Opcionalmente, uma ou mais enzimas usadas para transformar RNA em 5'-ribonucleotídeos, como 5'-fosfodiesterase (5'-Fdase) e, opcionalmente, deaminase, também podem ser adicionadas junto com ou subsequente ao tratamento com as enzimas mencionadas acima. 5'-Fdase é usada preferencialmente para converter RNA em 5'-ribonucleotídeos. 5'-Fdase pode ser obtida a partir de uma fonte microbiana ou vegetal (por exemplo, um extrato de raiz de malte). Um exemplo de 5'-Fdase microbiana disponível comercialmente é Enzyme RP-1, produzida por Amano (Japão). Opcionalmente, 5'-AMP é convertida em 5'-IMP pela deaminase, por exemplo, deaminase adenílica. Como

exemplo de uma deaminase disponível comercialmente está a Deaminase 500, produzida pela Amano (Japão).

Conforme mencionado acima, em uma modalidade preferida do método do quarto aspecto da invenção, o tratamento é realizado em um produto intermediário contendo asparagina livre obtida em uma etapa de um método para a produção de um extrato de levedura ou de uma levedura autolisada a partir de células de levedura. De preferência, o tratamento é realizado durante o tratamento, mais preferivelmente, após o tratamento, das células de levedura para liberar e, opcionalmente, degradar ao menos parcialmente o conteúdo da célula. No entanto, se um tratamento for realizado para transformar RNA em 5'-ribonucleotídeos, o tratamento com a enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre pode ser realizado antes ou após a transformação de RNA. O tratamento com a enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, pode ser realizado antes ou após a desativação da(s) enzima(s) e/ou químico(s) usado(s) para liberar e, opcionalmente, degradar ao menos parcialmente o conteúdo da célula a partir das células de levedura. A desativação das enzimas pode ser realizada, de acordo com os métodos mencionados acima. O tratamento com a enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre pode requerer o ajuste do pH da mistura em que a reação acontecerá, dependendo do pH no qual as etapas anteriores foram conduzidas e do pH ótimo da enzima usada. Após o tratamento, a enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, de preferência, é desativada com o uso de um dos métodos mencionados acima.

Quando um extrato de levedura tiver que ser produzido com o método do quarto aspecto, a fração insolúvel obtida após danificar (parcialmente) e/ou romper as paredes da célula de levedura e opcionalmente degradar a célula de levedura, o conteúdo pode ser removido após todos os tratamentos enzimáticos terem sido completados, isto é, ou após a degradação do RNA em 5'-ribonucleotídeos ou o tratamento com a enzima capaz de hidrolisar o grupo amida na cadeia lateral de asparagina livre, dependente de qual etapa será realizada por ultimo. A fração insolúvel pode ser separada do sobrenadante por meio de qualquer método de separação sólido-líquido comunicação, como centrifugação ou filtração. Quando uma levedura autolisada tiver que ser produzida com o método do terceiro aspecto, a remoção da fração insolúvel pode ser dispensada.

A fração líquida obtida após a remoção da fração sólida pode ser concentrada ou seca. A fração líquida pode ser concentrada de modo a fornecer um extrato de levedura em forma líquida (geralmente com um teor de matéria seca de aproximadamente 40-65% p/p) ou adicionalmente concentrada de modo a fornecer um extrato de levedura em uma forma de pasta (geralmente com um teor de matéria seca de aproximadamente 70-80% p/p). O extrato de levedura pode ser seco até, por exemplo, um pó seco com um teor de matéria seca de aproximadamente 95% p/p ou mais. No caso da produção de levedura autolisada, a suspensão compreendendo a fração líquida e a fração insolúvel pode ser concentrada ou seca de acordo com métodos similares aos descritos para extratos de levedura.

Em uma outra modalidade da invenção, o produto de

partida a ser usado no método do quarto aspecto da invenção pode ser um produto intermediário contendo asparagina livre obtida em uma etapa de um método para a produção de um hidrolisado de proteína a partir de um substrato de proteína, de preferência durante o tratamento, mais preferivelmente após o tratamento do substrato de proteína de modo a hidrolisá-la até uma mistura de peptídeos e de aminoácidos.

Nesta modalidade, o método para a produção de hidrolisado de proteína a partir de um substrato de proteína pode começar com um substrato de proteína, por exemplo, com uma suspensão da mesma em um solvente apropriado, de preferência em água. Qualquer dos substratos de proteína mencionados acima ou uma combinação dos mesmos, pode ser usado. De preferência, o substrato de proteína é tratado de modo a hidrolisá-la até uma mistura de peptídeos e de aminoácidos. O tratamento pode ser realizado química ou enzimaticamente. O tratamento químico pode ser realizado geralmente usando-se ácido clorídrico de acordo com métodos conhecidos na técnica, por exemplo, conforme descrito em "Savory Flavours", 1995, por T. W. Nagodawithana, Esteekay Associates Inc., Wisconsin, EUA, páginas 233-237. De preferência, o tratamento é realizado enzimaticamente. De preferência, uma mistura de endo-proteases e exotérmica-proteases é usada para realizar o tratamento enzimático. Endoproteases adequadas podem originar de material animal, vegetal ou microbiano. Elas incluem enzimas recombinantes, por exemplo, enzimas obtidas por técnicas de engenharia genética. Exemplos de endoproteases adequadas podem ser, entre outros, tripsina (EC 3.4.21.4), quimiotripsina (EC

3.4.21.1), subtilisina (EC 3.4.21.14) e papaína (EC 3.4.22.2). Exoproteases adequadas podem incluir carboxipeptidase (EC 3.4.16 e EC 3.4.17) e/ou aminopeptidases (EC 3.4.11). As exoproteases podem ter
5 origem em material animal, vegetal ou microbiano. Elas podem ser enzimas recombinantes. Um exemplo de carboxipeptidases adequadas pode ser, por exemplo, carboxipeptidase B (EC 3.4.17.2). Um exemplo de aminopeptidase adequada pode ser, por exemplo, Peptidase
10 R®, de Amano - Japão ou Corolase LAP®, da ABEnzymes (Reino Unido). Além do mais, preparações de enzima complexas compreendendo tanto endoproteases, carboxipeptidases e aminopeptidases, podem ser usadas. Exemplos de tais preparações são Flavourzyme® (NOVO, Dinamarca) ou Sumizyme
15 FP® (Shin Nihon, Japão).

