



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102019025102-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102019025102-6

(22) Data do Depósito: 28/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/06/2021

(51) Classificação Internacional: A23C 19/04.

(52) Classificação CPC: A23C 19/041.

(54) Título: OBTENÇÃO DE COAGULANTE DE LEITE A PARTIR DAS SEMENTES VERDES DE CROTALARIA STIPULARIA (DESV. 1814) (FARBALES: FABACEAE)

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: CAMILA PEREIRA DE LIMA CHICUTA; CLEDSON BARROS DE SOUZA; FRANCIS SOARES GOMES; RAPHAEL DE FARIAS TAVARES; CLÁUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS; HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA; RUTH RUFINO DO NASCIMENTO; LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO; ANDRÉA CARLA DE ALMEIDA BARROS; JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO; ANTONIO THOMÁS DA SILVA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 28/11/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 21/10/2025

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da patente de Invenção para **“Obtenção de coagulante de leite a partir das sementes verdes de *Crotalaria stipularia* (Desv. 1814) (Farbales: Fabaceae)”**

[001] A presente invenção refere-se à obtenção de novo coagulante de leite, a partir de extrato vegetal das sementes verdes da planta *Crotalaria stipularia* (Desv. 1814) (Farbales: Fabaceae). A concretização dessa invenção corresponde ao extrato vegetal aquoso bruto caracterizado por compreender proteínas com atividade coagulante de leite.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPÕE A RESOLVER

[002] Durante o processo de fabricação do queijo, a etapa mais determinante é a coagulação do leite, processo que consiste na transformação do leite no estado líquido para o estado gelatinoso, também conhecido como coalhada. Este processo é decorrente de modificações físico-químicas na caseína, que podem ocorrer por meio de acidificação e, principalmente, por ação enzimática, na qual o fenômeno da coagulação é obtido por meio da adição de enzimas (coalho ou coagulante) ao leite, que especificamente irão desconstruir as cadeias solúveis de caseína, separando-a do soro.

[003] Devido a fatores como o aumento da produtividade, o alto custo do coalho, disponibilidade limitada, requisitos religiosos e, hábitos alimentares, alguns países tem incentivado a disseminação de pesquisas que visem identificar e disseminar a utilização de materiais alternativos destinados à produção de queijo (BEY *et al.*, 2018) a exemplo da tecnologia recombinante com microrganismos e, principalmente, a investigação de peptidases de origem vegetal (MAZORRA-MANZANO, MORENO-HERNÁNDEZ, e RAMÍREZ-SUAREZ, 2018); FARIAS *et al.*, 2019).

[004] Neste contexto, a presente invenção apresenta um novo coagulante de leite, caracterizado por uma mistura enzimática contida no extrato aquoso vegetal obtido das sementes verdes da planta *Crotalaria stipularia*.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[005] A presente invenção destina-se ao uso de coagulante vegetal, de baixo custo, na indústria de fabricação de produtos lácteos, mais especificamente de queijos, em substituição aos coagulantes de origens animal e microbiana.

[006] **ESTADO DA TÉCNICA**

[007] O leite representa um dos suprimentos alimentícios de maior expressão em todo o mundo, estando incluído na cadeia alimentar de praticamente todas as pessoas. Sob uma abordagem biológica, podemos inferir que o leite é uma secreção da glândula mamária de mamíferos, de composição nutricional bastante complexa (SILVA, 2016). Parte de sua importância está associada a composição nutricional que este produto carrega, abrangendo por exemplo, a presença de proteínas, lipídeos e cálcio.]O uso deste alimento na dieta humana vai muito além de seu consumo *in natura*, mas principalmente, por intermédio dos derivados comercializados. Dentre estes destaca-se a produção de queijo, pela alta demanda de consumo. Atualmente estima-se que cerca de 816 milhões de toneladas de leite são produzidas anualmente em todo o mundo e, com uma média de consumo de aproximadamente 116,5 kg por habitante (SIQUEIRA, 2019).

[008] No Brasil a produção de leite cresceu 271% entre os anos de 1974 e 2017, de maneira que o país que antes ocupava a 10^a posição no ranking de produção passou a ser o 4^o maior produtor de leite no mundo (SIQUEIRA, 2019). De acordo com o autor, essa produtividade está fragmentada em diferentes segmentos comerciais, entretanto, majoritariamente a comercialização do leite longa vida e produção de queijos detêm mais de 50% de toda cadeia produtiva.

