

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

(21) **PI0806219-6 A2**

(22) Data de Depósito: 16/01/2008  
(43) Data da Publicação: 30/08/2011  
(RPI 2121)



(51) *Int.Cl.:*  
A21D 8/04  
A21D 13/02

(54) Título: **MÉTODO PARA AUMENTAR NUM PRODUTO COZIDO NO FORNO O NÍVEL DE ARABINOXILANOS SOLÚVEIS EM ÁGUA, PRODUTO COZIDO NO FORNO, COMPOSIÇÃO ADEQUADA PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COZIDO NO FORNO, MASSA PARA UM PRODUTO COZIDO NO FORNO E UTILIZAÇÃO DE UMA MASSA**

(30) Prioridade Unionista: 16/01/2007 US 66/680,799

(73) Titular(es): Puratos N.V.

(72) Inventor(es): Christophe Courtin, Filip Arnaut, Ingrid Paula Hilda Van Haesendonck, Jacques Georis, Jan Delcour, Willem Frans Broekaert

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008050469 de 16/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/087167 de 24/07/2008

(57) Resumo: MÉTODO PARA AUMENTAR NUM PRODUTO COZIDO NO FORNO O NÍVEL DE ARABINOXILANOS SOLÚVEIS EM ÁGUA, PRODUTO COZIDO NO FORNO, COMPOSIÇÃO ADEQUADA PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COZIDO NO FORNO, MASSA PARA UM PRODUTO COZIDO NO FORNO E UTILIZAÇÃO DE UMA MASSA. A presente invenção refere-se a um método para aumentar num produto cozido no forno, após cozedura no forno, o nível de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, compreendendo o referido método os passos de:- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com farinha, uma mistura de farinhas ou uma mistura de farinha(s) com fracções de moagem tendo um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0%, de um modo preferido, pelo menos, 2,5%, e - Adição, à referida massa, de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilase termófila numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática e receita do referido produto cozido no forno. Com vantagem com o referido método pode obter-se produtos cozidos no forno que têm um nível de arabinoxilano do tipo desejado de, pelo menos, 1,7%, de um modo mais preferido pelo menos 1,75%, tal como pelo menos 1,8%, 1,9% ou 2,0%. A presente invenção refere-se ainda a produtos cozidos no forno que podem ser obtidos por este método e a um melhorador e uma massa que podem ser utilizados para a preparação desses produtos. Os produtos cozidos no forno de acordo com a invenção, com vantagem, têm benefícios melhorados para saúde.



“MÉTODO PARA AUMENTAR NUM PRODUTO COZIDO NO FORNO O NÍVEL DE ARABINOXILANOS SOLÚVEIS EM ÁGUA, PRODUTO COZIDO NO FORNO, COMPOSIÇÃO ADEQUADA PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COZIDO NO FORNO, MASSA PARA UM PRODUTO COZIDO NO FORNO E UTILIZAÇÃO DE UMA MASSA”.

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos e meios para aumentar o nível de arabinoxilano oligossacáridos solúveis em água em produtos cozidos no forno, envolvendo a utilização de enzimas adicionadas endogenamente na receita, de modo a obter produtos cozidos no forno com maiores vantagens para a saúde. Além disso, a presente invenção refere-se a produtos cozidos no forno enriquecidos com arabinoxilano oligossacáridos solúveis em água.

#### Campo da Invenção

Os produtos de panificação e pastelaria são feitos à base de cereais ou de fracções de cereais que são moídos em farinha e misturados com levedura ou agente levedante químico, sal e água como ingredientes chave. Outros ingredientes, tais como açúcar, gordura, leite, oxidantes, emulsionantes e enzimas podem ser adicionados para facilitar o processamento e/ou para melhorar o sabor ou a estrutura do produto cozido no forno e/ou o seu prazo de validade. O processo pode ser dividido em três operações unitárias básicas i. e. i) mistura e formação de uma massa visco-elástica por amassadura, ii) levedação da massa através da acção de levedura ou agentes levedantes químicos e iii) cozedura no forno (Hoseney, 1994).

O arabinoxilano (AX), também designado pentosana, é um dos principais constituintes dos grãos de cereais, ocorrendo em 5-10% do peso seco dos grãos de cereais. O AX pode ser dividido em AX extraível com água (WE-AX) e AX não extraível com água (WU-AX), os quais têm

uma estrutura semelhante mas diferem quanto ao nível de reticulação com outros polímeros naturais. Em geral, os cereais consistem num esqueleto de resíduos D-xilopiranosilo (xilose) ligados beta-(1-4), alguns dos quais estão mono- ou dissubstituídos com resíduos alfa-L-arabinofuranosilo (arabinose). Além disso, outros substituintes, tais como ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido acético ou ácido (metil) glucurónico, estão acoplados a alguns dos resíduos de xilose e/ou arabinose de AX.

É reconhecida a importância do AX na produção de produtos de panificação e de pastelaria. Estima-se que o AX de farinha de endospermas de trigo (cerca de 2% do peso seco da farinha) fixa 23% de toda a água de uma massa de farinha de trigo (Bushuk, 1966). A adição de níveis crescentes de WE-AX ou WU-AX aumenta o tempo de desenvolvimento da massa e a consistência da massa quando a absorção de água é mantida constante. O aumento da consistência da massa é maior para WU-AX do que para WE-AX, enquanto que o aumento do tempo de desenvolvimento é maior quando se adiciona WE-AX (Michniewicz et al., 1991). Tanto WE-AX como WU-AX aumentam a absorção de água no Farinógrafo (Michniewicz et al., 1991). A absorção de água no Farinógrafo também é afectada pelo peso molecular de AX. Para concentrações de AX semelhantes, fracções de AX de HMW (elevado peso molecular) têm maior impacto nos valores da absorção de água no Farinógrafo do que fracções do AX de LMW (baixo peso molecular) (Michniewicz et al., 1991; Biliaderis et al., 1995; Courtin et al., 1998). A adição de WE-AX a farinha de trigo aumenta o volume do pão enquanto que a adição de WU-AX o diminui (Michniewicz et al., 1992; Courtin et al., 1999).

As endoxilanasas hidrolisam as ligações internas da cadeia do AX, afectando, assim, a estrutura e propriedades físico-químicas do AX. Os níveis óptimos

do tipo certo de endoxilanasas melhoram as características da massa e do pão (McCleary, 1986; Rouau *et al.*, 1994) e algumas endoxilanasas são por isso actualmente comercializadas como agentes  
5 melhoradores para produtos cozidos no forno. A adição de endoxilanasas em doses óptimas durante a confecção de pão tem os seguintes efeitos desejáveis (Rouau *et al.*, 1994):

- maior viscosidade e elasticidade da massa;
- 10 • maior volume do pão depois de cozido;
- estrutura do miolo mais mole (firmeza do miolo reduzida).

O efeito vantajoso da adição de endoxilanasas na confecção de pão é devido à transformação de WU-AX em  
15 AX solubilizado enzimaticamente (ES-AX, *i. e.* uma fracção de AX que se tornou extraível com água através da acção de endoxilanasas adicionadas exogenamente sobre o WU-AX originalmente presente). Explicações hipotéticas para o efeito causal de  
20 níveis acrescidos de ES-AX ou níveis reduzidos de WU-AX sobre o melhoramento descrito acima das características da massa e do pão incluem as seguintes (Rouau *et al.*, 1994; Courtin e Delcour, 2002):

- 25 • redução da capacidade de ligação de água do WU-AX, resultando numa redistribuição de água ligada previamente em relação a outros componentes da massa, tal como glúten, melhorando assim o desenvolvimento da rede de glúten e, conseqüentemente, a  
30 extensibilidade da massa;
- redução dos níveis de WU-AX que destabilizam a estrutura da massa porque podem formar barreiras físicas para a rede de glúten e podem perfurar células de gás, resultando em coalescência e retenção  
35 de gás diminuída;
- viscosidade aumentada da fase aquosa da massa devido a níveis mais altos de ES-AX, estabilizando

assim as películas de água em células de gás durante a fermentação da massa;

- abrandamento da taxa de difusão de dióxido de carbono para fora do sistema da massa devido a resistências mecânicas melhoradas ou permeabilidade a gases reduzida das películas líquidas na massa, resultando em maior retenção de gases durante a fermentação da massa, e aumentando assim o volume do pão após a cozedura no forno.

#### 10 Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um método para aumentar num produto cozido no forno, após a cozedura no forno, o nível de arabinoxilano solúvel em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25, compreendendo o referido método os passos de:

- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com farinha ou uma mistura de farinhas com um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,5% (p/p, % do peso seco), e
- Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanasase termófila numa quantidade, pelo menos, 2 vezes superior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes superior ou até 10 vezes superior à dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno.

30 A presente invenção também proporciona um método para aumentar, num produto cozido no forno, após cozedura no forno, o nível de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25, compreendendo o

- 35 - Preparação de uma massa para um produto cozido no

forno com uma mistura de uma ou mais fracções de moagem compreendendo, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos, 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, 60%, de um modo mais preferido, pelo menos, 70% de farinha derivada de trigo, tendo a referida mistura um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,5% (p/p, % do peso seco), e

5  
10 - Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno.

15 De um modo preferido, num método da invenção, a massa é preparada com uma mistura de uma ou mais fracções de moagem, tendo a referida mistura um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2% (p/p, % do peso seco) e, além da referida preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila, ainda, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX é adicionada à referida massa.

25 De um modo preferido, num método da invenção, a referida quantidade da referida endoxilanase termófila é uma quantidade suficiente para proporcionar no referido produto cozido no forno, após cozedura no forno, um nível dos referidos arabinoxilanos solúveis em água de, pelo menos, 1,56 g/100 g de matéria seca até 7 g/100 g de matéria seca, de um modo mais preferido de, pelo menos, 1,7 g/100 g de matéria seca até 7 g/100 g de matéria seca, ainda de um modo mais preferido de, pelo menos, 1,8, 1,9, ou até 2,0 g/100 g de matéria seca até 7 g/100 g de matéria seca.

De um modo preferido, num método da invenção, a referida endoxilanase é uma endoxilanase termófila de *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus aculeatus*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*, de  
5 um modo mais preferido uma endoxilanase termófila de *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*.

De um modo preferido, num método da invenção, a referida preparação enzimática compreende ainda, pelo  
10 menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX.

A referida, pelo menos uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX pode ser adicionada directamente à massa.

15 De um modo preferido, num método da invenção, a referida preparação enzimática compreende ainda, pelo menos uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L- arabinofuranosidases, metil glucuronidases, feruloíl esterases, beta-glucanases e celulases.

20 A referida pelo menos uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidases, metil glucuronidases, feruloíl esterases, beta-glucanases e celulases pode ser adicionada directamente à massa.

25 De um modo preferido, num método da invenção, a referida farinha é farinha de endospermas de trigo, farinha de trigo integral ou uma mistura de farinha de trigo integral e farinha de endospermas de trigo.

De um modo preferido, num método da invenção, a  
30 referida mistura de uma ou mais fracções de moagem compreende ainda farelo a um nível inferior a 25% (p/p), de um modo mais preferido, a um nível inferior a 20% (p/p).

O referido farelo é de um modo preferido seleccionado  
35 do grupo consistindo em farelo de trigo enriquecido em aleurona, farelo de centeio enriquecido em aleurona, farelo de centeio, farelo de trigo, farelo

de cevada, farelo de milho e/ou farelo de arroz, de um modo mais preferido do grupo consistindo em trigo, farelo de trigo enriquecido em aleurona, farelo de centeio enriquecido em aleurona e/ou farelo de centeio.

De um modo preferido, num método da invenção, a referida mistura de uma ou mais fracções de moagem compreende ainda farinha derivada de um centeio a um nível inferior a 50% (p/p), de um modo mais preferido inferior a 40% (p/p), ainda de um modo mais preferido inferior a 30% (p/p).

A referida farinha derivada de centeio é de um modo preferido farinha de endospermas de centeio, farinha de centeio integral ou uma mistura de farinha de centeio integral e farinha de endospermas de centeio.

De um modo preferido, num método da invenção, a massa é adicionalmente suplementada com um ingrediente compreendendo arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo mais preferido na gama de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido na gama de 5 a 25.

A presente invenção também proporciona um método para aumentar num produto cozido no forno, após cozedura no forno, o nível de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, até um nível superior a 1,56 g/100 g, acima de 1,7 g/100 g de matéria seca, acima de 1,75 g/100 g de matéria seca, de um modo preferido até um nível de, pelo menos, 1,9 g/100 g de matéria seca, compreendendo o referido método os passos de:

- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com uma mistura de uma ou mais fracções de moagem compreendendo, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos, 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, 60%, ainda de um modo mais



preferido pelo menos 70% de farinha derivada de trigo,

- Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase, numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno, bem como um ingrediente compreendendo, pelo menos, 8% (p/p%, em relação ao teor total) de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25.

De um modo preferido, num método da invenção, a referida endoxilanase é uma endoxilanase termófila, de um modo preferido é uma endoxilanase termófila *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus aculeatus*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*. de um modo mais preferido, a referida endoxilanase é uma endoxilanase termófila *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*.

Num método da invenção, pelo menos uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX pode estar compreendida na referida preparação enzimática ou pode ser adicionada directamente à massa.

A presente invenção também proporciona um produto cozido no forno com um nível de, pelo menos, 1,56 g/100 g de matéria seca, de um modo preferido 1,7 g/100 g de matéria seca, de um modo mais preferido, pelo menos, 1,75 g/100 g de matéria seca e até 7 g/100 g de matéria seca de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, sendo o referido produto susceptível de ser obtido por um

método de acordo com a invenção.

de um modo preferido, o referido produto cozido no forno compreende, pelo menos, uma endoxilanase termófila e o referido produto cozido no forno tem um nível de, pelo menos, 1,56 g/100 g de matéria seca, pelo menos, 1,7 g/100 g de matéria seca e até 7 g/100 g de matéria seca, de arabinoxilano solúvel em água com um DP médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido na gama de 5 a 25.

Num produto cozido no forno de acordo com a invenção, a maior parte do referido arabinoxilano solúvel em água pode ser derivada de arabinoxilano presente na receita do produto cozido no forno.

De um modo preferido, num produto cozido no forno de acordo com a invenção, a quantidade total do referido arabinoxilano solúvel em água é derivada de arabinoxilano presente na receita do produto cozido no forno.

A presente invenção também proporciona uma composição adequada para a preparação de um produto cozido no forno de acordo com a invenção, compreendendo a referida composição, pelo menos, uma endoxilanase termófila e compreendendo, ainda, pelo menos um, de um modo preferido, pelo menos, 2 ingredientes seleccionados do grupo consistindo em glúten, amido, aditivos tais como emulsionantes (e.g. monoglicéridos, diglicéridos, ésteres do ácido diacetil tartárico de monoglicéridos (DATEM), lactilatos de estearóilo, lecitina e outros semelhantes), enzimas (e. g. xilanases, alfa-amilases, lipases, óxido redutases, proteases), compostos redutores (e. g. cisteína), compostos oxidantes (e. g. ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato) hidrocolóides e prebióticos (e. g. galactooligossacáridos, arabinoooligossacáridos, xilooligossacáridos, frutoooligossacáridos, inulina,

amido resistente, dextrinas resistentes,...).

A referida composição de acordo com a invenção pode ser utilizada como uma composição melhoradora, em forma líquida ou pó ou utilizada numa mistura  
5 otimizada pronta a usar.

A referida composição pode ainda compreender pelo menos uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L- arabinofuranosidases, metil glucuronidases, feruloíl esterases, beta-glucanases, celulases e  
10 endoxilanases altamente selectivas para WU-AX.

A presente invenção também proporciona uma massa para um produto cozido no forno, compreendendo uma mistura de uma ou mais fracções de moagem compreendendo, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos,  
15 50%, de um modo mais preferido pelo menos 60%, ainda de um modo mais preferido, pelo menos, 70% de farinha derivada de trigo, tendo a referida mistura um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0% e de um modo preferido, pelo menos, 2,5% (p/p) e  
20 compreendendo a referida massa uma quantidade de, pelo menos, uma endoxilanase termófila suficiente para proporcionar, após cozedura no forno, um produto cozido no forno com um nível de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio  
25 na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, nível esse que é, pelo menos, igual, de um modo preferido é maior do que 1,7 g/100 g de matéria seca e até 7 g/100 g de matéria seca.

A massa de acordo com a invenção pode ainda compreender, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidases, metil glucuronidases, feruloíl esterases, beta-glucanases, celulases e endoxilanases altamente  
30 selectivas para WU-AX.

Numa massa de acordo com a invenção, a referida mistura de fracções de moagem pode ser uma como

descrita num método da invenção.

A presente invenção também proporciona um produto cozido no forno preparado a partir de uma massa de acordo com a invenção.

5 A massa de acordo com a invenção pode ser utilizada para a preparação de um produto de panificação ou de pastelaria com um nível aumentado de arabinosilanos solúveis em água tendo um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5  
10 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25.