Dependendo dos tipos de enzimas usadas, um pH e temperatura adequados podem ser usados. O pH adequado pode variar de cerca de 3 a 9. Uma temperatura adequada pode variar de cerca de 5 a 75°C. O substrato de proteína e uma
20 mistura de exoprotease e endoprotease podem ser incubados juntos ou a exoprotease pode ser incubada após a incubação do substrato de proteína com endoprotease, opcionalmente após a desativação da endoprotease.

O tratamento com a enzima capaz de reduzir a
25 quantidade de asparagina livre pode ocorrer durante o tratamento enzimático com endoprotease e/ou exoprotease. Dependendo do pH ótimo das enzimas, o tratamento com a enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre pode ser realizado durante o tratamento com a endoprotease
30 ou durante o tratamento com exoprotease. Opcionalmente, o

tratamento com a enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre pode ocorrer após o tratamento com endoprotease ou exoprotease.

Uma vez que o hidrolisado de proteína desejado
5 tenha sido obtido, a enzima ou enzimas usadas no método podem ser desativadas. A desativação pode ocorrer sob condições similares àsquelas usadas para a desativação de enzimas no método do terceiro aspecto. Uma pessoa que seja versada na técnica será capaz de selecionar as melhores
10 condições para desativar as enzimas.

O hidrolisado de proteína obtenível pelo método do quarto aspecto pode ser trabalhado de acordo com métodos conhecidos por aqueles que são versados na técnica. Por exemplo, a suspensão aquosa compreendendo o hidrolisado de
15 proteína pode ser, por exemplo, centrifugada e/ou ultrafiltrada, então ser concentrada por exemplo, por evaporação e, opcionalmente, seca de qualquer maneira conveniente como secagem por jato, secagem por congelamento, tratamento de leite fluidizado ou uma combinação destes métodos.

20 Em um quinto aspecto, a invenção proporciona o uso de um extrato de levedura de acordo com o primeiro aspecto da invenção ou de um extrato de levedura obtenível por um método de acordo com o quarto aspecto da invenção em alimentos, alimentação ou em ingredientes de alimentos ou
25 de alimentação ou na preparação dos mesmos.

Em um sexto aspecto, a invenção proporciona o uso de uma levedura autolisada de acordo com o segundo aspecto da invenção ou de uma levedura autolisada obtenível por um método de acordo com o quarto aspecto da invenção em
30 alimentos, alimentação ou em ingredientes de alimentos ou

alimentação ou na preparação dos mesmos.

Em um sétimo aspecto, a invenção refere-se ao uso de um hidrolisado de proteína de acordo com o terceiro aspeto ou de um hidrolisado de proteína obtenível por um método do quarto aspecto em alimento, alimentação ou em ingredientes de alimento ou alimentação ou na preparação dos mesmos. De preferência, o hidrolisado de proteína é usado na preparação de flavorizantes de processo.

Em uma modalidade preferida do uso do quinto, sexto ou sétimo aspectos da invenção, o extrato de levedura, a levedura autolisada ou o hidrolisado de proteína é usado na produção de um flavorizante de processo.

Surpreendentemente, quando um extrato de levedura, levedura autolisada ou hidrolisado de proteína, de acordo com a invenção, é usado na produção de um flavorizante de processo, um flavorizante de processo é obtido com uma baixa quantidade de acrilamida, consideravelmente menor do que a quantidade presente em um flavorizante de processo obtido usando um extrato de levedura regular, levedura autolisada ou hidrolisado de proteína.

Em um oitavo aspecto, a invenção refere-se a um flavorizante de processo com uma quantidade de acrilamida com base em matéria seca do produto, que não é mais alta do que 800 ppb, de preferência, não maior do que 600 ppb, mais preferivelmente, não maior do que 400 ppb, mais preferivelmente não maior do que 200 ppb. O flavorizante de processo é definido aqui conforme é indicado em "Fundamentos da Invenção". O flavorizante de processo é

obtenível a partir de uma fonte de aminoácidos selecionados a partir de um extrato de levedura, uma levedura autolisada, um hidrolisado de proteína ou uma mistura de um ou mais destes ingredientes, opcionalmente em combinação com um ou mais aminoácidos suplementares. Vantajosamente, o flavorizante de processo da invenção compreende uma baixa quantidade da acrilamida componente tóxico. De preferência, a acrilamida é tão baixa quanto 50 ppb, mais preferivelmente, tão baixa quanto 20 ppb, ainda mais preferivelmente, tão baixa quanto 10 ppb e ainda mais preferivelmente, quase ausente no flavorizante de processo da invenção. Esta característica torna o flavorizante de processo da invenção particularmente adequado para uso como flavorizante de produtos alimentícios ou ingredientes de alimentos.

Em um nono aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir um flavorizante de processo do oitavo aspecto da invenção. O método compreende a etapa de submeter uma mistura contendo ao menos uma fonte de aminoácidos selecionados a partir de um extrato de levedura, uma levedura autolisada, um hidrolisado de proteína, todos contendo uma quantidade de asparagina livre que não é maior do que 1 mg/g, de preferência não maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente não maior do que 0,1 mg/g ou uma mistura, e de preferência ao menos um carboidrato redutor, aquecer sob condições de pH, temperatura, pressão e tempo de reação suficientes para se desenvolver um sabor.