[009] A preparação enzimática mais conhecida utilizada pelo setor lácteo é o coalho (ou renina) nome atribuído às preparações comerciais contendo proteases ácidas extraídas de tecidos animais (BRASIL, 2011). A denominação coalho foi atribuída inicialmente às enzimas obtidas do quarto estômago de ruminantes, onde são encontradas duas enzimas mais participativas: a quimosina e a pepsina, que alteram seu percentual conforme a idade do

animal. Inicialmente, quando os ruminantes ainda estão em período de amamentação, a enzima quimosina se mostra com maior taxa de expressão proteica, mas após o desmame, tem sua produção reduzida, passando a pepsina a ser o componente mais atuante (BRASIL, 2011).

[010] Durante a atividade proteolítica do coalho, as enzimas ativas exercem a sua hidrólise nas micelas de caseína e, em menor proporção, em demais proteínas presentes na solução. Inicialmente, as proteases existentes no coalho clivam a k-caseína numa região específica da molécula (ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina e metionina) de modo que a estrutura nativa da proteína é desfeita, levando como consequência a sua menor solubilidade (BADGUJAR, MAHAJAN, 2014). Portanto, a coagulação do leite corresponde à formação de um coágulo firme (insolúvel), obtido através de modificações físico-químicas das micelas de caseína, em tempo determinado (FERNANDES, 2019).

[011] Devido a fatores como a disponibilidade limitada, o alto custo do coalho, requisitos religiosos e, hábitos alimentares, alguns países têm influenciado a propagação de estudos biotecnológicos que visem identificar e disseminar a utilização de materiais alternativos destinados à produção de queijo (BEY *et al.*, 2018). Como ferramentas inovadoras, destacam-se a implementação de tecnologia recombinante com microrganismos e a investigação de peptidases de origem vegetal para o emprego na coagulação do leite.

[012] Além dos benefícios supracitados, a implementação de coagulantes de origem vegetal também imprime ao processo industrial uma maior produtividade, utilização de uma metodologia de baixo custo, possibilidade de produção em escala e fácil extração e purificação do coagulante.

[013] Exemplos de documentos de patentes associados aos coagulantes vegetais estão documentados em: BR 102013029865-4 A2, o qual, explica o processo de obtenção de um coagulante alternativo de leite a partir de cascas de frutos verdes de Achachairu (*Garcinia humilis Vahl*); ES2117958 A1, que registra um coagulante para leite através do extrato das flores secas da planta

Cynara cardunculus; o documento ES2166719 A1, que relata o uso de um coagulante vegetal concentrado em pó a base de enzimas provenientes de flores de cardo *Cynara*; ES2535785 A1 que relata um método para elaboração de um produto lácteo usando o leite adicionado de um coagulante de origem vegetal do extrato de alcachofra (*Cynara scolymus*), BR 102017025174-8 A2 que apresenta a obtenção de queijo tipo Quark mediante o uso de coagulante vegetal e BR 102017001264-6 A2 que descreve a aplicação de peptidases de pericarpo dos frutos de *Morinda citrifolia* L como coagulante de leite.

[014] No que diz respeito ao modelo vegetal escolhido para esse invento, tem-se que a *C. stipularia* constitui-se de um seletor gênero da família Leguminosae, com cerca de 690 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no Hemisfério Sul, sendo mais rico na África e na Índia (LEWIS, *et al.*, 2005). Em relação a sua utilidade agroecológica, diversos são os usos citados para suas espécies, como: adubo orgânico; forragem; no combate a nematoides; em programas de revegetação de áreas contaminadas com substâncias tóxicas (como arsênio empregado na indústria têxtil); na produção de fibras para confecção de papel; na medicina popular e em atividades farmacológicas (BURKART, 1952; POLHIL, 1982; MORRIS, 1997; MEDA e FURLANI, 2005; NERENDER *et al.*, 2005; AHMED *et al.*, 2006-a; AHMED *et al.*, 2006-b; SILVA *et al.*, 2007; GARRIDO *et al.*, 2008; FELIPE *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009).

[015] Ainda neste contexto biotecnológico, destaca-se a patente BR 10 2019 0174757, que descreve preparações com atividade inseticida contra insetos adultos do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae).

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[016] A presente invenção descreve a obtenção de novo coagulante de leite, constituído por uma mistura enzimática presente em extrato vegetal aquoso das sementes verdes da planta *Crotalaria stipularia*.