#### Descrição da Invenção

O potencial de melhoramento do pão das endoxilanas está relacionado com a sua proporção de actividade solubilizante de WU-AX para actividade de degradação  
15 de WE-AX e ES-AX e assim com a sua selectividade para o substrato (Courtin *et al.*, 1999, Courtin *et al.*, 2001). Na dosagem correcta, a adição de uma endoxilanasase com elevada selectividade para WU-AX numa receita solubiliza WU-AX, aumenta a viscosidade  
20 da fase aquosa da massa por formação de ES-AX e tem um impacto vantajoso na retenção de gás. As endoxilanasases que preferencialmente hidrolisam WE-AX e ES-AX diminuem a viscosidade, resultando numa estabilidade da massa diminuída e coalescência  
25 aumentada das células de gás e assim em volumes inferiores dos pães (Rouau *et al.*, 1994; Hilhorst *et al.*, 1999; Courtin *et al.* 2001; Courtin e Delcour, 2002). Todas as endoxilanasases comerciais utilizadas como melhoradores de pão até agora são portanto  
30 enzimas com uma elevada selectividade para solubilização de WU-AX. Não se recomenda a utilização em receitas de pão enzimas endoxilanasases que hidrolisam preferencialmente WE-AX e ES-AX a arabinosilano oligossacáridos de baixo peso molecular  
35 (AXOS). Em geral, as endoxilanasases da família das glicosido hidrolases (GH) 11 (classificação de acordo com <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) têm uma

selectividade elevada para WU-AX, enquanto que as endoxilanases da GH10 (classificação de acordo com <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) hidrolisam preferencialmente WE-AX e arabinoxilano solubilizado, mas têm pouco efeito sobre WU-AX (Moers *et al.*, 2005).

A par da selectividade das endoxilanases, também a dose desempenha um papel importante. Com níveis excessivos de endoxilanase, uma grande fracção da água que está normalmente immobilizada por AX (23% da água da massa total) é libertada e já não pode ser incorporada na massa. A massa fica então muito húmida e pegajosa durante a fermentação e levedação e tende a cair por cima das bordas das formas. Os pães resultantes têm miolo e crosta quebradiças, e evidenciam um colapso das células de ar (McCleary 1986). Estes efeitos estão relacionados com a solubilização excessiva de WU-AX e a degradação de ES-AX e WE-AX a AXOS de baixo peso molecular. O efeito pode ser parcialmente ultrapassado por abaixamento do teor de água da massa (Rouau e Moreau, 1993; Rouau *et al.*, 1994; Courtin *et al.*, 2001). Por exemplo, Courtin *et al.* (2001) produziram pães brancos de farinha de trigo com doses elevadas de endoxilanase de *Bacillus subtilis* ou endoxilanase de *Aspergillus aculeatus*. Embora possam ser feitos pães com estrutura aceitável com os níveis altos de endoxilanases, isto só era possível por abaixamento do teor de água na massa em relação a uma receita isenta de endoxilanase, e mesmo assim as massas com doses elevadas de endoxilanase de *Aspergillus aculeatus* tinham uma processabilidade muito fraca. O abaixamento do teor de água em receitas de massa é tecnicamente não desejado uma vez que pode levar a hidratação prejudicada dos constituintes da farinha no início da amassadura e comercialmente não é desejado pelo padeiro uma vez que os pães resultante

vão ficar mais secos e por isso é necessária mais farinha por kg de pão. A adição de hidrocolóides é outra forma de ultrapassar o efeito negativo da excessiva libertação de água (McCleary, 1986). Esta  
5 é, contudo, uma solução cara e por isso comercialmente não é atraente. Portanto, a sobredosagem de endoxilanasés acima da dose óptima não é recomendada na técnica. Por exemplo a  
10 Novozymes, um produtor comercial de enzimas para panificação recomenda as seguintes doses para os seguintes produtos para melhoramento de pão contendo endoxilanasés: Pentopan Mono BG, 20-120 mg/kg de farinha; Pentopan Plus BG, 30-70 mg/kg de farinha; Pentopan 500 BG, 20-180 mg/kg de farinha. Além disso,  
15 está explicitamente mencionado que "a sobredosagem resulta em adesividade da massa" (Novozymes, Cereal Food Application Sheet. Dough Conditioning. 2003-33195-04). Conclui-se portanto que a técnica anterior não apresenta recomendações para utilização de doses  
20 elevadas de endoxilanasés para o fabrico de pão. Não só a dose e a selectividade das endoxilanasés, mas também o perfil de temperaturas das endoxilanasés desempenha um papel. É geralmente aceite que uma endoxilanasés para aplicações na produção de pão deve  
25 ter a sua actividade principal durante a fase de amassadura da massa para desempenho tecnológico óptimo (Qi Si et al., 1993). Desta forma o impacto negativo de WU-AX no desenvolvimento de glúten durante a amassadura é minimizado e obtém-se uma  
30 distribuição óptima de ES-AX sobre a massa (Courtin e Delcour, 2002). Isto implica que as endoxilanasés mesófilas, *i. e.* endoxilanasés que têm a sua temperatura óptima a cerca de 40 °C, são as endoxilanasés preferidas para utilização no fabrico  
35 de pão. A maioria as endoxilanasés comerciais para o fabrico de pão pertencem a esta classe de enzimas. As endoxilanasés termófilas, endoxilanasés que são

estáveis e podem funcionar de forma óptima a temperaturas de ou acima de 65 °C e são sub-óptimas em actividade às temperaturas de amassadura da massa que variam entre 20 °C e 30 °C são, por razões de  
5 eficácia, não as endoxilanasas preferidas para utilização no fabrico de pão.

Os prebióticos são ingredientes alimentares que não podem ser digeridos por enzimas hospedeiras do tracto gastrointestinal superior e que afectam com vantagem  
10 o hospedeiro estimulando selectivamente o crescimento e/ou actividade de um número limitado de bactérias benéficas, tais como *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*, na parte inferior do tracto gastrointestinal (Gibson e Roberfroid, 1995). Os benefícios para a saúde  
15 atribuídos a prebióticos incluem solubilidade e biodisponibilidade aumentadas dos minerais cálcio e magnésio, supressão de bactérias potencialmente patogénicas no cólon, níveis reduzidos de triglicéridos no sangue, estimulação da resposta de  
20 saciedade e risco reduzido de cancro do cólon (Macfarlane *et al.*, 2006; Delzenne *et al.*, 2007). Demonstrou-se que AXOS (arabinoxilano oligossacáridos) com um grau de polimerização (DP) médio de 3-4 têm propriedades prebióticas (Yamada *et al.*,  
25 *et al.*, 1993). Experiências descritas no documento WO2006/002495 proporcionaram provas de que AXOS com um DP médio intermédio na gama de 5 a 50 têm melhores propriedades prebióticas do que AXOS com um DP médio inferior ou superior. A adição dessas preparações de  
30 AXOS à dieta causa um aumento significativo do número de *Bifidobacteria* presentes no ceco de frangos, ceco de ratos e fezes de humanos. Em humanos, os efeitos fisiológicos desejados, tais como a redução da excreção de amoníaco através da urina e a excreção  
35 aumentada através das vezes, são observados a doses de 2,21 g/dia ou ainda menores (documento WO2006/002495).

O problema técnico colocado era desenvolver produtos cozidos no forno com um elevado teor de AXOS solúveis em água com um DP médio entre 5 e 50 por hidrólise mediada por enzimas de WU-AX, enquanto se mantém  
5 processabilidade aceitável e estrutura do produto sabendo-se que ambos são afectados negativamente por hidrólise excessiva de WU-AX.

Os AXOS (arabinoxilano oligossacáridos) podem ser produzidos por acção de endoxilanasas sobre  
10 arabinoxilanos (AX), como os AX de cereais presentes nos ingredientes do pão e de produtos de pastelaria (produtos cozido no forno). A produção de AXOS através da acção de endoxilanasas sobre AX já ocorre numa extensão limitada durante o fabrico comercial  
15 actual de pão e produtos de pastelaria (produtos cozidos no forno), quando se adiciona endoxilanasas durante o passo de mistura. Contudo, devido às doses baixas de endoxilanasas utilizadas no fabrico comercial de pão e produtos de pastelaria, os níveis  
20 de AXOS nos pães e produtos de pastelaria correntes não são suficientemente elevados para exercer efeitos prebióticos vantajosos por ingestão de uma porção normal desse produto e, além disso, o DP médio é excessivamente elevado para que os AXOS possam  
25 exercer o seu efeito prebiótico óptimo.

Para assegurar os efeitos vantajosos descritos no documento WO2006/002495, o consumo diário de AXOS com um DP médio entre 5 e 50 deve ser pelo menos 2,21 g. O objectivo era desenvolver um método de fabrico de  
30 pão que permitisse proporcionar 2,21 g de AXOS através de uma porção de pão correspondente ao consumo diário médio de pão. Na Bélgica o consumo diário médio de pão é 193 g por dia (*Euromonitor*, extraído da base de dados em 12/12/2006;  
35 [www.euromonitor.com](http://www.euromonitor.com)), que corresponde a 126 g de matéria seca do pão por dia a um teor médio de matéria seca (DM) de 65,5%. Assim, para administrar



através de um novo tipo de pão promotor da saúde a toma diária alvo de 2,21 de AXOS com um DP médio de 5 a 50, o nível desses AXOS nesse pão deve com vantagem ser, pelo menos, 1,7 g/100 g de DM.

5 A técnica não proporciona métodos para a produção de produtos cozidos no forno contendo AXOS solúveis em água com um DP médio entre 5 e 50 a níveis iguais e, de um modo preferido, superiores a 1,56 ou 1,6 g/100 g de DM, com vantagem iguais a e, de um modo  
10 preferido, superiores a 1,7 g/100 g de DM através da adição de endoxilanasas à receita.

A invenção proporciona métodos e meios que permitem a produção de produtos cozidos no forno com, após cozedura no forno, um nível de AX solúveis em água  
15 com um DP médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido de 5 a 25, de, pelo menos, 1,56, 1,6 g/100 g de matéria seca (DM), com vantagem, pelo menos, 1,7 g/100 g de matéria seca (DM) como por exemplo 1,75  
20 g/100 g de DM, 1,8 g/100 g de DM, 1,9 g/100 g de DM ou 2,0 g/100 g de DM e até 7 g/100 g de matéria seca. Os métodos e meios da invenção utilizam a adição de doses elevadas de endoxilanasas.

Os métodos da invenção com vantagem utilizam a adição  
25 de doses elevadas de endoxilanasas termófilas. A combinação da dosagem elevada e endoxilanasas termófilas permite obter elevados níveis de AXOS, sem comprometer a processabilidade de produtos intermediários ou a qualidade tecnológica do produto  
30 final. Sem pretender ficar limitado pela teoria, crê-se que por utilização de endoxilanasas termófilas em vez de endoxilanasas mesófilas, a actividade xilanolítica necessária para produzir AXOS é deslocada, pelo menos em parte, da fase de amassadura  
35 e levedação para a fase de cozedura no forno, permitindo assim a utilização de doses mais elevadas sem incorrer nos efeitos negativos de actividade de

xilanase supra-óptima na massa e estrutura do pão devido à libertação excessiva de água ligada a AX durante a amassadura e levedação.

O termo "produto cozido no forno" refere-se no contexto da presente invenção a um produto não levedado, levedado com levedura ou levedado quimicamente e cozido no forno cujo principal ingrediente é farinha derivada de grãos de cereais, e que também pode conter gordura ou sucedâneo de gordura, açúcar, ovos, glúten, amido, hidrocolóides, enzimas, emulsionantes, compostos oxidantes ou redutores, compostos prebióticos e/ou um melhorador. O termo "melhorador" é um conceito bem conhecido entre padeiros e refere-se no contexto da presente invenção a uma mistura de, pelo menos, dois ingredientes activos tais como enzimas, emulsionantes, compostos oxidantes, compostos redutores e compostos prebióticos (e. g. galactooligossacáridos, fructooligossacáridos, xilooligossacáridos, arabinóxilano oligossacáridos, amido resistente, dextrina resistente, ...) que são misturados com os ingredientes habituais para produzir os produtos cozidos no forno. O melhorador normalmente contém uma substância veículo a par dos ingredientes activos. Estas substâncias veículo podem ser farinha de trigo, farinha de soja, farinha de milho, amido ou outro produto de qualidade alimentar no que se refere a melhoradores em forma de pó. Para melhoradores líquidos o veículo pode ser óleo ou água. Também é comum em melhoradores líquidos adicionar polissacáridos de origem microbiana ou vegetal para estabilizar o melhorador líquido. Exemplos de produtos cozidos no forno incluem, sem limitação, pão, pão chato, baguete, pão para torradas, pão de forma, ciabatta, pão de pizza, pão de pita, pães para hambúrgueres, brioches, bolas de pão com crosta, bolas de pão enfarinhadas, bolo, pão

de ló, bolo de gengibre, massa folhada, pão de leite, massa de tarte e biscoitos.

O termo "grão", no contexto da presente invenção, refere-se à semente de uma planta, tal como mas não limitada a cereais, com ou sem restos do fruto e com  
5 ou sem os restos da flor.

O termo "cereal", no contexto da presente invenção, refere-se a plantas da família botânica das *Poaceae*, incluindo mas não limitadas a espécies tais como  
10 trigo, cevada, aveia, espelta, centeio, sorgo, milho, e arroz.

O termo "fracção de moagem", no contexto da presente invenção, refere-se a todas ou parte das fracções resultantes da redução mecânica do tamanho dos grãos,  
15 por meio de, como exemplos mas não limitado a, corte, compressão, esmagamento, quebra ou moagem, com ou sem fraccionamento, por meio de, como exemplos mas não limitado a, crivagem, triagem, peneiração, sopragem, aspiração, peneiração centrífuga, peneiração com  
20 vento, separação electrostática, ou separação por campo eléctrico.

O termo "farelo" no contexto da presente invenção, significa uma fracção de moagem de um grão enriquecido em qualquer ou todos os tecidos a ser  
25 seleccionados de aleurona, pericarpo, sépalas, pétalas e tegumento, em comparação com o correspondente grão intacto. O farelo utilizado nesta invenção também pode ser extrudido ou formado em pastilhas, seguido por moagem ou outra forma de  
30 homogeneização física.

O termo "farinha" refere-se no contexto da presente invenção a um produto seco semelhante a pó produzido por moagem de grãos de cereais ou fracções de grãos.

O termo "farinha de endospermas" refere-se no  
35 contexto da presente invenção, a um pó obtido por moagem de grãos de cereais após remoção de parte de todo o farelo ou fracções de gérmen e contém assim a

maioria da fracção de endospermas do grão. A farinha de endospermas tipicamente tem um teor de minerais (teor de cinzas) entre 0,3% e 1,4% (p/p em DM), determinado por pesagem da massa de cinzas remanescentes após incineração de uma amostra numa mufla a temperaturas tipicamente entre 550 °C e 900 °C.

O termo "farinha integral", no contexto da presente invenção, refere-se a um pó obtido por moagem de grãos de cereal com ou sem remoção das sépalas e pétalas, com ou remoção de parte da camada de pericarpo externa e com ou sem remoção do gérmen. A farinha integral tipicamente tem um teor de minerais (teor de cinzas) superior a 1,4% (p/p de DM), determinado por pesagem das cinzas que permanecem depois de uma amostra ser incinerada numa mufla a temperaturas tipicamente entre 550 °C e 900 °C.

No contexto da presente invenção o termo "endoxilanase" refere-se a uma enzima que é capaz de hidrolisar ligações glicosídicas internas que ligam resíduos de xilose em polissacáridos contendo xilose. Essas ligações glicosídicas podem ser por exemplo a ligação beta-1,4-glicosídica em unidades beta-D-xilopiranosil-1,4-beta-D-xilopiranosilo desses polissacáridos. As endoxilanases podem ser provenientes de uma variedade de organismos, incluindo espécies de plantas, fungos (e. g. espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Disporotrichum*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*) ou espécies bacterianas (e. g. espécies de *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Thermomyces*, *Thermotoga*) (ver por exemplo documentos WO92/17573, WO92/01793, WO91/19782, WO94/21785). Preparações de endoxilanases purificadas ou parcialmente purificadas disponíveis comercialmente incluem Frimase™ B210 (Puratos), Shearzyme™ (Novozymes), Biofeed Wheat™ (Novozymes), Pentopan™ Mono BG (Novozymes), Pentopan™

500 BG (Novozymes), Pulpzyme™ (Novozymes), Ecopulp™ (AB Enzymes), Veron™ 191 (AB Enzymes), Veron™ Special (AB Enzymes), Multifect™ Xylanase (Genencor/Danisco), Multifect™ 720 (Genencor/Danisco), Spezyme™ CP (Genencor/Danisco), Grindamyl™ H640 (Danisco) e Grindamyl™ Powerbake™ (Danisco).

O termo "dose elevada" no contexto da presente invenção refere-se a uma dose para além, frequentemente muito para além da dose que seria tipicamente utilizada para aumentar o volume do pão. No contexto da invenção uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanasase é, com vantagem, adicionada à receita (de um produto cozido no forno) numa dose que é, pelo menos, 2 vezes maior, e. g., pelo menos, 2,5 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno.