Muito surpreendentemente, quando a fonte de aminoácidos mencionada acima é usada no processo deste

aspecto, a quantidade de acrilamida no produto final é consideravelmente reduzida em comparação à quantidade presente nos flavorizantes de processo que utilizam fontes regulares de aminoácidos. Este último é particularmente
5 evidente quando o flavorizante de processo é produzido por meio de um extrusor, conforme é mostrado nos exemplos.

A quantidade de acrilamida no produto final não é maior do que 800 ppb, de preferência não maior do que 600 ppb, mais preferivelmente não maior do que 400 ppb, mais
10 preferivelmente não maior do que 200 ppb, com base na matéria seca.

Em uma modalidade, o método, de acordo com o nono aspecto da invenção, começa com uma mistura inicial compreendendo uma fonte de aminoácidos selecionados a
15 partir de um extrato de levedura, uma levedura autolisada, um hidrolisado de proteína, contendo uma quantidade de asparagina livre que não é maior do que 1 mg/g, de preferência, não maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente não maior do que 0,1 mg/g ou uma mistura
20 das mesmas, opcionalmente em combinação com um ou mais aminoácidos suplementares.

Em uma outra modalidade, o método, de acordo com o nono aspecto da invenção, também pode começar com uma mistura inicial compreendendo uma fonte de aminoácidos
25 selecionados a partir de um extrato de levedura, uma levedura autolisada, um hidrolisado de proteína ou uma mistura dos mesmos, que contém uma quantidade de asparagina livre que é maior do que 1 mg/g,. Nesta modalidade, a mistura pode compreender, por exemplo, extrato de levedura,
30 levedura autolisada ou hidrolisado de proteína disponíveis

comercialmente. Antes de submeter a mistura a condições adequadas para a geração de um flavorizante de processo conforme descrito abaixo, a mistura primeiro é submetida a um tratamento com uma enzima, com um método físico, com um método químico ou com uma combinação dos mesmos, capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, conforme descrito acima, para diminuir a quantidade de asparagina até um nível que seja inferior a 1 mg/g. A etapa de reduzir a quantidade de asparagina livre pode se sobrepor parcialmente à etapa de gerar os flavorizantes de processo.

De preferência, a mistura inicial, conforme descrita nas duas modalidades acima, compreende adicionalmente ao menos um carboidrato de redução. O carboidrato de redução pode ser um monossacarídeo, um dissacarídeo, um polissacarídeo ou uma mistura de um ou mais destes ingredientes. De preferência, o carboidrato de redução é selecionado a partir do grupo de monossacarídeos, de preferência, monossacarídeos C5- ou C6, mais preferivelmente selecionados a partir do grupo de: L- ou D-ribose, D-xilose, dextrose (D-glucose), L-arabinose, L-ramnose, L-frutose. A presente invenção não exclui a possibilidade de combinar mais de um carboidrato de redução. No último caso, os hidrolisados obtidos da degradação química ou enzimática de polissacarídeos também podem ser usados como fonte de carboidratos de redução, como maltodextrina. De preferência, o carboidrato de redução está presente na mistura em uma quantidade entre 0 e 25% p/p, mais preferivelmente entre 1 e 25% p/p, ainda mais preferivelmente entre 2 e 25% p/p, com base na matéria seca da mistura. Quando polissacarídeos, como

maltodextrina, estão presentes na mistura, a quantidade de carboidrato de redução pode variar de 5 a 50% p/p, de preferência, de 10 a 40% p/p, mais preferivelmente, de 15 a 40% p/p, com base na matéria seca da mistura.

5 A quantidade da fonte de aminoácidos, conforme especificada nos fundamentos da invenção, pode ser de 30 a 98% p/p com base na matéria seca da mistura total quando, além da fonte de aminoácidos, outros ingredientes estão presentes na mistura inicial.

10 A mistura de ingredientes usados na produção de flavorizantes de processo pode compreender ainda um ou mais lipídios como óleos ou gorduras, compostos contendo enxofre, compostos contendo carbonila, etc.

 No caso de óleos ou gorduras estarem presentes na
15 mistura, eles podem estar presentes em uma quantidade de 0 a 5% p/p com base na matéria seca da mistura total.

 De preferência, a mistura de reação compreende um solvente, de preferência, água, geralmente o teor de matéria seca na mistura de reação pode ser de 60 a 98% p/p,
20 mais preferivelmente de 75 a 95% p/p com base na mistura total incluindo a água.

 Os ingredientes podem ser misturados de acordo com qualquer método conhecido na técnica, dependendo também da quantidade de água presente na mistura. Os ingredientes
25 podem ser adicionados simultaneamente ou subseqüentemente à mistura. Os misturadores mecânicos também podem ser usados.

 No método deste aspecto, a mistura compreendendo ao menos uma fonte de aminoácidos, conforme especificado acima, ou uma mistura dos mesmos, opcionalmente em
30 combinação com um ou mais aminoácidos e, de preferência, ao

menos um carboidrato de redução, é aquecida sob condições de pH, temperatura, pressão e tempo de reação suficientes para se desenvolver um sabor.

Para obter um bom perfil de sabor, o pH da
5 mistura no método da invenção pode ser, geralmente, pelo menos 2. De preferência, o pH está entre 4 e 8, mais preferivelmente, entre 5 e 7, ainda mais preferivelmente, entre 5,5 e 6. O pH pode ser ajustado usando ácidos ou bases aceitáveis para alimentos, dentro do conhecimento
10 daqueles que são versados na técnica.