[017] A composição da invenção pode incluir um ou mais aditivos para melhorar a atividade coagulante das proteases existentes nas sementes da planta, a exemplo da incorporação de mecanismos imobilizadores, emprego de diferentes soluções tampão e, utilização de coenzimas e/ou cofatores e sais como forma de potencializar a processabilidade catalítica, bem como assegurar maior estabilidade às enzimas.

[018] Outro aditivo incorporado a esta invenção é a possibilidade do material enzimático ser utilizado de forma enriquecida, por meio de metodologias de fracionamento proteico, bem como à sua aplicação na forma isolada (purificada).

[019] A composição da invenção pode incluir também a implementação de técnicas de dialise, como forma de proporcionar, ao produto de coagulação, características sensoriais diversificadas, das obtidas com o extrato *in natura*

[020] O extrato enzimático pode ainda ser liofilizado, armazenado protegido da iluminação sob refrigeração, preferencialmente na faixa de temperatura de 2 °C-6 °C, para uso posterior na coagulação, ou a produção do coagulante vegetal em atendimento a demanda de mercado.

[021] Assim, as etapas a seguir são referentes a experimentos realizados para a obtenção do extrato enzimático e os procedimentos investigativos de sua ação coagulante.

Identificação da Espécie *C. stipularia*.

[022] Após obtenção das sementes necessárias para a realização dos experimentos preliminares, coletou-se uma amostra da espécie vegetal para identificação e deposição de exemplar no repositório do Herbário MAC do Instituto de Meio Ambiente (IMA) do estado de Alagoas. A planta selecionada apresentava em sua estrutura todos os requisitos necessários para a devida identificação (folhas, flores, caules e vagens). Com número de tombamento 64102.

Obtenção das Sementes da *C. stipularia*

[023] As sementes foram extraídas das leguminosas *C. stipularia* encontradas no Povoado Saco, localizado na zona rural da cidade de Marechal Deodoro/AL (09° 42' 37" S 35° 53' 42" W). Após coleta, o material foi armazenado em sacos lacrados e levado ao Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP), da Universidade Federal de Alagoas- UFAL, para realização dos procedimentos experimentais.

Preparo do extrato bruto (EB) com as sementes em diferentes estágios de maturação

[024] Para o preparo do EB foram retiradas as sementes em diferentes estágios de maturação, as quais foram pesadas em balança analítica (Marte AY220) (0,789 g) e trituradas em tampão de extração (TE) Tri- HCl 50 mM pH 8,0 (20 mL). Para esse procedimento foi tomado como instrumento auxiliar um homogeneizador de tecidos (HOMOMIX, Ser. No.: 175315) durante 5 min em alta rotação a 4 °C, para possibilitar uma maior integridade estrutural das proteínas extraídas.

[025] Em seguida, a solução foi mantida sob agitação constante por 180 min, para maior efetividade na extração das moléculas. Ao término do procedimento foi observada a presença de material particulado de granulometria heterogênea, necessitando com isso de uma centrifugação auxiliar, para que as partículas insolúveis fossem precipitadas e, o sobrenadante empregado nas demais análises experimentais.

Efeito da sazonalidade na atividade enzimática do EB obtido a partir das sementes de *C. stipularia*.

[026] Inicialmente, como modo de confirmação da presença de proteases séricas no EB, realizou-se um ensaio enzimático com o substrato sintético BApNA na concentração de 500 µM. Para interromper a reação, utilizou-se a adição de ácido cítrico 20%(v/v) na razão de 1:1 (v/v). Para o cálculo de atividade foi tomado a seguinte equação: $U = (A_{410}/\text{min}) \times 10^9 \times (1/8800 \times \text{mL})$, $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é o coeficiente de extinção molar do BApNA a 410 nm. Em seguida, para avaliar o efeito da sazonalidade sobre a taxa de hidrólise do

substrato BApNA, realizou-se um procedimento experimental de forma a comparar as sementes da *C. stipularia* em diferentes estágios de maturação, as quais foram esquematicamente identificadas como sementes verdes (SV) e sementes secas (SS).

Teste de coagulação de leite desnatado.

[027] A verificação da atividade coagulante utilizando a solução do extrato enzimático, das sementes de *C. stipularia*, foi analisada por meio do tempo necessário para coagular uma solução reconstituída de leite bovino em pó desnatado e, como controles de reação foram tomadas alíquotas equivalentes do TE. Essa metodologia foi adaptada de Arima *et al.* (1970) realizado com o leite em pó desnatado, incorporado em 10% em uma solução de água destilada, contendo 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2). A solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C) e seu pH ajustado para 6,5.