No contexto da presente invenção as endoxilanasases, ou a preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanasase são, de um modo preferido, adicionadas numa quantidade tal que o nível de arabinoxilanos solúveis em água (S-AX) com um grau de polimerização médio (avDP) na gama de 5 a 50, de um modo preferido de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido de 5 a 25, nos produtos cozidos no forno, após cozedura no forno, é, pelo menos, 1,56 g/100 g de matéria seca (DM), de um modo preferido, pelo menos, 1,6 g/100 g de DM, ainda de um modo mais preferido pelo menos, 1,7 g/100 g de DM, por exemplo, pelo menos, 1,75 g/100 g de DM, pelo menos, 1,8 g/100 g de DM, pelo menos, 1,9 g/100 g de DM, ou pelo menos, 2,0 g/100 g de DM, até 7 g/100 g de DM. Esta quantidade também é referida como a "quantidade suficiente" ou como a "quantidade suficientemente

eficaz".

O termo "endoxilanase termófila" refere-se no contexto da presente invenção a uma enzima endoxilanase cuja temperatura óptima para actividade  
5 é, pelo menos, 65 °C, tal como entre 65 °C e 70 °C ou tal como entre 70 °C e 80 °C ou tal como entre 80 °C e 100 °C.

#### Descrição Pormenorizada da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos e meios para  
10 aumentar o nível de arabinoxilano oligossacáridos solúveis em água em produtos cozidos no forno.

Um primeiro aspecto da invenção refere-se a um método para aumentar num produto cozido no forno, com vantagem após a cozedura no forno, o ou os níveis de  
15 arabinoxilanos solúveis em água (S-AX) com um grau de polimerização médio (avDP) na gama de 5 a 50, de um modo preferido de 5 a 35, de um modo mais preferido de 5 a 25 (referidos como "S-AX ou arabinoxilanos do tipo desejado"), por utilização de uma dose elevada  
20 de endoxilanasas adicionadas exogenamente. Estas endoxilanasas com vantagem são adicionadas à receita de um produto cozido no forno, onde exercem o seu efeito solubilizante sobre os WU-AX presentes na receita e podem hidrolisar arabinoxilanos solúveis em  
25 água (S-AX).

As endoxilanasas (a preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase) são adicionadas à receita de um produto cozido no forno, com vantagem são adicionadas à massa desse produto,  
30 preferencialmente são adicionadas durante o passo de mistura (*id est* são misturados com a farinha, água e outros ingredientes da massa).

A requerente verificou que com vantagem a massa é preparada com uma farinha, uma mistura de farinhas ou  
35 uma mistura de farinha(s) e fracções de moagem, tendo essa farinha ou essa mistura um teor de arabinoxilanos totais de, pelo menos, 2,0%, de um

modo mais preferido, pelo menos, 2,5% (p/p, % do peso seco). Abaixo de 2% e entre 2,0% e 2,5% a quantidade de arabinoxilanos na farinha, a mistura de farinhas ou mistura de farinha(s) e fracções de moagem pode  
5 ser excessivamente baixa para produzir o nível desejado de arabinoxilanos solúveis em água (S-AX) do tipo desejado.

Para sua surpresa a requerente constatou que por adição a essa massa de uma dose suficientemente  
10 elevada de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos uma endoxilanase, de um modo preferido compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila, produtos cozidos no forno (e. g. pão) com propriedades de promoção da saúde, exercendo efeitos  
15 prebióticos com base num consumo diário médio, são fáceis de obter e isto sem comprometer a qualidade do produto.

O efeito de promoção da saúde pode incluir um ou mais dos seguintes efeitos: níveis aumentados de bactérias  
20 fermentadoras de hidratos de carbono no cólon, níveis aumentados de bactérias do género *Bifidobacterium* no cólon, níveis reduzidos de bactérias fermentadoras de proteínas no cólon, absorção aumentada de minerais no cólon, níveis reduzidos de triglicéridos e/ou  
25 colesterol LDL no plasma sanguíneo, sensação de saciedade aumentada, efeito antidiabético e risco reduzido de cancro do cólon.

Consequentemente, uma forma de realização da presente invenção refere-se a um método para aumentar num  
30 produto cozido no forno, com vantagem após cozedura no forno, o nível de arabinoxilanos solúveis em água (S-AX) com um grau de polimerização médio (avDP) na gama de 5 a 50, de um modo preferido de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido de 5 a 25, de um modo  
35 preferido a um nível de, pelo menos, 1,56%, pelo menos, 1,6%, de um modo mais preferido, pelo menos, 1,7%, compreendendo o referido método os passos de:

- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com uma farinha, com uma mistura de farinhas ou com uma mistura de farinha(s) e fracções de moagem tendo um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0%, de um modo mais preferido pelo menos 2,5%, e. g. tendo um teor total de arabinoxilanos entre 2,0% e 25%, de um modo preferido entre 2,5% e 8%, de um modo mais preferido entre 3% e 8%, ainda de um modo mais preferido entre 3% e 6%, e
- 10 - Adição à referida massa de uma composição enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase (*id est* uma ou mais endoxilanasas) - endoxilanase essa que de um modo preferido é uma endoxilanase termófila - numa quantidade, pelo menos, 15 2 vezes maior, pelo menos, 2,5 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou ainda 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido 20 produto cozido no forno.
- Quando o teor de arabinoxilanos totais está entre 2% e 2,5%, pode ser vantajoso combinar uma endoxilanase termófila (ou uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos uma endoxilanase termófila) 25 com, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX (e. g. uma endoxilanase mesófila GH11), termófila ou não. Ambos os tipos de enzimas podem ser adicionados separadamente ou podem ser combinados numa e na mesma preparação enzimática.
- 30 De um modo preferido os produtos cozidos no forno, após cozedura no forno, têm um nível de, pelo menos, 1,56% (p/p, g/100 g de DM), pelo menos, 1,6%, de um modo mais preferido, pelo menos, 1,7% de S-AX com um avDP na gama de 5 a 50, de um modo preferido, de 5 a 35 35, ainda de um modo mais preferido de 5 a 25.
- De um modo preferido, a razão A/X do S-AX está entre 0,2 e 0,9, de um modo mais preferido entre 0,3 e 0,7,



tal como entre 0,4 e 0,6.

Conseqüentemente, uma forma de realização da presente invenção diz respeito a um método para aumentar num produto cozido no forno, com vantagem após cozedura no forno, o nível de S-AX com um avDP na gama de 5 a 50, de um modo preferido, de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido de 5 a 25, compreendendo o referido método os passos de:

- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com uma farinha, com uma mistura de farinhas ou com uma mistura de farinha(s) e fracções de moagem tendo um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,5%, e. g. tendo um teor total de arabinoxilanos entre 2,5% e 25%, de um modo preferido entre 2,5% e 8%, de um modo mais preferido entre 3% e 8%, ainda de um modo mais preferido entre 3% e 6%, e

- Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase (*id est* uma ou mais endoxilanasas) - endoxilanase essa que de um modo preferido é uma endoxilanase termófila - numa quantidade suficiente para proporcionar no referido produto cozido no forno, após cozedura no forno, um nível de, pelo menos, 1,56% (p/p, g/100 g de DM), pelo menos 1,6%, de um modo mais preferido, pelo menos, 1,7% de S-AX com um avDP na gama de 5 a 50, de um modo preferido de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido de 5 a 25. De um modo mais preferido, as endoxilanasas são adicionadas numa quantidade para se obter após cozedura no forno um nível de S-AX do tipo desejado que excede 1,56% e. g. é igual a ou maior do que 1,6%, é igual a ou superior a 1,7%, e. g. é igual a ou maior do que 1,75%, igual a superior a 1,8%, igual a ou superior a 1,9%, igual a superior a 2,0%, e até 7%.

De um modo preferido, uma massa é preparada com farinha (eventualmente uma mistura de farinhas ou uma

mistura de farinha(s) e fracção(s) de moagem de que, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos, 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, 60%, ainda de um modo mais preferido, pelo menos, 70%  
5 é derivada de trigo.

Quando se utiliza uma farinha de endospermas de trigo, é recomendado adicionar uma quantidade mínima de farinha integral ou uma fracção de moagem, caso em que a fracção de moagem é de um modo preferido  
10 farelo, ainda de um modo mais preferido farelo de um cereal, e. g., pelo menos, 5% (p/p), para levar o teor total de arabinoxilanos da(s) farinha(s) a um nível de, pelo menos, 2,0%, de um modo preferido, pelo menos, 2,5%, e. g. a um nível entre 2,0% e 25%,  
15 de um modo preferido, entre 2,5 e 8%, de um modo mais preferido entre 3% e 8%, ainda de um modo mais preferido, entre 3% e 6%.

Também se pode utilizar as seguintes: misturas de farinha de trigo e farinha de endospermas de centeio  
20 e misturas de farinha de trigo e farinha de centeio integral.

Também se pode utilizar misturas consistindo em farinha derivada de trigo, farinha derivada de centeio e farelo de um cereal ou de não cereal.

25 Foram obtidos excelentes resultados com uma farinha de (100%) trigo integral.

Também foram obtidos excelentes resultados com misturas de farinha de endospermas e farelo de trigo numa proporção de 95:5 (p/p) a 75:25 (p/p),  
30 e. g. 95:5, 90:10, 85:15 ou 80:20 (p/p).

Foram obtidos excelentes resultados com farelo de trigo enriquecido em aleurona como farelo (ver Tabela 3) e com farelo de centeio ou farelo de centeio enriquecido em aleurona (ver Tabela 5).

35 Também são possíveis os seguintes tipos de farelo: farelo de trigo, farelo de cevada, farelo de arroz, farelo de milho (também chamado cascas de milho ou

palha de milho), farelo de psílio (também chamado cascas de psílio), farelo de algodão (também chamado cascas de sementes de algodoeiro). O farelo utilizado nesta invenção também pode ser extrudido ou formado em pastilhas, seguido por moagem ou outra forma física de homogeneização.

As endoxilanases termófilas e em particular endoxilanases termófilas GH11 demonstraram ser altamente adequadas para solubilizar AX de farelo e gerar o tipo desejado de arabinoxilano. Se se utilizar uma endoxilanase termófila da família GH10 (e. g. XAA), pode ser vantajoso utilizar além dela pelo menos uma outra endoxilanase, quer seja termófila ou não, que é altamente selectiva para WU-AX (e. g. uma endoxilanase mesófila GH11 ou uma endoxilanase mesófila específica de WU-AX).

Foram também obtidos ainda excelentes resultados com misturas de farinhas compreendendo para mais de 75% (p/p) de farinha derivada de trigo e farinha derivada de centeio numa proporção de 90:10 (p/p) a 50:50 (p/p), e. g. 90:10, 80:20, 75:25, 70:30 ou 60:40 (p/p). Quando a proporção de farinha derivada de trigo para farinha derivada de centeio é inferior a 40:60 e o avDP do S-AX do produto cozido no forno é reduzido abaixo de 50 pela adição de endoxilanases, então a textura e qualidade sensorial do produto cozido no forno é afectada de forma desvantajosa. Mais uma vez, endoxilanases termófilas/uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila demonstrou ser altamente adequada para produzir quantidades elevadas do tipo desejado de arabinoxilano. A endoxilanase termófila é, de um modo preferido, da família GH11, mas também pode ser da família GH10 (ou qualquer outra família). Também foram obtidos excelentes resultados com misturas de farinha compreendendo para mais de 75% (p/p) de farinha derivada de trigo, farinha derivada

de centeio e farelo de centeio, em que a proporção da soma de farinhas derivadas de trigo e centeio para farelo está entre 95:5 (p/p) e 75:5 (p/p), e. g. 95:5, 90:10, 85:15 ou 80:20 (p/p) e a proporção de  
5 farinha derivada de trigo para farinha derivada de centeio está entre 95:5 (p/p) e 50:50 (p/p, e. g. 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30 ou 60:40 (p/p). De novo, endoxilanases termófilas/uma  
preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma  
10 endoxilanase termófila demonstraram ser altamente adequadas para produzir grandes quantidades do tipo desejado de arabinoxilano. A endoxilanase termófila, é, de um modo preferido, da família GH11, mas também pode ser da família GH10 (ou de qualquer outra  
15 família).

De um modo preferido uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma (uma, duas ou mais) endoxilanase termófila é adicionada à receita (e. g. a massa).

20 Exemplos dessas endoxilanases termófilas incluem endoxilanases termófilas de *Trichoderma longibrachiatum* (forma mutante), de *Aspergillus aculeatus*, de *Thermomyces lanuginosus*, e/ou de *Thermotoga maritima*. de um modo mais preferido  
25 utiliza-se endoxilanases termófilas de *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*.

Obteve-se excelentes resultados e. g. com uma preparação de (endo)xilanase termófila de *Thermomyces*  
30 *lanuginosus* "Pentopan Mono BG" (PP MONO), e. g. quando adicionada numa dose de, pelo menos, 240000 unidades/kg de farinha e com a preparação de (endo)xilanase termófila de *Trichoderma longibrachiatum* "Ecopulp TX200A" (ECOP), e. g. quando  
35 adicionada numa dose de, pelo menos, 13200 unidades/kg de farinha (ver Tabelas 1 e 2).

Também demonstraram ser muito adequadas as

preparações de endoxilanase termófila de *Thermotoga maritima* GH10 "XynA" e as preparações de endoxilanase termófila de *Thermotoga maritima* GH10 "XynB".

de um modo preferido, pelo menos, uma (uma ou mais)  
5 endoxilanase que é altamente selectiva para WU-AX, e.  
g. endoxilanasas da família GH11, é adicionada a uma  
massa, sendo a elevada selectividade para WU-AX  
definida por um valor do factor da especificidade  
10 para o substrato SSF<sub>CHROM</sub>, como definido em Moers  
et al. (2003) e Moers et al. (2005), de, pelo menos,  
4 ou superior.

Mas as mais adequadas são as endoxilanasas termófilas  
que são altamente selectivas para WU-AX.

Se a endoxilanase termófila não for altamente  
15 selectiva para WU-AX pode com vantagem ser combinada  
com uma ou mais endoxilanasas, quer sejam termófilas  
ou não, que sejam altamente selectivas para WU-AX.

Numa forma de realização de acordo com a invenção, a  
endoxilanase termófila utilizada tem uma temperatura  
20 óptima para actividade entre 65 °C e 70 °C, de um  
modo preferido da família GH10, GH11 ou GH8, ainda de  
um modo mais preferido da família GH11.

Noutra forma de realização a endoxilanase termófila  
utilizada tem uma temperatura óptima para actividade  
25 entre 70 °C e 80 °C ou entre 80 °C e 100 °C. Mais uma  
vez, a endoxilanase é, de um modo preferido, da  
família GH10, GH11 ou GH8, ainda de um modo mais  
preferido da família GH11.

Também se verificou ser altamente adequada a  
30 utilização de (mais do que 1) endoxilanasas  
termófilas ou a combinação de, pelo menos, uma  
endoxilanase termófila e, pelo menos, uma  
endoxilanase altamente selectiva para WU-AX.

Em especial demonstraram ser muito adequadas as  
35 seguintes combinações: XBS + PP MONO, XPH + PP MONO,  
XBS + XPH + PP MONO, XPH + PP MONO + PP 500, Tm-XynB  
+ XPH, Tm-XynB + XBS + XPH, Tm-XynA + XBS + XPH, Tm-

XynB + XBS + XPH + PP MONO, e Tm-XynA + XBS + XPH + PP MONO, em que XBS significa uma preparação de endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*, XPH significa uma preparação de endoxilanase GH8 de *Pseudoalteromonas haloplanktis*, PP MONO significa uma preparação de (endo)xilanase termófila de *Thermomyces lanuginosus*, PP 500 significa uma preparação de endoxilanase *Humicola insolens*, Tm-XynA significa uma preparação de endoxilanase termófila XynA GH10 de *Thermotoga maritima* e Tm-XynB significa uma preparação de endoxilanase termófila XynB GH10 de *Thermotoga maritima*. são mais preferidas as combinações XBS + XPH + PP MONO e Tm-XynB (ou Tm-XynA) + XBS + XPH e Tm-XynA (ou Tm-XynB) + XBS + XPH + PP MONO combinações essas que resultaram num nível de AXOS do tipo desejado de 1,75 g/100 g de matéria seca e superior.

Para as doses recomendadas, ver a Tabela 4.

As diferentes endoxilanasas podem ser adicionadas separadamente à massa do produto cozido no forno ou podem ser proporcionadas à referida massa na forma de mistura de enzimas ou de preparações enzimáticas, eventualmente na forma de um ou mais melhoradores contendo as diferentes enzimas.