Geralmente, de modo a produzir o flavorizante do processo, a mistura de reação pode ser aquecida a uma temperatura entre 70 e 200°C, de preferência, entre 70 e 190°C, dependendo também do tempo de reação. Tempos de
15 reação maiores usualmente requerem uma temperatura de reação menor enquanto tempos de reação mais curtos, usualmente requerem um tempo de reação maior. O tempo de reação pode variar entre alguns segundos (por exemplo, 2 segundos) e 6 horas, de preferência entre 10 segundos e 4
20 horas, mais preferivelmente entre 20 segundos e 2 horas. Para evitar perda de solvente durante o aquecimento, a mistura de reação pode ser mantida sob condições de refluxo.

Dependendo do tipo de sabor que deva ser obtido e
25 do sistema usado para produzir o flavorizante de processo, o método do nono aspecto pode ser realizado a uma pressão que varia de pressão reduzida (por exemplo, tão baixa quanto 5 kPa, por exemplo em um forno a vácuo) até uma pressão acima da pressão atmosférica, por exemplo, tão alta
30 quanto 200-500 kPa.

Opcionalmente, quando a quantidade de água no flavorizante de processo após a etapa de aquecimento for 4% p/p ou mais, o método do nono aspecto compreende uma etapa em que o flavorizante do processo é seco. Métodos conhecidos na técnica, como secagem em forno, secagem em correia, secagem por aspersão, podem ser usados.

Dependendo do tipo de sabor que se queira desenvolver, diferentes combinações de conteúdo de matéria seca da mistura e/ou temperatura da etapa de aquecimento e/ou duração da etapa de aquecimento e/ou pressão durante a etapa de aquecimento, podem ser usadas.

De modo a produzir, por exemplo, flavorizantes de processo com um sabor tostado, geralmente uma mistura compreendendo aproximadamente 80% p/p de matéria seca, com base na mistura total, incluindo água, pode ser aquecida acima de 100°C, por exemplo, a uma temperatura de 110-120°C, por um período de 4 a 6 horas, a uma pressão reduzida, por exemplo, a 5 a 40 kPa.

De modo a produzir, por exemplo, um flavorizante de processo com um sabor cozido, geralmente uma mistura compreendendo um teor de matéria seca, com base na mistura total, incluindo água, de 40 a 60% p/p pode ser aquecida a uma temperatura de aproximadamente 100°C por um período de tempo de aproximadamente 1 a 2 horas.

Em uma modalidade preferida do método do nono aspecto da invenção, os ingredientes da mistura, compreendendo ao menos uma fonte de aminoácidos, conforme especificado acima e, de preferência, ao menos um carboidrato de redução, são introduzidos em um extrusor, a mistura é amassada e aquecida sob condições de pH,

temperatura e tempo de reação suficiente para desenvolver um sabor e o produto de reação é subseqüentemente extrudado do extrusor.

O extrusor pode ser qualquer tipo de extrusor
5 adequado para a produção de flavorizantes de processo, como um extrusor duplo. Os extrusores, por exemplo, os extrusores duplos, são conhecidos daqueles que são versados na técnica. Os ingredientes podem ser introduzidos no extrusor através do mesmo alimentador ou através de
10 alimentadores separados. Quando um extrusor é usado, de preferência a mistura é amassada e aquecida a uma temperatura de 110 a 190°C, de preferência, de 130 a 165°C. De preferência, é usada uma pressão de 100 a 300 kPa. O tempo de reação é, de preferência, de 2 segundos a 30
15 minutos, mais preferivelmente de 10 segundos a 5 minutos. Quando é usado um extrusor, a quantidade de matéria seca na mistura de reação é, de preferência, ao menos 90% p/p com base no peso total da mistura, incluindo água.

O produto de reação pode deixar o extrusor a uma
20 pressão, fora do extrusor, que varia de pressão reduzida (por exemplo, 0,5 kPa) até a pressão atmosférica (por exemplo, aproximadamente 100 kPa). O produto extrudado pode ser adicionalmente resfriado e/ou seco usando uma correia de resfriamento ou qualquer método adequado para isso.

25 Se for necessário, o método do nono aspecto pode compreender ainda um tratamento que visa a reduzir ainda mais a quantidade de acrilamida no flavorizante de processo final. O tratamento pode ser qualquer tratamento adequado para reduzir a quantidade de acrilamida no produto e que
30 possa ser aplicado na produção de flavorizantes de

processo.

Em uma modalidade, as condições de pH, temperatura, pressão e tempo de reação no método do nono aspecto, são ajustadas para reduzir a quantidade de acrilamida no processo. Por exemplo, o flavorizante de processo é seco sob pressão reduzida. A pressão pode estar compreendida, genericamente, entre 2 a 40 kPa.

Em uma outra modalidade, o produto final é tratado com uma enzima capaz de modificar ou degradar a acrilamida. O tratamento é feito sob condições de pH, temperatura e tempo de reação suficientes para a enzima reagir com a acrilamida.

De preferência, pode ser usada uma enzima amidase. Exemplos de enzimas que poderiam ser usadas e das condições sob as quais as enzimas poderiam ser usadas são dadas no pedido de patente internacional, depositado em 13-10-2005, número de pedido PCT/EP2005/055242.

O flavorizante de processo, de acordo com o oitavo aspecto da invenção, ou obtenível com o método de acordo com o nono aspecto da invenção, é muito adequado, graças ao nível muito baixo de acrilamida, para ser usado como flavorizante em alimentos ou na alimentação ou em ingredientes de alimentos ou de alimentação.

Exemplos

Materiais e Métodos

Medição de Acrilamida

Pré-Tratamento da Amostra

Amostra de 600 mg, seca e homogeneizada, é extraída usando 5 ml de água miliQ. 1 µg de acrilamida ¹³C₃ padrão interno em solução (CIL) é adicionado ao extrato.