[028] Para o teste de coagulação foram tomadas alíquotas da preparação do leite (1,0 mL) distribuídas por triplicatas em tubos eppendorfs, os quais foram mantidos em banho maria por um período de 10 min a 37 °C. Posteriormente adicionou-se a solução enzimática (200 µL de EB 1,07 mg/mL) onde foi monitorado o exato instante em que ocorria toda a coagulação do leite.

[029] O cálculo da unidade de atividade foi mensurado a partir da quantidade de enzima capaz de coagular 10 mL do substrato em 40 min (2400 s) a 37 °C, conforme equação MCA (U/mL) = $[(2400 \times V)/t] \times v$. Em que “V” é o volume do leite (mL); “t” o tempo de coagulação em segundos e “v” o volume de extrato enzimático aplicado (mL).

Determinação da temperatura ótima no processo de coagulação do leite.

[030] Com a pretensão de verificarmos a temperatura em que ocorre a maior taxa de coagulação do leite, foi realizado um ensaio em diferentes temperaturas. Para tanto, foram tomadas alíquotas da preparação do substrato (1,0 mL) distribuídas por triplicatas em tubos eppendorfs, os quais foram mantidos em banho maria por um período de 10 min a 37 e 50 °C. Posteriormente adicionou-se a solução enzimática (200 µL de EB) onde foi

determinado a temperatura ótima de reação pelo menor tempo necessário para a obtenção do coágulo.

[031] O cálculo da unidade de atividade foi mensurado a partir da quantidade de enzima capaz de coagular 10 mL do substrato em 40 min (2400 s) nas respectivas temperaturas, conforme equação citada no item anterior.

Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite.

[032] Enzimas de origem polipeptídica podem sofrer alterações de suas estruturas terciárias mediante a ação de alguns fatores, dos quais destacamos nesse invento a mudança brusca na temperatura. Frente a isso, decidimos reproduzir a análise para o ensaio de coagulação do leite, em que o EB foi submetido a aquecimento por 15 min a 100 °C, com o objetivo de desconstruir o ordenamento tridimensional das serino proteases e, desta feita, inativar a sua ação (desnaturar). Como controle positivo, utilizou-se o EB não aquecido e, desta feita, comparado a atividade coagulante de forma separada. A reação se processou até que fosse possível visualizar a formação do coágulo.

Teste de coagulação de leite integral pasteurizado.

[033] As mesmas condições do experimento realizado com leite bovino em pó desnatado foram reproduzidas com amostras de leite integral bovino pasteurizado, em que o pH da solução foi ajustada para 6,5 e, adicionado cloreto de cálcio à concentração de 50 mM. As amostras foram incubadas em 50 °C e a atividade detectada através da visualização do coágulo formado.

RESULTADOS OBTIDOS

Obtenção das Sementes de *C. stipularia*, preparo do EB e verificação de atividade sazonal.

[034] Inicialmente, a espécie foi submetida à identificação taxonômica e, conforme análise realizada, pôde-se classificar a planta na família Fabaceae e, espécie catalogada como *Crotalaria stipularia*. Posteriormente, com a certificação taxonômica do vegetal, realizou-se a preparação do extrato bruto, seguido de teste enzimático com o substrato BApNA, específico para a enzima tripsina. Em virtude de a análise ter sido realizada com um cromóforo sintético

específico, foi possível confirmar que a classe da protease existente no material era da família das serino proteases semelhantes a tripsina, endopeptidases que conservam em seu sítio catalítico a presença dos aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina.

[035] Além disso, vislumbrando uma análise sazonal da atividade enzimática nas sementes em estágios diferentes de maturação, realizou-se um estudo comparativo da hidrólise do BApNA, conforme especificado na Figura 1.

[036] Observou-se, de modo detalhado, que a taxa de hidrólise do substrato foi expressivamente maior com as sementes no estágio inicial de maturação, possibilitando uma maior rentabilidade do processo, uma vez que conhecemos a máxima potencialidade do extrato enzimático usado nesta invenção foi determinada.

Teste de coagulação do leite desnatado.

[037] Os resultados obtidos mostraram que o extrato enzimático obtido a partir das sementes verdes de *C. stipularia* apresentou ação positiva para o fim proposto, no tocante a capacidade coagulante do material, frente à proteína do leite bovino em pó desnatado, correspondendo a uma atividade específica (unidade de coagulação por miligrama de extrato enzimático) mensurada em 74 mU.