Para produtos cozidos no forno feitos com base em misturas de farinhas compreendendo mais de 75% (p/p) de farinha derivada de trigo e farinha derivada de centeio numa proporção de 90:10 (p/p) a 50:50 (p/p), pode adicionar-se a uma massa uma endoxilanase termófila GH10, tal como, por exemplo, XAA (uma preparação de endoxilanase termófila GH10 de *Aspergillus aculeatus*), Tm-XynA ou Tm-XynB, só ou em combinação com uma endoxilanase que é altamente selectiva para WU-AX.

O aumento dos níveis de AX do tipo desejado em produtos cozidos no forno também pode ser obtido por utilização de misturas de enzimas compreendendo,

juntamente com actividade de endoxilanasase e, em particular, juntamente com actividade de endoxilanasase termófila, actividades enzimáticas adicionais seleccionadas do grupo de alfa-L-arabinofuranosidasas  
5 (que eliminam as cadeias laterais da arabinose de arabinoxilano e aumentam assim o acesso de endoxilanasas ao seu substrato), metil glucuronidasas (que retiram as cadeias laterais de ácido metil glucurónico e aumentam, assim, o acesso de  
10 endoxilanasas ao seu substrato), feruloíl esterases (que hidrolisam a ligação éster entre ácido ferúlico e arabinoxilano e aumentam, assim, a solubilização de arabinoxilano), beta-glucanasas (que hidrolisam beta-glucanos que podem estar associados a arabinoxilano  
15 e, assim, aumentam o acesso de endoxilanasas ao seu substrato), celulases (que hidrolisam celulose que pode estar associada a arabinoxilano e, assim, aumentam o acesso de endoxilanasas ao seu substrato) e proteases.

20 Mais uma vez, em alternativa, cada uma das referidas enzimas pode ser adicionada separadamente à massa.

A utilização de endoxilanasas também pode ser combinada com outros ingredientes tais como glúten, amido, aditivos, tais como emulsionantes (e. g.  
25 monoglicéridos, diglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico de monoglicéridos (DATEM), lactilatos de estearoílo, lecitina e semelhantes), enzimas (e. g. xilanasas, alfa-amilases, lipases, oxido redutases, proteases), compostos redutores (e.  
30 g. cisteína), compostos oxidantes (e. g. ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato), hidrocolóides e prebióticos (e. g. galactooligossacáridos, arabinooligossacáridos, xilooligossacáridos, fructooligossacáridos, inulina, amido resistente,  
35 dextrinas resistentes, ...).

É, por exemplo, possível incluir as endoxilanasas numa composição de melhorador, líquido ou pó,

melhorador esse que é então adicionado a uma massa (e. g. durante o passo de mistura) ou numa mistura otimizada pronta a utilizar (uma mistura completa contendo 50% ou 100% da farinha e todos os  
5 ingredientes e aditivos secos para preparar o produto cozido no forno).

As endoxilanasas podem aqui (o melhorador) ser adicionalmente combinadas com pelo menos uma enzima seleccionada do grupo consistindo em endoxilanasas  
10 altamente selectivas para WU-AX, alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanases e celulasas.

A vantagem (de qualquer) do(s) método(s) da invenção descritos acima é que a quantidade total (e. g. um  
15 nível de, pelo menos, 1,7% ou, pelo menos, 1,75%) de AX do tipo desejado pode ser produzida *in situ* pela acção de endoxilanasas sobre (arabinoxilanos) AX, tal como WU-AX de cereais, presentes nos ingredientes, tais como a(s) farinha(s) utilizada(s).

20 Para aumentar mais o nível do tipo desejado de AXOS, a massa pode ser adicionalmente suplementada com um ingrediente compreendendo S-AX (purificados ou parcialmente purificados) com um avDP na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um  
25 modo mais preferido na gama de 5 a 25, de uma fonte exógena.

Ainda outro aspecto da invenção refere-se a um método para aumentar num produto cozido no forno, após cozedura no forno, o nível de S-AX com um avDP na  
30 gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, para um nível acima de 1,56%, acima de 1,6%, de um modo preferido acima de 1,7%, acima de 1,75%, de um modo mais preferido acima de 1,9%, tal como, por exemplo,  
35 superior a 2,0%, 2,1% ou superior a 2,2%, compreendendo o referido método os passos de:

- Preparação de uma massa para um produto cozido no



forno com farinha, uma mistura de farinhas ou uma mistura de farinha(s) e fracções de moagem.

- Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma  
5 endoxilanase numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume de pão obtido por  
10 adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno, bem como um ingrediente compreendendo, pelo menos, 8% (p/p%, com base no teor total) de S-AX com um avDP na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25.

15 Com vantagem o referido ingrediente compreende, pelo menos, 10%, pelo menos 15%, de um modo mais preferido, pelo menos, 20% ou 30% ou mais do tipo desejado de arabinoxilanos. Os referidos arabinoxilanos (de uma fonte exógena) podem estar  
20 incluídos num melhorador, no mesmo melhorador que as endoxilanasas ou num melhorador separado.

Mais uma vez, de um modo preferido, adiciona-se à massa, pelo menos, uma endoxilanase termófila (ou uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma  
25 endoxilanase termófila).

De acordo com uma forma de realização, além disso adiciona-se à massa pelo menos uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl  
30 esterases, beta-glucanasas, celulasas e endoxilanasas altamente selectivas para WU-AX.

As referidas enzimas podem ser combinadas numa única preparação enzimática ou pode cada uma delas ser adicionada separadamente à massa, eventualmente na  
35 forma de um melhorador.

As diferentes enzimas e em particular as endoxilanasas podem ser combinadas com ingredientes,

tais como glúten, amido, aditivos tais como emulsionantes (e. g. monoglicéridos, diglicéridos, ésteres do ácido diacetil tartárico de monoglicéridos (DATEM), lactilatos de estearoílo, lecitina e outros  
5 semelhantes), enzimas (e. g. xilanases, alfa-amilases, lipases, oxido redutases, proteases), compostos redutores (e. g. cisteína), compostos oxidantes (e. g. ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato), hidrocolóides e prebióticos (e. g.  
10 galactooligossacáridos, arabinoooligossacáridos, xilooligossacáridos, frutoooligossacáridos, inulina, amido resistente, dextrinas resistentes,...).

É, por exemplo, possível incluir as endoxilanases numa composição de melhorador, líquido ou pó,  
15 melhorador esse que é depois adicionado à massa (e. g. durante o passo de mistura) ou numa mistura otimizada pronta a utilizar (uma mistura completa contendo 50% ou 100% da farinha e todos os ingredientes e aditivos secos para preparar o produto  
20 cozido no forno).

Quando se suplementar a massa com os referidos S-AX (AXOS) exógenos, não é absolutamente necessário utilizar uma farinha (eventualmente uma mistura de farinhas ou uma mistura de farinha(s) e fracções de  
25 moagem tendo um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0%, de um modo preferido, pelo menos, 2,5% (p/p, % do peso seco). Além disso, tal como documentado acima com essa(s) farinha(s) vão ser produzidos níveis superiores de AXOS do tipo  
30 desejado. Qualquer das farinhas descritas até aqui (em quaisquer das formas de realização anteriores) pode ser utilizada no referido método de acordo com a invenção.

Um outro aspecto da invenção refere-se a um produto  
35 cozido no forno que pode ser obtido por um método (qualquer dos métodos acima referidos) de acordo com a invenção. Esse produto cozido no forno,

especialmente um que após cozedura no forno tem um nível de AXOS do tipo desejado de, pelo menos, 1,56%, de um modo mais preferido 1,7%, é ainda referido como um "produto cozido no forno de acordo com a  
5 invenção".

Um outro aspecto da invenção refere-se a uma composição (tal como uma preparação enzimática) compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila e, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva  
10 para WU-AX (e. g. uma endoxilanase GH11 mesófila), eventualmente combinada com, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanasas e celulasas. Outro aspecto  
15 da invenção refere-se a uma composição de melhorador, líquido ou pó, ou uma mistura otimizada pronta a utilizar compreendendo a(s) referida(s) endoxilanase(s), mais em particular compreendendo, pelo menos, uma xilanase termófila, eventualmente em  
20 combinação com, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX ou, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanasas e celulasas.

25 Um aspecto da invenção refere-se a uma composição compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila e, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX ou, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L- arabinofuranosidasas,  
30 metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanasas e celulasas, composição essa que é adequada para a preparação de um produto cozido no forno de acordo com a invenção. Ainda outro aspecto da invenção refere-se a uma composição adequada para  
35 a preparação de um produto cozido no forno de acordo com a invenção, compreendendo a referida composição, pelo menos, uma endoxilanase - mais em particular,

pelo menos, uma xilanase termófila, eventualmente em combinação com, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX ou, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanases e celulases - e compreendendo um ou mais, de um modo preferido, pelo menos, 2 outros ingredientes seleccionados do grupo consistindo em glúten, amido, aditivos tais como emulsionantes (e. g. monoglicéridos, diglicéridos, ésteres do ácido diacetil tartárico de monoglicéridos (DATEM), lactilatos de estearoílo, lecitina e outros semelhantes), enzimas (e. g. xilanases, alfa-amilases, lipases, oxido redutases, proteases), compostos redutores (e. g. cisteína), compostos oxidantes (e. g. ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato) hidrocolóides e prebióticos (e. g. galactooligossacáridos, arabinoooligossacáridos, xilooligossacáridos, frutoooligossacáridos, inulina, amido resistente, dextrinas resistentes,...).

ou composição(ões) (de melhorador) de acordo com a presente invenção (é)são em particular adequadas para a preparação de produtos cozidos no forno, que após cozedura no forno, têm um nível de AXOS do tipo desejado que com vantagem é igual a ou maior do que 1,56%, 1,6% ou de um modo preferido 1,7%, e. g. é, pelo menos, 1,75%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, até 7%. "Adequada para" no presente contexto significa que a quantidade de endoxilanases no referido melhorador é um múltiplo (pelo menos, factor 1, estando o factor de um modo preferido entre 1 e 200, de um modo mais preferido entre 10 e 100, ainda de um modo mais preferido entre 20 e 50) da quantidade definida no contexto da invenção como uma "dose elevada" ou como "uma quantidade suficiente", de tal modo que após a mistura do melhorador com os outros ingredientes na receita é obtida na receita final uma "dose elevada"

ou uma "quantidade suficiente" das endoxilanasas.

Ainda um outro aspecto refere-se a uma massa, especialmente uma massa para um produto cozido no forno de acordo com a invenção, compreendendo  
5 farinha, uma mistura de farinhas ou uma mistura de farinha(s) com fracções de moagem com de um modo preferido um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0%, de um modo preferido, pelo menos, 2,5% (p/p), de um modo preferido entre 2,0% e 25%, de um  
10 modo mais preferido entre 2,5% e 8%, ainda de um modo mais preferido entre 3% e 6% (p/p), e compreendendo uma quantidade de, pelo menos, uma endoxilanasase suficiente para proporcionar, após cozedura no forno, um produto cozido no forno com um nível de  
15 arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido, de 5 a 25 que é, pelo menos igual a, de um modo preferido, superior a 1,56% ou 1,6%, de um modo mais preferido 1,7% ou 1,75%, tal como superior a  
20 1,8%, 1,9% ou 2,0%.

De um modo preferido, tal como referido acima, as preparações de endoxilanasas utilizadas na referida massa compreendem, pelo menos, uma endoxilanasase, de  
25 um modo preferido, pelo menos, uma endoxilanasase termófila, eventualmente em combinação com pelo menos uma endoxilanasase altamente selectiva para WU-AX, com alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanasas e/ou celulasas.  
30 Alternativamente, cada uma das referidas enzimas pode ser adicionada separadamente à massa.

De um modo preferido, a massa é preparada com farinha (eventualmente uma mistura de farinhas ou uma mistura de farinha(s) e fracções de moagem de que, pelo  
35 menos, 40%, pelo menos 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, 60%, ainda de um modo mais preferido, pelo menos, 70% é derivada de trigo.

Foram obtidos excelentes resultados com uma farinha de trigo integral (100%, p/p) e com misturas de farinha de endospermas e farelo de trigo numa proporção de 95:5 (p/p) a 75:25 (p/p), e. g. 95:5, 5 90:10, 85:15 e 80:20. Foram obtidos excelentes resultados com aleurona de trigo como farelo (ver Tabela 4) e com farelo de centeio (ver Tabela 5), mas os seguintes tipos de farelo são também possíveis: aleurona de centeio, farelo de trigo, farelo de 10 cevada, farelo de arroz, farelo de milho, farelo de psílio, ou farelo de algodão.

Também são obtidos excelentes resultados com misturas de farinha compreendendo mais do que 75% (p/p) de farinha derivada de trigo e farinha derivada de 15 centeio numa proporção de 90:10 (p/p) a 50:50 (p/p), e. g. 90:10, 80:20, 75:25, 70:30 ou 60:40 (p/p).

Também foram obtidos excelentes resultados com misturas de farinha compreendendo mais do que 75% (p/p) de farinha derivada de trigo, farinha derivada 20 de centeio e farelo de centeio, em que a proporção da soma das farinhas derivadas de trigo e centeio para farelo está entre 95:5 (p/p) e 75:5 (p/p), e. g. 95:5, 90:10, 85:15, ou 80:20 (p/p) e a proporção de farinha derivada de trigo para farinha derivada de 25 centeio está entre 95:5 (p/p) e 50:50 (p/p), e. g. 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30 ou 60:40 (p/p).

uma forma de realização de acordo com a invenção a massa é adicionalmente suplementada com S-AX do tipo 30 desejado a partir de uma fonte exógena, eventualmente por adição de um ingrediente compreendendo, pelo menos, 8%, de um modo mais preferido, pelo menos, 10%, pelo menos, 15%, de um modo mais preferido, pelo menos, 20% ou 30% ou mais do tipo desejado de 35 arabinoxilanos.

Ainda outro aspecto está refere-se a produtos cozidos no forno enriquecidos em AX solúveis em água

endógenos.

Em particular, a invenção refere-se a produtos cozidos no forno que com vantagem compreendem uma preparação de endoxilanases compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila, quer em forma nativa ou desnaturada, resultando (após cozedura no forno) num nível de, pelo menos, 1,7%, e. g., pelo menos, 1,75%, e até 7% de AX solúveis em água com um DP médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido, de 5 a 25.

De um modo preferido, a razão A/X dos S-AX está entre 0,2 e 0,9, de um modo mais preferido, entre 0,3 e 0,7, tal como entre 0,4 e 0,6.

Como referido acima, a quantidade desejada do tipo desejado de arabinosilanos pode ser obtida inteiramente por hidrólise mediada por enzimas dos AX presentes na receita do produto cozido no forno.

Os AX presentes na farinha foram tornados fisiologicamente mais activos pelo tratamento com uma quantidade suficientemente eficaz de uma preparação de endoxilanases compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila.

Esses produtos cozidos no forno com vantagem são produtos com benefícios melhorados para a saúde.

Os produtos cozidos no forno de acordo com a invenção têm uma estrutura de produto aceitável apesar da utilização de doses elevadas de endoxilanases que se acreditava afectarem negativamente a processabilidade da massa e estrutura do produto.

A suplementação com AXOS de uma fonte exógena não está excluída e pode ser recomendada em casos em que são desejados níveis de AX do tipo desejado iguais a ou maiores do que 1,9%, tal como, por exemplo, superiores a 2,0%, 2,1% ou superiores a 2,2%, independentemente do tipo de farinha(s) utilizada(s). Além disso esses produtos cozidos no forno, em que a maior parte (pelo menos, 50%, 60% de um modo mais

preferido, pelo menos, 70%) do tipo desejado de AXOS são libertados a partir de AX (endógenos) presentes na(s) farinha(s) utilizadas, tinham uma estrutura de produto aceitável. Mais uma vez, de um modo preferido  
5 são utilizadas endoxilanases termófilas.

A invenção é adicionalmente ilustrada por meio de formas de realização ilustrativas não limitativas descritas a seguir.

#### Legendas das Figuras

10 A Figura 1 mostra uma imagem de fatias do centro de um pão de farinha de endospermas de trigo de controlo (à esquerda), um pão de farinha de endospermas de trigo contendo 0,4 mL/kg de farinha de Ecopulp TX200A (ao centro) e uma farinha de endospermas de trigo  
15 contendo 0,4 mL/kg de farinha de Ecopulp TX200A e 10 g/kg de farinha de uma preparação rica em AXOS.

As Figuras 2A e B mostram que o aumento de volume de pão (versus o pão de referência preparado sem endoxilanase) em função de diferentes dosagens de (A)  
20 Ecopulp<sup>®</sup> TX200A e (B) Pentopan<sup>®</sup> Mono. Está indicada a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessas enzimas à receita do referido produto cozido no forno.

#### Exemplos

25 Exemplo 1:

##### Materiais:

Frimase<sup>®</sup> B210 (XBS) é uma preparação comercial de endoxilanases de qualidade alimentar de Puratos (Groot-Bijgaarden, Bélgica) produzida por expressão  
30 em *Bacillus subtilis* de um gene de endoxilanase G11 de *Bacillus subtilis*.