Após 10 minutos de centrifugação (6000 rpm), 3 ml da camada superior é colocada em uma coluna Extreluut-3BT (Merck). Usando 15 ml de etilacetato, a acrilamida é eluída da coluna. O etilacetato é evaporado sob um fluxo brando de nitrogênio até aproximadamente 0,5 ml.

Condições Cromatográficas

A solução de etilacetato é analisada usando cromatografia a gás. A separação é obtida usando uma coluna CP-Wax 57 (Varian) (comprimento 25 m, diâmetro interno 0,32mm, película 1,2 μ m) e hélio como o gás carreador com um fluxo constante de 5,4 ml/min. Injeção sem separação de 3 μ l é realizada. A temperatura do forno é mantida a 50°C por 1 minuto, após o que a temperatura é aumentada em 30°C/minuto até 220°C. Após 12 minutos de temperatura constante de 220°C, o forno é resfriado e estabilizado antes da próxima injeção.

A detecção é realizada usando espectrometria em massa por ionização química on-line no modo de íon positivo, usando metano como gás de ionização. Os íons característicos m/z 72 (acrilamida) e m/z 75 ($^{13}\text{C}_3$ acrilamida) são monitorados para quantificação.

Equipamento Usado

GC:	HP6890 (Hewlet Packard)
MSD:	HP5973 (Hewlet Packard)

Método para Medir os aminoácidos Livres

O método a seguir foi usado para medir a quantidade de aminoácidos livres (por exemplo, no extrato de levedura). Uma amostra precisamente pesada do material de extrato de levedura foi dissolvida em ácido diluído e os precipitados foram removidos por centrifugação em uma

centrífuga Eppendorf. A análise de aminoácidos foi realizada no sobrenadante transparente de acordo com o método PicoTag, conforme especificado no manual do operador de Amino Acid Analysis System of Waters (Milford MA, EUA).

5 Para esta finalidade, uma amostra adequada foi obtida do líquido, adicionada ao ácido diluído e homogeneizada. A partir desta última solução, uma nova amostra foi pega, seca e derivada usando fenilisotiocianato. Os diversos aminoácidos derivados presentes foram quantificados usando
10 métodos HPLC e somados para calcular o nível total de aminoácidos livres na amostra pesada.

Exemplo 1

Produção de um Extrato de levedura autolítica com Baixa

Asparagina Livre

15 Definição de unidade de enzima: 1 μ mole e NH_3 liberado da L-asparagina por minuto a pH 5,5 e 37°C.

200 1 de uma solução 20% de um extrato de levedura autolítica (Gistex® LS, DSM Food Specialties - Países Baixos) foram feitos em água. O pH desta solução foi
20 ajustado para 5,1 usando KOH 4 N. 20 ml de solução de asparaginase (a solução continha 4602 unidades de enzima/ml) foram adicionados à solução de extrato de levedura e a mistura foi incubada por 4 horas a 51°C. Uma vez que a reação tenha terminado, a enzima foi desativada
25 por meio de tratamento térmico. A solução resultante foi seca por aspersão, após o pH foi ajustado para pH 6,5. O produto final continha uma quantidade de água menor do que 3,5% p/p. A composição de aminoácidos da mistura foi metida
30 conforme é indicado acima. Os resultados estão listados na

Tabela 1.

A asparaginase usada foi asparaginase *Aspergillus niger*, descrita em WO2004/030468.

Os resultados na tabela 1 demonstram claramente que o extrato de levedura, após o tratamento com Asparaginase, está livre de asparagina. Além disso, a quantidade de ácido aspártico aumentou com uma quantidade similar àquela da redução de asparagina.

Tabela 1: Efeito do Tratamento com Asparaginase sobre um extrato de levedura autolítica

	Composição de Aminoácido Livre antes do tratamento com asparaginase	Composição de Aminoácido Livre após tratamento com asparaginase
	AA livre*	AA livre*
Ácido aspártico	14,9	22,0
Ácido glutâmico	61,7	58,7
Asparagina	7,2	0,0
Glutamina	0,0	0,0
Serina	10,7	10,3
Glicina	4,4	4,4
Histidina	2,6	2,6
Arginina	5,2	5,1
Treonina	9,7	9,4
Alanina	30,3	29,6
Prolina	6,9	6,8
Tirosina	12,4	12,1
Valina	19,0	18,7
Metionina	6,5	6,3
Isoleucina	14,9	14,4

Leucina	26,5	26,0
Fenilalanina	14,8	14,0
Lisina	7,8	7,6
Total	255,0	248,0

* mg por grama de matéria seca de extrato de levedura

Exemplo 2

Preparação de Flavorizantes de Processo usando um Forno com Diferentes Temperaturas durante a Etapa de Aquecimento

5 Formulação 2a

— 81,3 g de pó de Gistex® LS (DSM Food Specialties - Países Baixos)

 16,0 g de pó de Maxarome® Plus HS (DSM Food Specialties - Países Baixos)

10 24,3 g de dextrose monohidratada

Formulação 2b

 81,3 g de extrato de levedura obtido no exemplo 1, pó

 16,0 g de pó de Maxarome® Plus HS (DSM Food
15 Specialties - Países Baixos)

 24,3 g de dextrose monohidratada

 Pó de Gistex® é um extrato de levedura autolítica compreendendo menos de 1% p/p de cloreto de sódio, uma quantidade de proteína de 62% p/p e uma quantidade de
20 aminoácidos livres de 40 a 50% p/p do total de proteína, todas as porcentagens em peso com base na matéria seca.

 Pó de Maxarome Plus HS é um extrato de levedura hidrolítica compreendendo ~40% p/p de cloreto de sódio com base na matéria seca. Além do mais, compreende
25 aproximadamente 3% p/p cada de 5'-GMP e 5'-IMP (medidos como sal de di-sódio heptahidratado), 5% p/p de ácido

glutâmico (medido como ácido livre), 72% p/p de proteína e uma quantidade de aminoácidos livres que é ~20% p/p do total de proteína, todas as porcentagens em peso com base na matéria seca de extrato de levedura livre de cloreto de sódio.

Em ambos os casos, os pós foram agitados com uma colher. Em forma de gotas, 3,4 gramas de óleo de girassol foram adicionados sob agitação, na mistura de pós.

As misturas de pós foram divididas em bandejas de alumínio.

Os pós foram aquecidos no forno por um período de tempo fixo a diferentes temperaturas. Os pós obtidos tinha um sabor de carne bovina grelhada.

Os pós foram analisados quanto à presença de acrilamida. Os resultados são relatados na Tabela 2.

Tabela 2

Condições do experimento	Acrilamida ($\mu\text{g/kg}$)
Mistura de pós, Formulação 2a, 165°C, 40 minutos	935
Mistura de pós, Formulação 2a, 180°C, 40 minutos	1497
Mistura de pós, Formulação 2b, 165°C, 40 minutos	255
Mistura de pós, Formulação 2b, 180°C, 40 minutos	296

Exemplo 3

Preparação de Flavorizantes de Processo usando um amassador de lote

30 gramas de amostras das formulações 3, 3a, (veja a Tabela 3 para suas composições) foram transferidos

para um amassador em lote de 50 cc, que foi pré-aquecido até uma temperatura específica e foram misturados por 180 segundos nas mesmas temperaturas.

Temperatura usada para a formulação 3, 3a: 145 e

5 150°C

Tabela 3

Ingredientes	Formulação 3	Formulação 3a
Pó de Gistex®	82,5 g	-
Dextrose, H ₂ O	29,0 g	29,0 g
Óleo de girassol	1,5 g	1,5g
Extrato de levedura ex. 1	-	82,5 g
Glicina	2,3 g	2,3 g
Maltodextrina	9,7 g	9,7 g

Os flavorizantes de processo obtidos tinham um sabor de frango grelhado.

Os flavorizantes de processo resultantes foram
10 analisados quanto ao teor de acrilamida.

Os resultados estão registrados na Tabela 4.

Tabela 4

Formulação	Temperatura (°C)	Acrilamida (ppb)
3	145	5928
3a	145	143
3	150	6227
3a	150	124

Exemplo 4

Preparação de Flavorizantes de Processo Usando um Extrusor

15

Descrição do Processo

A um extrusor de parafuso duplo, equipado com uma unidade de dosagem e injetor para água e uma unidade de

dosagem e injetor para óleo, uma mistura de açúcares e de extrato de levedura foi adicionada usando alimentadores separados. Duas formulações diferentes (formulação 4 e 4a, veja a Tabela 4) foram usadas. 8 quilos de cada formulação foram processados no extrusor durante uma hora a 165°C.

O produto foi extrudado do extrusor em um ambiente sob pressão atmosférica e foi resfriado e seco em uma correia de resfriamento com um rolo de pressão, moído e a amostra foi feita.

10

Tabela 4

Ingrediente	Formulação 4 (% p/p em matéria seca)	Formulação 4a (% p/p em matéria seca)
Pó de Gistex® LS	65,0	
Extrato de levedura, pó		65,0
Maxarome® Plus, pó	12,8	12,8
Dextrose monohidratada	19,4	19,4
Água desmineralizada	5,0	5,0
Óleo de girassol	2,7	2,7

Os produtos obtidos tinham um sabor de carne bovina grelhada escura. As amostras foram analisadas quanto à acrilamida.

Resultados:

15

Formulação 4: 4568 ppb

Formulação 4a: 400 ppb

Exemplo 5

Produção de um Hidrolisado de Caseína, baixo em asparagina

livre

Definição de unidade de enzima: 1 μ mole de NH_3 liberado de L-asparagina por minuto a pH 5,5 e 37°C.

Foi feito 1 l de uma solução 10% de hidrolisado de caseína em água. O pH desta solução foi ajustado para 5,1. 62 mg de asparaginase (tendo 14772 unidades/mg) foram adicionados à solução de caseína e a mistura foi incubada por 2 horas a 51°C. Uma vez terminada a reação, a enzima foi desativada por tratamento térmico. A solução resultante foi seca por congelamento. A composição de aminoácido da mistura foi medida no início e após o tratamento com enzima, conforme é indicado acima. Os resultados estão listados na Tabela 6.

Tabela 6:

	Composição de Aminoácido Livre antes do tratamento com asparaginase	Composição de Aminoácido Livre após tratamento com asparaginase
	AA livre*	AA livre*
Ácido aspártico	1,47	4,23
Ácido glutâmico	7,81	7,63
Asparagina	2,07	< 0,01
Glutamina	6,99	7,92
Serina	3,18	3,04
Glicina	0,54	0,53
Histidina	6,79	7,12
Arginina	6,35	6,68
Treonina	4,82	5,85
Alanina	2,53	2,66
Prolina	7,97	8,00
Tirosina	12,31	13,37

Valina	11,08	11,37
Metionina	10,07	9,44
Isoleucina	6,11	6,01
Leucina	32,05	30,37
Fenilalanina	14,78	14,29
Lisina	13,94	15,15
Total	150,86	153,66

* mg por grama de matéria seca de hidrolisado de caseína

A asparaginase usada foi asparaginase *Aspergillus niger* descrita em WO 2004/030468.