Frimase<sup>®</sup>218 (XPH) é uma preparação comercial de endoxilanases de qualidade alimentar de Puratos (Groot-Bijgaarden, Bélgica) produzida por expressão  
35 recombinante de um gene de endoxilanase GH8 de *Pseudoalteromonas haloplanktis*.

Grindamyl<sup>®</sup> Powerbake<sup>®</sup> (GRIN PB) é uma preparação



comercial de endoxilanases de qualidade alimentar de Danisco (Copenhaga, Dinamarca) produzida por expressão em *Bacillus subtilis* de um gene mutante não inibido de endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*.

5

Ecopulp<sup>®</sup> TX200A (ECOP) é uma preparação comercial de endoxilanase de qualidade técnica de AB Enzymes (Darmstadt, Alemanha) produzida através da expressão recombinante de um mutante termófilo de um gene de endoxilanase GH11 de *Trichoderma longibrachiatum*.

10

Multifect<sup>®</sup> Xylanase (MF XYL) é uma preparação comercial de endoxilanase de qualidade técnica de Genencor/Danisco (Palo Alto, EUA) produzida através da expressão recombinante de um gene de endoxilanase GH11 de *Trichoderma longibrachiatum*.

15

Shearzyme<sup>®</sup> 500L (XAA) é uma preparação comercial de endoxilanases de qualidade alimentar de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) preparada pela expressão recombinante em *Aspergillus oryzae* de um gene de endoxilanase GH10 de *Aspergillus aculeatus*.

20

Tm-XynA é uma preparação não comercial produzida por expressão recombinante de um gene de endoxilanase GH10 XynA de *Thermotoga maritima*.

Tm-XynB é uma preparação não comercial produzida por expressão recombinante de um gene de endoxilanase GH10 XynB de *Thermotoga maritima* (Jiang et al. 2001).

25

Pentopan<sup>®</sup> Mono BG (PP MONO) é uma preparação comercial de endoxilanases de qualidade alimentar de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) preparada por expressão recombinante em *Aspergillus oryzae* de um gene de endoxilanase GH11 de *Thermomyces lanuginosus*.

30

Pentopan<sup>®</sup> 500 BG (PP 500) é uma preparação comercial de endoxilanases de qualidade alimentar de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) preparada por produção não recombinante por *Humicola insolens*.

35

As propriedades destas diferentes enzimas estão sumariadas na Tabela 1.

A farinha (branca) de endospermas de trigo (Surbi<sup>®</sup>) foi obtida de Dossche Mills & Bakery (Deinze, Bélgica).

5 A farinha de trigo integral (Integraal Cylinder<sup>®</sup>) foi obtida de Ceres (Bruxelas, Bélgica).

A aleurona de trigo (Grainwise<sup>®</sup>), um farelo enriquecido em aleurona de trigo, foi adquirida a Horizon Milling (Minneapolis, EUA).

10 O farelo de centeio (Rogge kleie) foi obtido de Plange Muhle (Dusseldorf, Alemanha).

A aleurona de centeio (farelo de centeio enriquecido em aleurona) foi obtida através da moagem de centeio com uma fracção de moagem semelhante a farinha de segunda escolha que era mais fina do que farelo mas  
15 mais grossa e mais escura do que farinha de endospermas).

Técnicas analíticas:

Determinação do teor de AX e do DP médio de AX foi realizada com base no método de Courtin et al. 2000  
20 (*Journal of Chromatography A*, 866, 97-104).

Retirou-se uma fatia de pão do centro do pão e a fatia foi seca durante 12 horas numa estufa a 105 °C, seguindo-se arrefecimento até à temperatura ambiente num exsiccador durante 1 hora.

25 A fatia de pão seca foi homogeneizada utilizando um almofariz e pilão para dar um pó de pão seco. Para determinação do teor de AX total no pão, 20 mg do pó de pão seco foram hidrolisados por suspensão em 5 mL de ácido trifluoroacético 2,0 M (2,0 M) e incubação a  
30 110 °C durante 60 minutos.

Após a hidrólise, a mistura foi filtrada e 3,0 mL do filtrado foram adicionalmente tratados por adição de 1,0 mL de uma solução de padrão interno (100 mg de beta-D-alose em 100 mL de uma solução saturada a 50%  
35 de ácido benzóico), 1,0 mL de solução de amoníaco (25% v/v) e 3 gotas de 2-octanol.

Os monossacáridos foram reduzidos a alditóis por

adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução de boro-hidreto de sódio (200 mg de boro-hidreto de sódio em 1,0 mL de amónia 2 M) e a amostra foi incubada durante 30 minutos a 40 °C. A reacção foi parada por adição de 400  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial. Para a reacção de acetilação, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  da amostra contendo os alditóis a 5,0 mL de anidrido acético e 500  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazole. Após 10 minutos, o excesso de anidrido acético foi retirado por adição de 900  $\mu\text{L}$  de etanol à amostra. Os acetatos dos alditóis foram então concentrados na fase orgânica por adição de água (10 mL) e solução de hidróxido de potássio (2 vezes 5,0 mL de solução 7,5 M, com uma pausa de repouso intermédia de alguns minutos). Adicionou-se solução de azul de bromofenol (500  $\mu\text{L}$ , 0,04% p/v) como indicador para a fase aquosa. Aliquotas de 1  $\mu\text{L}$  da fase orgânica contendo os acetatos de alditóis formados foram separadas por cromatografia gasosa numa coluna polar Supelco SP-2380 (30 m x 0,32 mm D.I.; 0,2  $\mu\text{m}$  de espessura do filme) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) num cromatógrafo Agilent (Agilent, série 6890, Wilmington, DE, EUA) equipado com amostrador automático, porta de injeção "splitter" (razão de "split" 1:20) e detector de ionização de chama.

A separação durante a cromatografia gasosa foi a 225 °C com injeção e detecção a 270 °C.

Os monossacáridos purificados D-galactose, D-xilose e L-arabinose foram tratados em paralelo com cada conjunto de amostras para efeitos de calibração.

Para determinação do teor de AX solúveis em água do pão, preparou-se extracto de pão por mistura de dois gramas do pó de pão seco com 20 mL de água e 120  $\mu\text{L}$  de Termamyl 120L (preparação comercial de amilase de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Termamyl 120L foi tratado durante 1 h a 90 °C imediatamente antes da utilização para destruir qualquer actividade de

endoxilanas residual. A suspensão foi incubada durante 30 minutos com agitação constante a 37 °C, centrifugada a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C até à análise. Uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante do extracto de pão foi misturada com 2,5 mL de ácido trifluoroacético (4,0 M) e realizou-se a hidrólise, redução, acetilação e análise por cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis tal como descrito acima.

Para determinação do DP médio do AX solúvel em água em pão, uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante do extracto de pão foi tratada por adição de 500 µL de um padrão interno (100 mg de beta-D-alose em 100 mL de uma solução saturada a 50% de ácido benzóico), 50 µL de solução de amoníaco (25% v/v) e 9 gotas de 2-octanol. Os sacáridos foram reduzidos a alditóis por adição de 200 µL de solução de boro-hidreto de sódio (200 mg de boro-hidreto de sódio em 1,0 mL de amónia 2 M) e a amostra foi incubada durante 30 minutos a 40 °C. A reacção foi parada pela adição de 400 µL de ácido acético glacial. Uma alíquota de 2,5 mL da amostra contendo sacáridos reduzidos foi hidrolisada por adição de 500 µL de ácido trifluoroacético (99%) e a amostra foi incubada a 110 °C durante 60 minutos. Após a hidrólise, efectuou-se a acetilação e análise por cromatografia gasosa tal como descrito acima. Os monossacáridos purificados D-xilose e L-arabinose foram tratados em paralelo com cada conjunto de amostras para efeitos de calibração.

O teor total de AX (T-AX) do pão foi calculado utilizando a fórmula (1). O teor de AX solúvel em água (S-AX) das amostras foi calculado utilizando a fórmula (2). O grau de polimerização médio de S-AX (avDP S-AX) foi calculado utilizando a fórmula (3).

(1)  $T-AX = 0,88 \times (\% \text{ de arabinose no pão seco} - 0,7 \times \% \text{ de galactose no extracto de pão} + \% \text{ de xilose no}$

pão seco)

(2) S-AX =  $0,88 \times (\% \text{ de arabinose no extracto de pão} - 0,7 \times \% \text{ de galactose no extracto de pão} + \% \text{ de xilose no extracto de pão})$

5 (3) avDP S-AX =  $(\% \text{ de arabinose no extracto de pão} - 0,7 \times \% \text{ de galactose no extracto de pão} + \% \text{ de xilose no extracto de pão}) / \% \text{ xilose de extremidades redutoras no extracto de pão}$

10 A subtracção da % de galactose nas fórmulas (1), (2) e (3) pretende ser uma correcção para o teor de arabinoglactanos solúveis em água dos cereais (Loosveld *et al.* 1998).

*Ensaios de cozedura no forno:*

15 Foram preparados pães por mistura de 1500 g de farinha (tal como especificado nas Tabelas) numa misturadora com 30 g de sal, 30 g de fermento de padeiro (obtido de Algist Bruggeman, Gent, Bélgica), 30 g de uma mistura de melhorador de pão isenta de xilanase (1 g/100 kg de farinha de alfa-amilase  
20 (Bel'Ase A75, Beldem, Bélgica), 300 g/100 kg de farinha de Datem (MULTEC data HP20, Beldem, Bélgica)) e 15 g/100 kg de farinha de ácido ascórbico), a quantidade apropriada de água (como especificado nas Tabelas) e a quantidade apropriada de preparações de  
25 endoxilanasas (como especificado nas Tabelas). Para pães de trigo integrais, adicionou-se ainda 45 g de glúten de trigo à receita com base em 1500 g de farinha. Depois de misturada, as massas foram divididas em pedaços de 600 g, arredondados  
30 manualmente e deixados levedar à temperatura ambiente durante 20 minutos, seguindo-se moldação mecânica, colocação em forma e fermentação (90 minutos a 35 °C e 95% de humidade relativa). As massas foram cozidas no forno a 230 °C durante 35 minutos. Duas horas após  
35 cozedura no forno, os volumes dos pães foram medidas através do método do deslocamento de sementes de colza.

Análise da textura do pão:

A firmeza do miolo do pão foi determinada 24 horas e 168 horas após a cozedura no forno com um analisador de textura (TA-XTplus, StableMicroSystems, Surrey, RU). Quatro fatias de pão adjacentes de 10 mm foram retiradas da parte média do pão em fatias e colocadas no centro do prato da base do analisador de textura. A sonda (diâmetro = 25 mm) comprimiu o miolo 10 mm à velocidade de 2 mm/seg e manteve esta compressão durante 20 segundos. A força é registada em função do tempo. A firmeza do miolo é a força aplicada para obtenção da deformação alvo. Elasticidade é a proporção (expressa em percentagem) entre a força medida após 20 s a deformação constante e a força aplicada para obtenção da deformação alvo. A evolução da firmeza do miolo após 168 h possibilitou a quantificação do envelhecimento. As determinações foram realizadas com 8 réplicas por tipo de pão, 2 pães por tipo e 4 determinações em cada pão (CV < 8%).

Determinação da actividade das enzimas xilanolíticas:

A actividade das enzimas xilanolíticas foi determinada colorimetricamente utilizando Xylazyme AX (Megazyme, Bray, Irlanda) como um substrato insolúvel de acordo com as instruções do fabricante para o ensaio, utilizando acetato de sódio 25 mM (pH 5,5) como um tampão e uma incubação durante 10 minutos a 35 °C. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma alteração na extinção a 590 nm de 1,0 nas condições do ensaio ao longo de um período de 60 minutos.

Diferentes endoxilanases comerciais (ver súpula da Tabela 1) foram ensaiadas quanto à sua aptidão para produzir AXOS *in situ* durante o processo de fabrico do pão. As enzimas foram ensaiadas a doses muito superiores às doses tipicamente utilizadas para aumentar o volume do pão e amaciar o miolo do pão,

que são tipicamente cerca de 0,04 g de uma preparação enzimática sólida comercial por kg de farinha ou 0,04 mL de uma preparação enzimática líquida comercial por kg de farinha.

- 5 Os níveis de AX solúveis em água (S-AX) superiores a 1,7% (p/p%, g/100 g de matéria seca) e um grau de polimerização médio (avDP) inferior a 25 foram obtidos em pães de trigo integrais feitos por adição de, pelo menos, 240000 unidades/kg de farinha da  
10 preparação de (endo)xilanase termófila de *Thermomyces lanuginosus* "Pentopan Mono BG", ou pelo menos, 13200 unidades/kg de farinha da preparação de (endo)xilanase termófila de *Trichoderma longibrachiatum* "Ecopulp TX200A" (Tabela 2).  
15 Surpreendentemente, apesar das doses de enzima muito elevadas utilizadas e da degradação significativa de AX a XOS de baixo peso molecular nestes pães, as massas ainda eram processáveis, os pães aumentaram em volume mais de 10% em comparação com controlo isento  
20 de enzima e os pães não evidenciaram redução significativa no teor de água.

A adição de Multifect Xylanase, uma endoxilanase não termófila de *T. longibrachiatum* a pão de trigo integral até 120000 unidades/kg de farinha só  
25 libertou 1,28% (p/p de DM) de S-AX com um avDP de 53, versus um teor de S-AX de 1,82% (p/p) e um avDP de 28 para pão feito com 13200 unidades/kg de farinha da endoxilanase termófila de *T. longibrachiatum* (Ecopulp TX200A). Isto indica que a termofilia da endoxilanase  
30 é um atributo importante para a sua utilização para produzir níveis elevados de AXOS durante o processo de fabrico do pão.

35 Numa série de ensaios subsequentes, foram preparados diferentes tipos de farinha com 36000 unidades/kg de farinha da endoxilanase termófila Ecopulp TX200A. As farinhas ensaiadas incluíram farinha de endospermas de trigo (farinha branca), farinha de trigo integral

e misturas de farinha de endospermas de trigo/farinha de aleuronas de trigo nas proporções de 95/5, 90/10 e 85/15 p/p (Tabela 3).

O nível mais baixo de S-AX foi libertado por Ecopulp TX200A em pão de farinha de endospermas de trigo (1,51% p/p). Em pães de farinha de trigo integral, bem como em pães de farinha de endospermas de trigo/farinha de aleurona de trigo, o Ecopulp TX200A libertou mais de 1,7% (p/p) de S-AX com um grau de polimerização médio (avDP) inferior a 25.

A degradação de AX a AXOS de baixo peso molecular por adição à massa da dose elevada de endoxilanase(s) termostável(eis) não foi acompanhada por alterações indesejadas na textura ou propriedades sensoriais do pão. A firmeza do miolo determinada 1 dia após a cozedura no forno estava diminuída em todos os tipos de pães aos quais a endoxilanase foi adicionada em relação ao correspondente pão de controlo (Tabela 3). A firmeza do miolo medida 7 dias após a cozedura no forno, como uma medida do envelhecimento do pão, estava ligeiramente aumentada em pão de farinha de endospermas de trigo contendo endoxilanase versus o correspondente pão de controlo. Inesperadamente, a adição da endoxilanase aos pães integrais ou aos pães de farinha de endospermas de trigo/farinha de aleurona de trigo, de que todos eles tinham um teor de AX total superior ao de pão de farinha de endospermas de trigo, resultaram em firmeza do miolo drasticamente reduzida após 7 dias (Tabela 3). Isto indica que o método para obtenção de níveis elevados de S-AX com avDP baixo por adição de uma dose elevada de uma endoxilanase termostável a pães com um teor de farelo de cereal aumentado inesperadamente e com vantagem resulta numa redução do envelhecimento do pão.

Numa terceira série de experiências foram ensaiadas combinações de enzimas com diferentes temperaturas



óptimas em pães de trigo integrais. Foram obtidas combinações contendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila, níveis de S-AX excedendo 1,7% (p/p) com avDP inferior a 25. Exemplos são combinações de XBS + XPH + PP MONO, XPH + PP MONO + PP 500, Tm-XynB + XPH, Tm-XynB + XBS + XPH, Tm-XynA + XBS + XPH, Tm-XynB + XBS + XPH + PP MONO e Tm-XynA + XBS + XPH + PP MONO (Tabela 4). A combinação que inclui a enzima da família de glicosido hidrolases 10 Tm-XynB de *Thermotoga* *maritima* deu níveis de avDP particularmente baixos dos S-AX.

Numa quarta série de experiências, a endoxilanase termófila Ecopulp TX200A e uma combinação de XBS + XPH + PP MONO foram ensaiadas em pães feitos de uma mistura de farinha de endospermas de trigo e farelo de centeio em proporções de 85/15 (p/p) e 80/20 (p/p) ou uma mistura de farinha de endospermas de trigo e aleurona de centeio (farelo de centeio enriquecido em aleurona). Em todos os casos obteve-se um nível de S-AX bem em excesso de 1,7% (p/p de DM) e o avDP dos S-AX era igual ou inferior a 35 (Tabela 5). A utilização de Ecopulp TX200A em pão feito à base de farinha de endospermas de trigo/farelo de centeio (80/20) resultou num teor de S-AX de 2,4% (p/p).

#### 25 Exemplo 2:

##### *Materiais:*

As especificações das enzimas utilizadas estão indicadas no exemplo 1 e na Tabela 1.

A farinha de endospermas de centeio do tipo 1150 e a farinha de centeio do tipo 1740 foram adquiridas a Plange Muhle (Dusseldorf, Alemanha). A farinha de endospermas de trigo (branca) era do tipo 550 de Plange Muhle ou da marca Surbi<sup>®</sup> de Dossche Mills & Bakery (Deinze, Bélgica). O farelo de centeio era da marca Rye Bran Beaten de Hildebrandmuhlen (Frankfurt, Alemanha).

Técnicas analíticas:

A determinação do teor de T-AX, S-AX e do DP médio de DP de S-AX foram realizadas como descrito no exemplo 1.

Ensaio de cozedura no forno:

5 Os pães preparados com uma mistura de 70% de farinha de endospermas de centeio do tipo 1150 e 30% de farinha de endospermas de trigo do tipo 550 foram preparados por mistura de 1050 g de farinha de centeio, 450 g de farinha de trigo, 33 g de sal, 37,5  
10 g de levedura (Algist Bruggeman, Gent, Bélgica), 73,5 g de massa lêveda (Aroldo, Puratos, Bélgica), 1245 g de água e a quantidade apropriada de preparações de endoxilanasas (como especificado na Tabela 6). A mistura foi feita durante 5 minutos a baixa  
15 velocidade e 3 minutos a alta velocidade. Após 15 minutos de fermentação da massa (25 °C) a massa foi dividida em dois pedaços de 1200 g, moldados manualmente, colocados em cestos de madeira e fermentados durante 55 minutos (30 °C, 75% de  
20 humidade relativa). Depois de retirados dos cestos e deixados em repouso durante 5 minutos os pedaços de massa foram cozidos no forno, num forno de andares (Miwe, Alemanha) durante 4 minutos a 260 °C/240 °C (temperatura da parte superior do forno/temperatura da base do forno) com injeção de 0,8 L de vapor durante o primeiro minuto e durante 41 minutos a 230 °C/220 °C.

Pães com 70%, 75% ou 80% de farinha de endospermas de trigo (Surbi®) e farinha de centeio e/ou farelo de  
30 centeio adicionado foram preparados por mistura de 1500 g de farinha e/ou farelo (como especificado na Tabela 7) numa misturadora com 30 g de sal, 30 g de levedura de padeiro (obtida de Algist Bruggeman, Gent, Bélgica), 45 g de glúten de trigo, 30 g de uma  
35 mistura de promotor de pão isenta de xilanase (1 g/100 kg de farinha de alfa-amilase (Bel'Ase A75, Beldem, Bélgica), 300 g/100 kg de farinha de Datem

(MULTEC data HP20, Beldem, Bélgica)) e 15 g/100 kg de farinha de ácido ascórbico), a quantidade apropriada de água (como especificado nas Tabelas) e a quantidade apropriada de preparações de endoxilanases  
5 (como especificado nas Tabelas). Após misturar as massas foram divididas em pedaços de 600 g, arredondadas manualmente e deixadas crescer à temperatura ambiente durante 20 minutos, seguida por moldação mecânica, colocação em formas e fermentação  
10 (90 minutos a 35 °C e 95% de humidade relativa). As massas foram cozidas no forno a 230 °C durante 35 minutos.

O volume do pão foi medido 2 horas depois da cozedura no forno pelo método do deslocamento de sementes de  
15 colza.

Determinação da actividade das enzimas xilanolíticas:  
A actividade das enzimas xilanolíticas foi determinada como descrito no exemplo 1.

Foram feitos pães à base de uma mistura de farinha de endospermas de trigo e farinha de endospermas de centeio numa proporção de 30/70 (p/p), com e sem adição de diferentes endoxilanases (Tabela 6). O pão sem adição de endoxilanase tinha um teor elevado de S-AX de 2,36% (p/p em DM), mas também tinha um avDP  
20 elevado de 295. A adição da endoxilanase não termófila Frimase B210 (XBS) a 0,12 g/kg de farinha, uma dose muito superior à dose tipicamente recomendada para aumentar o volume do pão e amaciar o miolo do pão (cerca de 0,04 g), aumentou mais o nível  
25 de S-AX mas não resultou num abaixamento do avDP abaixo de 50 (Tabela 6). A adição da endoxilanase termófila G10 Shearzyme 500L (XAA) e a adição da endoxilanase termófila GH11 Ecopulp TX200A (ECOP) ambas aumentaram mais o nível de S-AX (2,74% e 3,05%  
30 de DW, respectivamente) e resultaram num avDP inferior a 50. Contudo, observou-se que os pães de farinha de trigo/centeio preparados com as doses  
35

elevadas de endoxilanases termófilas tinham uma pior textura e qualidade sensorial do que o correspondente pão isento de endoxilanases. A massa de trigo/centeio contendo Ecopulp TX200A tinha uma consistência fraca e tendia a escorrer, a largura dos pães tornou-se maior e os pães eram menos altos, e os pães apresentaram uma firmeza do miolo drasticamente aumentada e por isso indesejada, 7 dias após a cozedura no forno em comparação com o correspondente pão de controlo (Tabela 6). O pão de trigo/centeio contendo Shearzyme 500L tinha um teor de água que era reduzido em cerca de 10% em comparação com o do correspondente pão de controlo, o que é indesejado (Tabela 6).

Foram feitos pães à base de uma mistura de farinha de endospermas de trigo e farinha de centeio numa proporção de 70:30 e foram adicionadas as seguintes enzimas ou combinações de enzimas: a endoxilanase termófila Shearzyme 500L em combinação com XBS, a endoxilanase termófila Shearzyme 500L em combinação com XPH e a endoxilanase termófila Tm-XynB de *Thermotoga maritima*. Os pães com endoxilanases adicionadas tinham um nível de S-AX superior a 2,0% (p/p de DM) e um avDP entre 5 e 50 (Tabela 7). Ao contrário dos pães feitos de uma mistura de farinha de endospermas de trigo e farinha de centeio numa proporção de 30/70 (p/p), os pães tratados com enzimas feitos com uma mistura de farinha de endospermas de trigo e farinha de centeio numa proporção de 70:30 não sofreram deterioração nem da textura nem das propriedades sensoriais. Pelo contrário, a firmeza do miolo após 1 dia e após 7 dias eram inferiores à do controlo sem enzimas (Tabela 7). As massas tinham consistência e processabilidade aceitáveis em comparação com o controlo isento de enzimas.

Níveis de S-AX acima de 2,0% e avDP dos S-AX entre 5

e 50 foram também obtidos em pães feitos com uma mistura de farinha de endospermas de trigo e farinha de centeio numa proporção de 75:25 e tratados com uma combinação de PP MONO + XBS, PP MONO + XPH, ou PP  
5 MONO + XBS + XPH (Tabela 7).

Noutra série de experiências a endoxilanase termófila Ecopulp TX200A e uma combinação de XBS + XPH + PP MONO foram testadas em pães feitos de uma mistura de  
10 farinha de endospermas de trigo e farinha de centeio numa proporção de 75:25 (p/p), uma mistura de farinha de endospermas de trigo, farinha de centeio e farelo de centeio numa proporção de 80:10:10 (p/p) ou uma  
15 mistura de farinha de endospermas de trigo, farinha de centeio e farelo de centeio numa proporção de 75:15:10 (p/p). Em todos os casos obteve-se um nível de S-AX muito acima de 1,9% (p/p de DM) e o avDP dos S-AX era igual ou inferior a 33 (Tabela 7). As massas tinham boa consistência e processabilidade. Os pães  
20 de farinha de trigo/farinha de centeio tratados com enzima e os pães de farinha de trigo/farinha de centeio/farelo de centeio tratados com enzimas tinham valores da firmeza do miolo (medida quer após 1 dia quer após 7 dias) que eram inferiores aos de um pão de controlo isento de enzimas feito com 100% farinha  
25 de endospermas de trigo (Tabela 7).

### Exemplo 3:

#### Materiais:

As especificações das enzimas utilizadas estão indicadas no exemplo 1 e na Tabela 1.

30 A farinha de endospermas de trigo (branca) (Surbi<sup>®</sup>) foi obtida de Dossche Mills & Bakery (Deinze, Bélgica).

A preparação de ingredientes ricos em AXOS foi feita como se segue. Uma suspensão de farelo de trigo em  
35 água (1:7 p/v) foi em primeiro lugar tratada com uma  $\alpha$ -amilase termostável (Termamyl 120LS, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca; 1  $\mu$ L/g de farelo de trigo)

durante 90 min a 90 °C com agitação contínua para hidrolisar o amido. A suspensão foi filtrada e o filtrado eliminado. O resíduo foi ressuspenso em água (1:7 p/v) e incubado com agitação contínua durante 8 h a 52 °C com uma endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis* (Grindamyl H640, Danisco, Dinamarca) a 11 unidades por g de farelo sem amido. Depois do tratamento com endoxilanase, a suspensão foi filtrada com recuperação do filtrado. Após a inactivação da enzima por tratamento (90°, 10 min), a solução foi concentrada até 20% de matéria seca num evaporador de queda de película e finalmente seca num secador por atomização. A preparação tinha um teor de AX solúveis em água de 58% e o S-AX tinha um avDP de 9 e um grau médio de substituição de arabinose de 0,25.

Técnicas analíticas:

A determinação do teor de T-AX, S-AX e do DP médio de DP de S-AX foram realizadas como descrito no exemplo 1.

Ensaio de cozedura no forno:

Os ensaios de cozedura no forno foram realizados como descrito no exemplo 1. A quantidade apropriada de água, de preparação de endoxilanase e de preparação de AXOS numa receita de massa foram como especificado nas Tabelas.

Determinação da actividade das enzimas xilanolíticas:

A actividade das enzimas xilanolíticas foi determinada como descrito no exemplo 1.

Atingir a quantidade alvo de 1,7% de S-AX com um grau de polimerização médio (avDP) entre 5 e 50 é difícil de alcançar só com adição de endoxilanase ao pão feito de farinha com um teor de AX total inferior a 2,0% ou inferior a 2,5%, e. g. pão feito com base em farinha de endospermas de trigo, mesmo quando se utiliza dose elevadas de endoxilanasas (ver também a Tabela 3). Na presente invenção é proporcionado um método para com vantagem se utilizar doses elevadas

de endoxilanase em pão de farinha de trigo em combinação com a adição de uma fonte exógena de AXOS com um DP médio entre 5 e 50. O método resulta inesperadamente em pão com um nível muito elevado de S-AX com um DP médio entre 5 e 50 e não apresentando

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500  
505  
510  
515  
520  
525  
530  
535  
540  
545  
550  
555  
560  
565  
570  
575  
580  
585  
590  
595  
600  
605  
610  
615  
620  
625  
630  
635  
640  
645  
650  
655  
660  
665  
670  
675  
680  
685  
690  
695  
700  
705  
710  
715  
720  
725  
730  
735  
740  
745  
750  
755  
760  
765  
770  
775  
780  
785  
790  
795  
800  
805  
810  
815  
820  
825  
830  
835  
840  
845  
850  
855  
860  
865  
870  
875  
880  
885  
890  
895  
900  
905  
910  
915  
920  
925  
930  
935  
940  
945  
950  
955  
960  
965  
970  
975  
980  
985  
990  
995

textura ou propriedades sensoriais indesejadas. Foram feitos pães e farinha de endospermas de trigo sem adição de uma preparação rica em AXOS ou enzimas endoxilanasas (controlo), com adição de 52800 unidades/kg de farinha da endoxilanase termófila Ecopulp TX200A e com adição de 52800 unidades/kg de farinha de Ecopulp TX200A e 10 g/kg de farinha uma preparação rica em AXOS isolada de farelo de trigo e contendo 58% de S-AX com um avDP de 9.

O pão com a dose elevada de endoxilanase continha 1,69% (p/p) de S-AX com um avDP de 24, enquanto que o pão contendo a dose elevada de endoxilanase e a preparação rica em AXOS continha 2,19% (p/p) de S-AX com um avDP de 18 (Tabela 8). O pão com a dose elevada de endoxilanase e a preparação rica em AXOS apresentou um aumento de volume de 13% versus o pão de controlo e uma textura do miolo completamente normal (Figura 1).

#### Exemplo 4:

25 Materiais:

30 Ecopulp<sup>®</sup> TX200A (ECOP) é uma preparação comercial de endoxilanase de qualidade técnica de AB Enzymes (Darmstadt, Alemanha) produzida através da expressão recombinante de um mutante termófilo de um gene de endoxilanase GH11 de *Trichoderma longibrachiatum*.

35 Pentopan<sup>®</sup> Mono BG (PP MONO) é uma preparação de endoxilanase de qualidade alimentar de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) preparada por expressão recombinante em *Aspergillus oryzae* de um gene de endoxilanase GH11 de *Thermomyces lanuginosus*.

A farinha de trigo integral (Integraal Cylinder<sup>®</sup>) foi obtida de Ceres (Bruxelas, Bélgica).

Ensaaios de cozedura no forno:

Os ensaios de cozedura no forno foram realizados como explicado no Exemplo 1 e utilizando farinha de trigo integral 67% (p/p) de água na farinha. Adicionou-se à  
5 massa diferentes dosagens de Ecopulp<sup>®</sup> TX200A (ECOP):  
respectivamente 0; 2,5; 5; 40; 100; 200  
microlitros/kg de farinha e Pentopan<sup>®</sup> Mono BG (PP  
MONO): respectivamente 0; 80; 200; 400; 800 mg/kg de  
farinha.

10 O volume do pão foi avaliado, duas horas após a  
cozedura no forno, pelo método do deslocamento das  
sementes de colza.

O aumento do volume do pão devido à adição de  
endoxilanase mostrado nas Figuras 2A e 2B. Para se  
15 obter 90% do aumento do volume máximo foi preciso  
adicionar respectivamente 35 microlitros de Ecopulp<sup>®</sup>  
TX200A ou 170 mg de Pentopan<sup>®</sup> Mono à massa. São  
libertados mais de 1,7% (p/p) de S-AX com um grau de  
polimerização médio inferior a 30 quando se adiciona  
20 100 microlitros de Ecopulp<sup>®</sup> TX200A ou 2,8 vezes a  
dosagem para obter 90% do aumento de volume máximo  
com esta enzima. São libertados mais de 1,7% (p/p) de  
S-AX com um grau de polimerização médio inferior a 30  
quando se adiciona 800 mg de Pentopan<sup>®</sup> Mono, ou 4,7  
25 vezes a dosagem para obter 90% do aumento de volume  
máximo com esta enzima.

#### Referências

- Bushuk, W. Distribution of water in dough and bread.  
*The Bakers Digest*. 1966, 40, 38-40.
- 30 Courtin, C. M. e Delcour, J. A. Physicochemical and  
bread-making properties of low molecular weight wheat  
derived arabinoxylans. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46,  
4066-4073.
- Courtin, C. M., Roelants, A. e Delcour, J. A.
- 35 Fractionation-reconstitution experiments provide  
insight into the role of endoxylanases in bread-  
making. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1870-1877.



Courtin, C. M., Van den Broeck, H. e Delcour, J. A. Determination of reducing end sugar residues in oligo- and polysaccharides by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2000, 866, 97-104.

5

Courtin, C. M., Gelders, C. G. e Delcour, J. A. Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour breadmaking. *Cereal Chem.* 2001, 78, 564-571.

10

Courtin, C. M. e Delcour, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *J. Cereal Sci.* 2002, 35, 225-243.

15

Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.* 2007, 137:2547S- 2551S.

20

Gibson, G. R. e Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125, 1401-1412.

25

Hilhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., van Vliet, T., Gruppen, H. e Schols, H. A. Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *J. Food Sci.* 1999, 64, 808-813.

30

Hoseney, R. C. Yeast-leavened products, in: "Principles of Cereal Science e Technology", segunda edição, Hoseney, R. C, ed., American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA, 1994, pp. 229-273.

35

Loosveld, A. A., Maes, C., Grobet, P.J., Delcour, J. A. Quantitative and qualitative study of arabinogalactan-peptide during bread making. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46: 5026-5030.

Macfarlane, S., Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006, 24:701-714.