Exemplo 6

5 Produção de um Flavorizante de processo, baseado em hidrolisado de caseína

Foi preparada uma mistura de 4,7 g de glucose, 0,4 g de glicina, 1,6 g de maltodextrina e 13,4 g de hidrolisado de caseína, conforme exemplo 5 (livre d
10 asparagina). Como referência, uma mistura similar foi preparada usando hidrolisado de caseína não tratada com asparaginase ao invés do hidrolisado de caseína do exemplo 5.

15 Ambas as misturas foram tratadas em forno por 45 minutos a 155°C. Finalmente, o teor de acrilamida foi medido usando o método, descrito na seção Materiais e Métodos.

O resultado da análise de acrilamida é listado na Tabela 7.

20 Tabela 7

Hidrolisado de Caseína	Acrilamida (ppb)
Hidrolisado de caseína tratado com asparaginase	614

Hidrolisado de caseína não tratado com asparaginase	2801
---	------

Exemplo 7

Produção de uma levedura autolisada, baixa em asparagina livre

Foram autolisados 2 l de levedura em creme de Saccharomyces cerevisiae de 18,5% de sólidos secos a 51°C por 24 horas a pH 5,1 na presença de 2 gramas da endoprotease Alcalase® (Novozymes - Dinamarca). A seguir, a mistura de reação foi tratada a quente para desativar toda a atividade da enzima.

1 l da mistura de reação foi adicionalmente incubado por 2 horas a pH 5,1 e 51°C na presença de 53 mg de Asparaginase tendo 14772 unidades/mg). A seguir, a enzima foi desativada por tratamento a quente. A solução resultante foi seca por aspersão. Uma amostra de referência (não tratada com asparaginase) também foi seca por aspersão. A composição de aminoácido dos materiais secos (com e sem tratamento com asparaginase) foi medida. Os resultados são listados na Tabela 8.

Tabela 8: Efeito do Tratamento com Asparaginase sobre uma levedura autolisada

	Composição de Aminoácido Livre antes do tratamento com asparaginase	Composição de Aminoácido Livre após tratamento com asparaginase
	AA livre*	AA livre*
Ácido aspártico	14,1	19,2
Ácido glutâmico	38,3	38,8
Asparagina	4,5	< 0,01
Glutamina	5,6	5,6

Serina	4,1	3,7
Glicina	2,9	3,1
Histidina	1,3	1,5
Arginina	4,3	4,5
Treonina	5,9	6,0
Alanina	20,1	20,4
Prolina	5,8	5,7
Tirosina	7,0	7,3
Valina	11,1	11,4
Metionina	2,9	2,7
Isoleucina	9,4	9,4
Leucina	16,1	16,2
Fenilalanina	8,8	9,2
Lisina	5,0	5,3
Total	167,2	170,0

* mg por grama de matéria seca de levedura autolisada

A asparaginase usada foi asparaginase *Aspergillus niger*, descrita em WO2004/030468.

Exemplo 8

5 Produção de um Flavorizante de Processo, baseado em levedura autolisada

Foi preparada uma mistura consistindo de 4,7 g de glucose, 0,4 g de glicina, 1,6 g de maltodextrina e 13,4 g de levedura autolisada, conforme preparada no exemplo 7
10 (livre de asparagina). Como referência, uma mistura similar foi preparada usando a levedura autolisada não tratada.

Ambas as misturas foram tratadas em forno por 45 minutos a 155°C. Finalmente, o teor de acrilamida foi medido usando o método, descrito na seção Materiais e
15 Métodos.

O resultado da análise de acrilamida está listado na Tabela 9.

Tabela 9

Levedura autolisada	Acrilamida (ppb)
Levedura autolisada tratada com asparagina	710
Levedura autolisada não tratada	2551

Exemplo 95 Produção de Extrato de levedura, baixo em asparagina livre

Foram autolisados 2 l de creme de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* de 18,2 de sólidos secos a 51°C por 17,5 horas a pH 5,1 na presença de 2 gramas da endoprotease Alcalase® (Novozymes - Dinamarca). A mistura de reação foi
 10 adicionalmente incubada por 2 horas em pH 5,1 e 51°C na presença de 613 mg de Asparaginase (tendo 1802 unidades/mg). As paredes da célula foram removidas por centrifugação e o sobrenadante foi tratado termicamente por 5 minutos a 95° para desativar toda atividade da enzima
 15 presente. A seguir, o sobrenadante foi concentrado e seco por aspersão.

As concentrações de asparagina foram medidas na mistura de reação antes e depois do tratamento com asparaginase e no pó do extrato final. Os resultados estão
 20 listados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados da análise de Asparagina

Amostra	Concentração de Asparagina (mg/g matéria seca)
Antes do tratamento com asparaginase	3,29

Após tratamento com asparaginase	< 0,01
Pó de extrato de levedura	<0,03

A asparaginase usada foi asparaginase *Aspergillus niger*, descrita em WO2004/030468.

REIVINDICAÇÕES

1. Extrato de levedura caracterizado pelo fato de que tem uma quantidade de asparagina livre, baseada em matéria seca, que não é maior do que 1 mg/g, de
5 preferência, não é maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, não é maior do que 0,1 mg/g.

2. Levedura autolisada caracterizada pelo fato de que tem uma quantidade de asparagina livre, baseada em matéria seca, que não é maior do que 1 mg/g, de
10 preferência, não é maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, não é maior do que 0,1 mg/g.

3. Hidrolisado de proteína caracterizado pelo fato de que tem uma quantidade de asparagina livre, baseada na matéria seca, que não é maior do que 1 mg/g, de
15 preferência, não é maior do que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, não é maior do que 0,1 mg/g.