- McCleary, B. V. Enzymatic modification of plant polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 1986, 8, 349-354.
- 5 Michniewicz, J., Biliaderis, CG. e Bushuk, W. Effect of added pentosans on some physical and technological characteristics of dough and gluten. *Cereal Chem.* 1991, 68, 252-258.
- 10 Michniewicz, J., Biliaderis, C. G. e Bushuk, W. Effect of added pentosans on some properties of wheat bread. *Food Chem.* 1992, 43, 251-257.
- Moers K., Courtin C. M., Brijs K., Delcour J. A. A screening method for endo-beta-1,4-xylanase substrate selectivity. *Anal Biochem.* 2003, 319:73-7.
- 15 Moers, C., Celus, I., Brijs, K., Courtin, C. M., e Delcour, J. A. Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable e water-unextractable arabinoxylan. *Carbohydrate Research* 2005, 340, 1319-1327.
- 20 Qi Si, J., Kofod, L. V. e Goddik, I. Effect of microbial xylanases on water insoluble wheat pentosans and in correlation with their baking effect. 1993, Application notes, Novo Nordisk. N° A-06279.
- 25 Rouau, X. e Moreau, D. Modification of some physicochemical properties of wheat flour pentosans by an enzyme complex recommended for baking. *Cereal Chem.* 1993, 70, 626-632.
- 30 Rouau, X., El-Hayek, M.-L. e Moreau, D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. *J. Cereal Sci.* 1994, 19, 259-272.
- 35 Yamada H., Itoh, K., Morishita, Y., Taniguchi, H. Structure and properties of oligossacáridos from wheat bran. *Cereal Foods World* 1993, 38, 490-492
- Jiang, Z. Q., Kobayashi, A., Ahsan, M. M., Li, L. T., Kitaoka, M., Hayashi, K., Characterization of a

thermophilic Family 10 endo-xylanase (XynB) from *Thermotoga maritima* that cleaves p-nitrophenyl-beta-D-xyloside. *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 92, 423-428.

Tabela 1: Sumário das características das diferentes preparações de endoxilanasas utilizadas

Nome comercial	Abreviatura	Endoxilanasas de	Família de Glicosil Hidrolases	Temperatura ótima	Atividade Específica a 35°C	Produtor
Grindamil® Powerbake®	GRIN PB	<i>Bacillus subtilis</i> , forma mutante	GH11	50 °C	1200 U/g	Danisco
Frimase® B210	XBS	<i>Bacillus subtilis</i>	GH11	50 °C	42000 U/g	Puratos
Frimase® 218	XPH	<i>Pseudomonas haloplanktis</i>	GH8	35 °C	7800 U/g	Puratos
Ecopulp® TX200A	ECOP	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> , forma mutante	GH11	70 °C	132000 U/mL	AB Enzymes
Xilanase Multifect®	MF XYL	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	GH11	50 °C	300000 U/mL	Genencor
Shearzyme® 500 L	XAA	<i>Aspergillus aculeatus</i>	GH10	65 °C	6000 U/mL	Novozymes
Pentopan® Mono BG	PP MONO	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GH11	65 °C	300000 U/g	Novozymes
Pentopan® 500 BG	PP 500	<i>Hemicola insolens</i>	mistura (não recombinante)	60 °C	192000 U/g	Novozymes
/	Tm-XynB	<i>Thermotoga maritima</i>	GH10	90 °C	54 U/mL	Puratos
/	Tm-XynA	<i>Thermotoga maritima</i>	GH10			Puratos

**Tabela 2:** Arabinoxilano total (T-AX), arabinoxilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão e teor de humidade do pão de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanas. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo. N.D. = não determinado

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farina (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Teor de humidade do pão
1	Endospermas de trigo	Nenhuma	0	0	59%	2,09	0,94	302	100%	32,5%
1	Endospermas de trigo	XBS	0,12 g	5040	59%	2,09	1,39	101	113%	31,8%
1	Endospermas de trigo	XPH	0,12 g	936	59%	2,09	1,25	108	114%	32,9%
2	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,66	0,68	151	100%	36,8%
2	Trigo integral	PP MONO	0,4 g	120000	67%	6,66	1,57	36	111%	35,0%
2	Trigo integral	XPH	0,4 g	3120	67%	6,66	1,3	44	114%	36,3%
3	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,64	0,72	169	100%	35,5%
3	Trigo integral	MF XXL	0,4 mL	120000	67%	6,64	1,28	61	N.D.	34,9%
3	Trigo integral	GRIN PB	0,4 g	144	67%	6,64	1,32	85	N.D.	36,0%
3	Trigo integral	PP 500	0,4 g	76800	67%	6,64	1,55	55	N.D.	35,0%
3	Trigo integral	PP MONO	0,8 g	240000	67%	6,64	1,79	24	N.D.	35,5%
4	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,15	0,75	103	100%	36,0%
4	Trigo integral	XBS	0,12 g	5040	67%	6,15	1,23	107	112%	34,6%
4	Trigo integral	ECOP	0,1 mL	13200	67%	6,15	1,82	28	117%	35,6%
4	Trigo integral	ECOP	0,2 mL	26400	67%	6,15	1,93	20	115%	36,7%
4	Trigo integral	ECOP	0,4 mL	52800	67%	6,15	2,09	16	113%	36,0%

Tabela 3: Arabinosilano total (T-AX), arabinosilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão, teor de humidade do pão, firmeza do miolo após 1 e 7 dias de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanasas. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo.

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio)
1	Endospermas de trigo	Nenhuma	0	0	59%	2,31	0,73	147	100%	190 $\pm$ 13	358 $\pm$ 45
1	Endospermas de trigo	ECOP	0,27 mL	36000	59%	2,31	1,51	23	111%	162 $\pm$ 9	370 $\pm$ 17
2	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,65	0,82	90	100%	244 $\pm$ 10	479 $\pm$ 44
2	Trigo integral	ECOP	0,27 mL	36000	67%	6,65	2,01	19	100%	241 $\pm$ 12	398 $\pm$ 40
3	Endosperma de trigo:aleuron a de trigo (95:5)	Nenhuma	0	0	59%	4,23	0,76	134	100%	170 $\pm$ 4	348 $\pm$ 19
3	Endosperma de trigo:aleuron a de trigo (95:5)	ECOP	0,27 mL	36000	59%	4,23	1,78	23	116%	137 $\pm$ 12	280 $\pm$ 14
4	Endosperma de trigo:aleuron a de trigo (90:10)	Nenhuma	0	0	59%	5,64	0,77	115	100%	207 $\pm$ 19	485 $\pm$ 37

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Firmeza do miolo após 1 dia (média ± desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média ± desvio)
4	Endosperma de trigo:aleuron a de trigo (90:10)	ECOP	0,27 mL	36000	59%	5,64	2,04	21	117%	159±14	301±11
5	Endosperma de trigo:aleuron a de trigo (85:15)	Nenhuma	0	0	64%	7,47	0,82	96	100%	293±11	589±66
5	Endosperma de trigo:aleuron a de trigo (85:15)	ECOP	0,27 mL	36000	64%	7,47	2,39	21	114%	188±9	331±12

Tabela 4: Arabinoxilano total (T-AX), arabinoxilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão e teor de humidade do pão de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanase. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo. N. D. = não determinado.

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima <sup>1</sup> (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima <sup>1</sup> (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Teor de humidade do pão
1	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,66	0,68	151	N.D.	N.D.
1	Trigo integral	XBS	0,4 g	16800	67%	6,66	1,40	68		
1	Trigo integral	XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g	3120 + 120000	67%	6,66	1,60	29	N.D.	N.D.
1	Trigo integral	XBS+XPH+P P MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	67%	6,66	1,76	23	N.D.	N.D.
2	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,66	0,68	151	100%	36,8%
2	Trigo integral	XPH	0,4 g	3120	67%	6,66	1,30	44	114%	36,3%
2	Trigo integral	PP MONO + PP 500	0,4 g + 0,1 g	120000 + 19200	67%	6,66	1,56	34	117%	35,1%
2	Trigo integral	XPH+PP MONO+ PP 500	0,4 g + 0,4 g + 0,1 g	3120 + 120000 + 19200	67%	6,66	1,71	23	114%	36,2%
3	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,4	0,64	136	100%	36,8%
3	Trigo integral	TM-XynB	5,6 mL	300	67%	6,4	1,53	19	114%	36,3%



Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima <sup>1</sup> (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima <sup>1</sup> (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão
3	Trigo integral	XPH	0,4 g	3120	67%	6,4	1,46	39	117%	35,1%
3	Trigo integral	Tm-XynB+XPH	5,6 mL + 0,4 g	300 + 3120	67%	6,4	1,72	14	114%	36,2%
4	Trigo integral	Nenhuma	0	0	67%	6,4	0,64	136	100%	N.D.
4	Trigo integral	Tm-XynB	5,6 mL	300	67%	6,4	1,53	19	105%	N.D.
4	Trigo integral	XBS+XPH	0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120	67%	6,4	1,54	31	118%	N.D.
4	Trigo integral	Tm-XynB+XBS+XPH	5,6 mL + 0,4 g + 0,4 g	300 + 16800 + 3120	67%	6,4	1,85	13	115%	N.D.
5	Trigo integral	Nenhuma	0		67%	6,4	0,72	128	100%	37,2%
5	Trigo integral	Tm-XynA+XBS+XPH	5,6 mL + 0,4 g + 0,4 g		67%	6,4	1,75	24	128%	35,7%
5	Trigo integral	Tm-XynB+XBS+XPH+PP MONO	5,6 mL + 0,4 g + 0,4 g + 0,2 g		67%	6,4	1,91	11	132%	36,1%
5	Trigo integral	Tm-XynA+XBS+XPH+PP MONO	5,6 mL + 0,4 g + 0,4 g + 0,2 g		67%	6,4	2,00	17	132%	36,5%

<sup>1</sup> Na mesma ordem de aparecimento que na coluna "Enzima"

Tabela 5: Arabinoxilano total (T-AX), arabinoxilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão e teor de humidade do pão de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanas. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo. N.D.= não determinado.

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima <sup>1</sup> (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima <sup>1</sup> (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farina (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Teor de humidade do pão
1	Endosperma de trigo:farel o de centeio (85:15)	Nenhuma	0	0	67%	4,93	0,73	128	100%	36,3%
1	Endosperma de trigo:farel o de centeio (85:15)	ECOP	0,4 mL	52800	67%	4,93	2,11	30	109%	35,4%
1	Endosperma de trigo:farel o de centeio (85:15)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	67%	4,93	1,83	35	110%	35,5%

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima <sup>1</sup> (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima <sup>1</sup> (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão
2	Endosperma de trigo:farelo de centeio (80:20)	Nenhuma	0	0	69%	7,07	1,05	140	100%	37,0%
2	Endosperma de trigo:farelo de centeio (80:20)	ECOP	0,4 mL	52800	69%	7,07	2,42	30	111%	37,0%
2	Endosperma de trigo:farelo de centeio (80:20)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	69%	7,07	2,00	34	111%	37,0%
3	Endosperma de trigo:aleurona de centeio (85:15)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000		N.D.	2,23	35	N.D.	33,3%

<sup>1</sup> Na mesma ordem de aparecimento que na coluna "Enzima"

Tabela 6: Arabinoxilano total (T-AX), arabinoxilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão, teor de humidade do pão, firmeza do miolo após 1 e 7 dias de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanases. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo.

Exp. N°	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio padrão)
1	Endospermas de centeio: endospermas de trigo (70:30)	Nenhuma	0	0	83%	5,28	2,36	295	100%	45,4%	N.D.	N.D.
1	Endospermas de centeio: endospermas de trigo (70:30)	XBS	0,12 g	5040	83%	5,28	2,64	214	110%	41,7%	N.D.	N.D.
1	Endospermas de centeio: endospermas de trigo (70:30)	XAA	0,5 mL	3000	83%	5,28	2,74	45	114%	41,0%	N.D.	N.D.

Exp. N°	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio padrão)
2	Endospermas de centeio: endospermas de trigo (70:30)	Nenhuma	0	0	83%	5,27	2,33	202	100%	36,9%	1218 $\pm$ 48	1740 $\pm$ 125
2	Endospermas de centeio: endospermas de trigo (70:30)	ECOP	0,27 mL	34000	83%	5,27	3,05	45	117%	36,2%	900 $\pm$ 76	2519 $\pm$ 516

Tabela 7: Arabinoxilano total (T-AX), arabinoxilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão, teor de humidade do pão, firmeza do miolo após 1 e 7 dias de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanas. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo.

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio padrão)
1	Endospermas de trigo: endospermas de centeio 1150 (70:30)	Nenhuma	0	0	68%	4,19	1,38	283	100%	36,1%	564 $\pm$ 80	1096 $\pm$ 131
1	Endospermas de trigo: endospermas de centeio 1150 (70:30)	XBS+XAA	0,2 g + 0,4 mL	8400+2400	68%	4,19	2,17	41	123%	35,9%	451 $\pm$ 31	690 $\pm$ 42

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio padrão)
1	Endospermas de trigo: endospermas de centeio 1150 (70:30)	XPH+XAA	0,2 g + 0,4 mL	1560+2400	68%	4,19	2,17	41	126%	35,6%	392 $\pm$ 38	673 $\pm$ 53
1	Endospermas de trigo: endospermas de centeio 1150 (70:30)	Tm-XynB	5,6 mL	300	68%	4,19	2,17	41	101%	36,9%	487 $\pm$ 48	932 $\pm$ 119
2	Endospermas de trigo: centeio 1740 (75:25)	Nenhuma	0	0	64%	3,55	1,20	206	N.D.	34,0%	N.D.	N.D.

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio padrão)
2	Endospermas de trigo:centeio 1740 (75:25)	XBS + PP MONO	0,4 + 0,8 g	16800 + 240000	64%	3,55	2,09	26	N.D.	34,4%	N.D.	N.D.
2	Endospermas de trigo:centeio 1740 (75:25)	XPH + PP MONO	0,4 + 0,8 g	3120 + 240000	64%	3,55	2,07	23	N.D.	35,2%	N.D.	N.D.
2	Endospermas de trigo:centeio 1740 (75:25)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	64%	3,55	2,08	29	N.D.	35,4%	N.D.	N.D.
3	Endospermas de trigo	Nenhuma	0	0	60%	2,24	0,74	120	100%	34,3%	134 $\pm$ 7	337 $\pm$ 15
3	Endospermas de trigo:centeio 1740 (75:25)	ECOP	0,4 mL	52800	64%	3,35	2,05	27	106%	34,1%	99 $\pm$ 4	237 $\pm$ 16



Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média ± desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média ± desvio padrão)
3	Endospermas de trigo:centeio 1740 (75:25)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	64%	3,35	2,01	31	105%	33,4%	100±4	270±19
3	Endospermas de trigo:endospermas de centeio: 1740:farelo de centeio (80:10:10)	ECOP	0,4 mL	52800	63%	4,5	2,07	29	99%	34,7%	115±9	247±9
3	Endospermas de trigo:endospermas de centeio: 1740:farelo de centeio (80:10:10)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	63%	4,5	1,91	32	100%	33,7%	107±5	264±21

Número de Exp.	Farinha de	Enzima	Dose de enzima (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farina (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controle sem enzima)	Teor de humidade do pão	Firmeza do miolo após 1 dia (média $\pm$ desvio padrão)	Firmeza do miolo após 7 dias (média $\pm$ desvio padrão)
3	Endospermas de trigo: endospermas de centeio: 1740: farelo de centeio (75:15:10)	EOOP	0,4 mL	52800	64%	4,75	2,22	26	99%	34,0%	105 $\pm$ 3	238 $\pm$ 14
3	Endospermas de trigo: endospermas de centeio: 1740: farelo de centeio (75:15:10)	XBS + XPH + PP MONO	0,4 g + 0,4 g + 0,4 g	16800 + 3120 + 120000	64%	4,76	1,98	33	98%	34,7%	121 $\pm$ 8	254 $\pm$ 19

1 Pela mesma ordem de aparecimento que na coluna "Enzima"

2 Na experiência 1 o controle é pão sem enzima, na experiência 3 o controle é o pão de 100% de endospermas de trigo

Tabela 8: Arabinoxilano total (T-AX), arabinoxilano solúvel em água (S-AX) e grau de polimerização médio (avDP) de S-AX, volume do pão e teor de humidade do pão de uma série de pães preparados com ou sem adição de endoxilanase e/ou adição de AXOS. Os pães com o mesmo número de experiência foram tratados em paralelo.