4. Método para produzir o extrato de levedura da reivindicação 1, a levedura autolisada da reivindicação 2, ou o hidrolisado de proteína da reivindicação 3,
20 caracterizado pelo fato de que compreende o tratamento de um extrato de levedura de partida, de uma levedura autolisada de partida ou de um hidrolisado de proteína de partida contendo asparagina livre com uma enzima, com um método físico, com um método químico ou com uma combinação
25 dos mesmos, capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre no extrato de levedura, na levedura autolisada ou no hidrolisado de proteína, para obter uma quantidade de asparagina livre no extrato de levedura, na levedura autolisada ou no hidrolisado de proteína que não seja maior
30 do que 1 mg/g, mais preferivelmente, que não seja maior do

que 0,2 mg/g, mais preferivelmente, que não seja maior do que 0,1 mg/g, com base na matéria seca.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o tratamento é realizado com uma enzima capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre no produto final sob condições de pH, temperatura e tempo de reação suficientes para enzima reagir com a asparagina livre.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o tratamento com a enzima é realizado usando uma enzima capaz de modificar a cadeia lateral de asparagina livre, de preferência com uma enzima capaz de hidrolisar o grupo amida na cadeia lateral da asparagina livre, mais preferivelmente com a enzima asparaginase (EC 3.5.1.1).

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o extrato de levedura de partida, a levedura autolisada de partida ou o hidrolisado de proteína de partida é um produto intermediário obtido em uma etapa de um método para a produção de um extrato de levedura ou de uma levedura autolisada a partir de células de levedura, de preferência durante o tratamento, mais preferivelmente após o tratamento, das células de levedura de modo a liberar e, opcionalmente, degradar ao menos parcialmente o conteúdo da célula ou um produto intermediário obtido em uma etapa de um método para a produção de um hidrolisado de proteína a partir de um substrato de proteína, de preferência, durante o tratamento, mais preferivelmente após o tratamento do substrato de proteína de modo a hidrolisá-lo em uma mistura

de peptídeos e aminoácidos.

8. Uso do extrato de levedura da reivindicação 1, ou de um extrato de levedura obtenível por um método de qualquer uma das reivindicações 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de ser em alimentos, alimentação ou ingrediente de alimentos ou de alimentação ou na preparação dos mesmos, de preferência na preparação de um flavorizante de processo.

9. Uso da levedura autolisada da reivindicação 2, ou de uma levedura autolisada obtenível por um método de qualquer uma das reivindicações 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de ser em alimentos, alimentação ou ingredientes de alimentos ou alimentação ou na preparação dos mesmos, de preferência na preparação de um flavorizante de processo.

10. Uso do hidrolisado de proteína da reivindicação 3, ou de um hidrolisado de proteína obtenível por um método de qualquer uma das reivindicações 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de ser em alimentos, alimentação ou em ingredientes de alimentos ou alimentação ou na preparação dos mesmos, de preferência na preparação de um flavorizante de processo.

11. Flavorizante de processo, caracterizado pelo fato de que tem uma quantidade de acrilamida, baseada na matéria seca do produto, que não é maior do que 800 ppb, de preferência, não é maior do que 600 ppb, mais preferivelmente, não é maior do que 400 ppb, mais preferivelmente, não é maior do que 200 ppb.

12. Método para produzir o flavorizante de processo da reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender submeter uma mistura contendo uma fonte de

aminoácidos selecionados a partir do extrato de levedura da reivindicação 1, da levedura autolisada da reivindicação 2, do hidrolisado de proteína da reivindicação 3 ou uma mistura dos mesmos, e, de preferência, ao menos um
5 carboidrato de redução, para aquecer sob condições de pH, temperatura, pressão e tempo de reação suficiente para desenvolver um sabor.

13. Método para produzir o flavorizante de processo da reivindicação 11, caracterizado pelo fato de
10 compreender submeter uma mistura contendo uma fonte de aminoácidos selecionados a partir de um extrato de levedura, uma levedura autolisada, um hidrolisado de proteína ou uma mistura dos mesmos, que contém uma quantidade de asparagina livre que é maior do que 1 mg/g, a
15 um tratamento com uma enzima, com um método físico, com um método químico ou com uma combinação dos mesmos, capaz de reduzir a quantidade de asparagina livre, de preferência, até um nível que seja inferior a 1 mg/g, e a aquecimento sob condições de pH, temperatura, pressão e tempo de reação
20 suficiente para desenvolver um sabor.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que os ingredientes da mistura são introduzidos em um extrusor, a mistura é amassada e aquecida sob condições de pH,
25 temperatura, pressão e tempo de reação suficiente para desenvolver um sabor e o flavorizante de processo resultante é subsequente extrudado do extrusor.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que
30 as condições de pH, temperatura, pressão e/ou tempo de

reação são ajustadas para reduzir a quantidade de acrilamida no flavorizante da reação, de preferência, em que o flavorizante de processo é seco sob pressão reduzida.

16. Método, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 12, 13, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o flavorizante de reação é adicionalmente tratado com uma enzima capaz de modificar ou degradar a acrilamida, de preferência com uma amidase.

17. Uso do flavorizante de processo da
10 reivindicação 11, ou obtenível por um processo de qualquer uma das reivindicações 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de ser no fornecimento de sabor a alimento ou alimentação ou ingredientes de alimento ou alimentação.

FLAVORIZANTES DE PROCESSO COM BAIXO TEOR DE ACRILAMIDA

Trata-se de um extrato de levedura, uma levedura autolisada e hidrolisado de proteína novos com uma quantidade de asparagina livre que não é maior do que 1 5 mg/g. Este extrato de levedura, levedura autolisada ou hidrolisado de proteína podem ser usados vantajosamente na produção de um flavorizante de processo com uma quantidade de acrilamida que não é maior do que 800 ppb. Este flavorizante de processo é particularmente adequado para 10 ser usado na condimentação de alimentos ou alimentação.