Número de Exp.	Farinha de	Preparação AXOS (g por kg de farinha)	Enzima	Dose de enzima <sup>1</sup> (g ou mL por kg de farinha)	Dose de enzima <sup>1</sup> (unidades por kg de farinha)	Proporção de água/farinha (p/p)	T-AX (g/100 g de DM)	S-AX (g/100 g de DM)	avDP de S-AX	Volume do pão (relativo ao controlo sem enzima)	Teor de humidade do pão
1	Endosperma de trigo	0	Nenhuma	0	0	59%	2,16	0,84	211	100%	32,6%
1	Endosperma de trigo	0	ECOP	0,4 mL	52800	59%	2,16	1,69	24	112%	32,6%
1	Endosperma de trigo	10	ECOP	0,4 mL	52800	59%	2,16	2,19	18	113%	32,1%

### REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar num produto cozido no forno o nível de arabinoxilanos solúveis em água, após cozedura no forno com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25, caracterizado pelo fato de compreender o referido método os passos de:
- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com farinha ou uma mistura de farinhas tendo um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,5% (p/p, % do peso seco), e
  - Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno.
2. Método para aumentar num produto cozido no forno o nível de arabinoxilanos solúveis em água, após cozedura no forno com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25, caracterizado pelo fato de compreender o referido método os passos de:
- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com uma mistura de uma ou mais fracções de moagem compreendendo, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos, 50%, de um modo mais preferido pelo menos 60%, ainda de um modo mais preferido, pelo menos, 70% de farinha derivada de trigo, tendo a referida mistura um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,5% (p/p, % do peso seco), e
  - Adição à referida massa de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do

volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de a massa é preparada com uma mistura de uma ou mais fracções de moagem, tendo a referida mistura um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2% (p/p, % do peso seco) e, em que além da referida preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanase termófila é ainda adicionada, pelo menos, uma endoxilanase altamente selectiva para WU-AX à referida massa.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de a referida quantidade é uma quantidade suficiente para proporcionar no referido produto cozido no forno, após cozedura no forno, um nível dos referidos arabinoxilanos solúveis em água de, pelo menos, 1,56 g/100 g de matéria seca até 7 g/100 g de matéria seca.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de a referida quantidade é uma quantidade suficiente para proporcionar, no referido produto cozido no forno, após cozedura no forno, um nível dos referidos arabinoxilanos solúveis em água de, pelo menos, 1,7 g/100 g de matéria seca até 7 g/100 g de matéria seca.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de em que a referida quantidade é uma quantidade suficiente para proporcionar, no referido produto cozido no forno, após cozedura no forno, um nível dos referidos arabinoxilanos solúveis em água de, pelo menos, 1,8, de um modo preferido 1,9, de um modo mais preferido 2,0 g/100 g de matéria seca até 7 g/100 g de matéria seca.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de a referida endoxilanase é uma endoxilanase termófila de *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus aculeatus*, *Thermomyces*

*lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*, de um modo mais preferido, uma endoxilânase termófila de *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*.

- 5 8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser adicionada à referida massa, pelo menos uma, endoxilânase altamente selectiva para WU-AX.
- 10 9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de ser adicionada à referida massa, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanases e celulasas.
- 15 10. Método, de acordo com qualquer das uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de a referida farinha é farinha de endospermas de trigo, farinha de trigo integral ou uma mistura de farinha de trigo integral e farinha de endospermas de trigo.
- 20 11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizado pelo fato de a referida mistura de uma ou mais fracções de moagem compreende ainda farelo a um nível inferior a 25% (p/p).
- 25 12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizado pelo fato de a referida mistura de uma ou mais fracções de moagem compreende, ainda, farelo a um nível inferior a 20% (p/p).
- 30 13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12, caracterizado pelo fato de o referido farelo é seleccionado do grupo consistindo em farelo de trigo enriquecido em aleurona, farelo de centeio enriquecido em aleurona, farelo de centeio, farelo de trigo, farelo de cevada, farelo de milho e/ou farelo de arroz, de um modo preferido do grupo consistindo em trigo, farelo de trigo
- 35 enriquecido em aleurona, farelo de centeio enriquecido em aleurona e/ou farelo de centeio.
14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

de 1 a 13, caracterizado pelo fato de a referida mistura de uma ou mais fracções de moagem compreende, ainda, farinha derivada de centeio a um nível inferior a 50% (p/p), de um modo preferido inferior a 40% (p/p), ainda  
5 de um modo mais preferido inferior a 30% (p/p).

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de a referida farinha derivada de centeio é farinha de endospermas de centeio, farinha de centeio integral ou uma mistura de farinha de centeio  
10 integral e farinha de endospermas de centeio.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de a referida massa é adicionalmente suplementada com um ingrediente compreendendo arabinoxilano solúvel em água com um grau  
15 de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25.

17. Método para aumentar num produto cozido no forno o nível de arabinoxilanos solúveis em água, após cozedura  
20 no forno, com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25, para um nível acima de 1,56 g/100 g de matéria seca, acima de 1,7 g/100 g de matéria seca, acima de 1,75 g/100 g de matéria seca, de  
25 um modo preferido, para um nível de, pelo menos, 1,9 g/100 g de matéria seca, caracterizado pelo fato de compreender o referido método os passos de:

- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com uma mistura de uma ou mais fracções de moagem  
30 compreendendo, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos, 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, for 60%, ainda de um modo mais preferido, pelo menos, 70% de farinha derivada de trigo,

- Adição à referida massa de uma preparação enzimática  
35 compreendendo, pelo menos, uma endoxilase, numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes

maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido pela adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno, bem como um ingrediente compreendendo, pelo menos, 8% (p/p%, do teor total) de arabinosilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de a referida endoxilânase é uma endoxilânase termófila, de um modo preferido é uma endoxilânase termófila de *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus aculeatus*, *Thermomyces lanuginosus*, e/ou *Thermotoga maritima*, de um modo mais preferido é uma endoxilânase termófila de *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e/ou *Thermotoga maritima*.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 18, caracterizado pelo fato de ser adicionada à referida massa, pelo menos, uma endoxilânase altamente selectiva para WU-AX.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19, caracterizado pelo fato de ser adicionada à referida massa, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloil esterases, beta-glucanases e celulasas.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 20, caracterizado pelo fato de a mistura de fracções de moagem é conforme definida na reivindicação 2 ou conforme definida nas reivindicações 11 a 15.

22. Produto cozido no forno, com um nível de pelo menos, 1,56 g/100g de matéria seca, caracterizado pelo fato de de um modo preferido, pelo menos, 1,7 g/100 g de matéria seca, de um modo mais preferido, pelo menos, 1,75 g/100 g de matéria seca e até 7 g/100 g de matéria seca de arabinosilanos solúveis em água tendo um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo



preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, podendo o referido produto ser conforme definido por qualquer uma das reivindicações de 1 a 22.

23. Composição adequada para a preparação de um produto cozido no forno, conforme definida na reivindicação 22, caracterizado pelo fato de compreender a referida composição, pelo menos, uma endoxilanase termófila, compreendendo ainda, pelo menos, um, de um modo preferido, pelo menos, 2 ingredientes seleccionados do grupo consistindo em glúten, amido, aditivos, tais como emulsionantes (e. g. monoglicéridos, diglicéridos, ésteres do ácido diacetil tartárico de monoglicéridos (DATEM), lactilatos de estearoílo, lecitina e semelhantes), enzimas (e. g. xilanases, alfa-amilases, lipases, oxido redutases, proteases), compostos redutores (e. g. cisteína), compostos oxidantes (e. g. ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato), hidrocolóides e prebióticos (e. g. galactooligossacáridos, arabinooligossacáridos, xilooligossacáridos, frutooligossacáridos, inulina, amido resistente, dextrinas resistentes,...).

24. Composição, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de ser uma composição de melhorador, líquido ou pó, ou que é uma mistura otimizada pronta a utilizar.

25. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 ou 24, caracterizado pelo fato de compreender ainda, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidasas, metil glucuronidasas, feruloíl esterases, beta-glucanases, celulasas e endoxilanases altamente selectivas para WU-AX.

26. Massa para um produto cozido no forno, caracterizado pelo fato de compreender uma mistura de uma ou mais fracções de moagem compreendendo, pelo menos, 40% (p/p), de um modo preferido, pelo menos, 50%, de um modo mais preferido, pelo menos, 60%, ainda de um modo mais

- preferido, pelo menos, 70% de farinha derivada de trigo, tendo a referida mistura um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0% e de um modo preferido, pelo menos, 2,5% (p/p) e compreendendo a referida massa uma
- 5 quantidade de, pelo menos, uma endoxilanase termófila suficiente para proporcionar, após cozedura no forno, um produto cozido no forno com um nível de arabinoxilanos solúveis em água tendo um grau de polimerização médio na
- 10 gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama entre 5 a 35, de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25, nível esse que é, pelo menos, igual a, de um modo preferido é superior a 1,56 g/100 g de matéria seca, superior a 1,7 g/100 g de matéria seca e até 7 g/100 g de matéria seca.
- 15 27. Massa, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de compreender ainda, pelo menos, uma enzima seleccionada do grupo consistindo em alfa-L-arabinofuranosidases, metil glucuronidases, feruloíl esterases, beta-glucanases, celulasas e endoxilanasas altamente selectivas para WU-AX.
- 20 28. Massa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 ou 27, caracterizado pelo fato de a referida mistura de fracções de moagem é uma conforme definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 15.
- 25 29. Produto cozido no forno, caracterizado pelo fato de ser preparado a partir de uma massa conforme definida em qualquer uma das reivindicações 26 a 28.
- 30 30. Utilização de uma massa, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizado pelo fato de preparar um pão ou de um produto de pastelaria com um nível aumentado de arabinoxilanos solúveis em água tendo um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25.
- 35 31. Produto cozido no forno, caracterizado pelo fato de compreender, pelo menos, uma endoxilanase termófila e produto esse que tem um nível de, pelo menos, 1,56 g/100 g, pelo menos 1,7 g/100 g de matéria seca, e até 7 g/100

g de matéria seca, de arabinosilanos solúveis em água com um DP médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, ainda de um modo mais preferido, na gama de 5 a 25.

- 5 32. Produto cozido no forno, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de a quantidade total do referido arabinosilano solúvel em água é derivada de arabinosilano presente na receita do produto cozido no forno.
- 10 33. Produto cozido no forno, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de a maior parte do referido arabinosilano solúvel em água é derivada de arabinosilano presente na receita do produto cozido no forno.

1/2

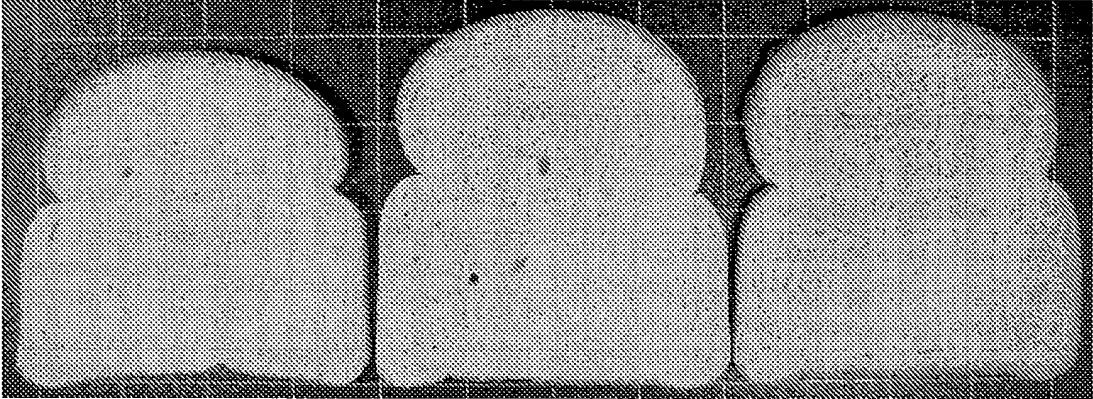


FIG.1

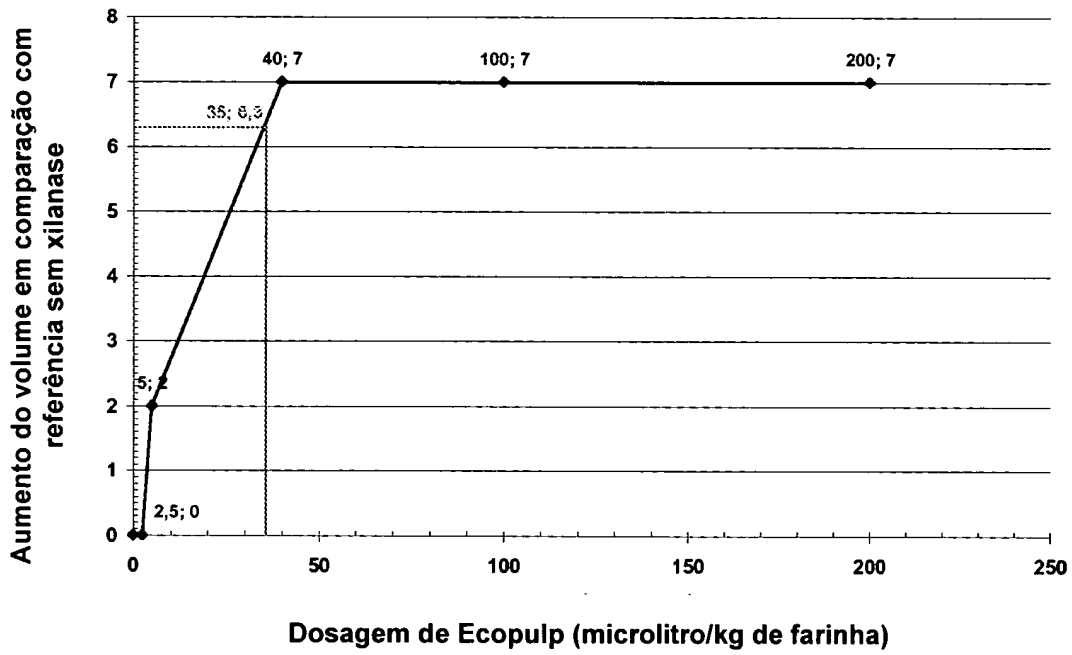


FIG.2A

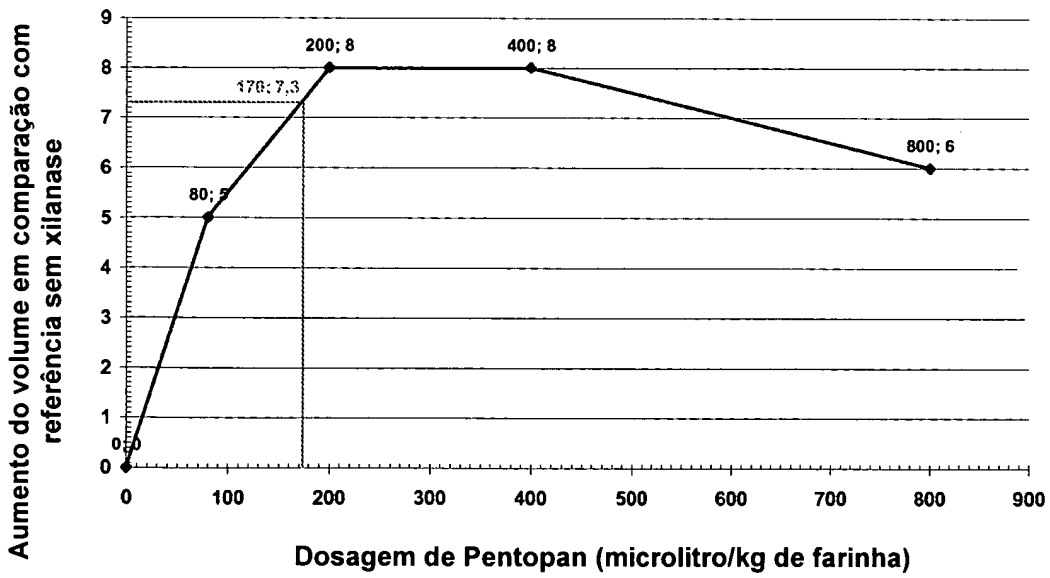


FIG.2B

RESUMO

"MÉTODO PARA AUMENTAR NUM PRODUTO COZIDO NO FORNO O NÍVEL DE ARABINOXILANOS SOLÚVEIS EM ÁGUA, PRODUTO COZIDO NO FORNO, COMPOSIÇÃO ADEQUADA PARA A PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COZIDO NO FORNO, MASSA PARA UM PRODUTO COZIDO NO FORNO E UTILIZAÇÃO DE UMA MASSA".

A presente invenção refere-se a um método para aumentar num produto cozido no forno, após cozedura no forno, o nível de arabinoxilanos solúveis em água com um grau de polimerização médio na gama de 5 a 50, de um modo preferido, na gama de 5 a 35, de um modo mais preferido na gama de 5 a 25, compreendendo o referido método os passos de:- Preparação de uma massa para um produto cozido no forno com farinha, uma mistura de farinhas ou uma mistura de farinha(s) com fracções de moagem tendo um teor total de arabinoxilanos de, pelo menos, 2,0%, de um modo preferido, pelo menos, 2,5%, e - Adição, à referida massa, de uma preparação enzimática compreendendo, pelo menos, uma endoxilanasase termófila numa quantidade, pelo menos, 2 vezes maior, de um modo preferido, pelo menos, 3 a 6 vezes maior ou até 10 vezes maior do que a dose que confere 90% do aumento máximo do volume do pão obtido por adição dessa preparação enzimática à receita do referido produto cozido no forno. Com vantagem com o referido método pode obter-se produtos cozidos no forno que têm um nível de arabinoxilano do tipo desejado de, pelo menos, 1,7%, de um modo mais preferido pelo menos 1,75%, tal como pelo menos 1,8%, 1,9% ou 2,0%. A presente invenção refere-se ainda a produtos cozidos no forno que podem ser obtidos por este método e a um melhorador e uma massa que podem ser utilizados para a preparação desses produtos. Os produtos cozidos no forno de acordo com a invenção, com vantagem, têm benefícios melhorados para saúde.