[038] Os ensaios realizados em “R1”, “R2” e “R3” revelam que a preparação do leite bovino em pó foi altamente susceptível a ação das serino proteases, ao passo que em “B”, representando o controle da reação, não houve mudança constitutiva do substrato (Figura 2).

[039] Desta feita, observou-se que o método de extração das proteases séricas com o tampão Tris-HCl é altamente compatível com a aplicação defendida no invento, visto que não ocasionou alterações nas características físico químicas do leite. Portanto, a coagulação visualizada no experimento reporta inteiramente a atividade hidrolítica do extrato das sementes verdes da planta *C. stipularia*.

[040] Após validação do método e, quantificação da menor concentração de EB (0,089 mg/mL) necessária para alcançar a máxima coagulação do leite contida em 1 mL de solução, foi efetuada uma análise para obtenção de uma curva de tempo do ensaio, conforme ilustrado na Figura 3.

[041] Com relação à análise, podemos verificar que em 240 min foi possível visualizar a formação do coágulo em grandes proporções e, em 300 min, a caseína foi processada em sua totalidade. Observamos também que mesmo em maiores períodos de incubação (420 min) a massa de coágulo formada não apresentou diferença significativa, quando comparada com o período de 300 min (análises estatísticas determinadas por GraphPad Prism).

Temperatura ótima no processo de coagulação do leite

[042] À medida que a temperatura do sistema é alternada, boa parte dos catalisadores biológicos apresentam mecanismos de hidrólise diferenciados. Em se tratando das serino proteases, vemos que estas enzimas assumem estabilidade clássica, quando impostas a condições de reação à temperatura moderadamente elevada. Assim, avaliou-se a atividade coagulante do EB a 37 e 50 °C. (Figura 4).

[043] A atividade catalítica do material mostrou-se mais pronunciada a 50 °C (94 mU), antecipando a reação em 120 min, quando comparado com a coagulação alcançada a 37 °C. O mesmo comportamento foi reportado na patente BR 102018002232-6 A2, o qual revelou maior ação coagulante de seu material em 45-50°C. Resultados semelhantes foram constatados por Kumari, Sharma e Jagannadham (2012) que, mediante ensaio de coagulação do leite, reportaram atividade ótima de uma serino protease isolada da planta *Ficus religiosa* em 50 °C.

[044] É importante destacar que nesta invenção, o tempo de reação considerado foi associado à coagulação completa de todo o substrato e, não necessariamente, ao instante inicial em que os coágulos eram formados.

[045] Esse tipo de detecção foi tomado como referência para os cálculos de atividade, em virtude da obtenção da ação coagulante com o extrato vegetal a

partir de mínimas concentrações proteicas (0.089 mg/mL de enzima) revelando importante característica do catalisador biológico, que é a sua alta especificidade pela proteína do leite bovino desnatado.

[046] Vale ressaltar que após aquecimento a 100 °C, a atividade coagulante do EB foi reduzida em 100%, o que mostra que a atividade do coagulante objeto deste pedido de patente está diretamente vinculada a ação das proteases contidas no material vegetal e, não necessariamente, a participação dos metabólitos secundários, visto que ao ser aquecida, a enzima perde a sua estrutura nativa, interferindo diretamente a ação catalítica (dado não mostrado).

Teste de coagulação de leite integral pasteurizado

[047] Uma vez que a participação direta das serino proteases na coagulação do leite desnatado foi confirmada, realizou-se um ensaio equivalente com leite integral bovino pasteurizado, conforme apresentado na Figura 5.

[048] Os resultados obtidos nos testes de coagulação (Figura 5) demonstraram que a preparação do leite integral bovino foi altamente susceptível a ação das serino proteases R1, R2 e R3, ao passo que em “B”, representando o controle da reação, não houve mudança constitutiva do substrato. Esse tipo de análise revela importante característica para metodologia proposta, uma vez que, se adequa às reais condições de produção de queijo, que utilizam esse tipo de material durante a sua fabricação.

[049] Desta forma, verificou-se que o extrato enzimático foi altamente efetivo em processar o substrato. Além disso, sob o aspecto da eficiência catalítica, observou-se uma atividade coagulante específica de 22.472 mU, equivalente a 239 maior unidade de coagulação, quando comparado com o processamento do leite desnatado.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[050] **Figura 1:** Atividade hidrolítica do extrato da *C. stipularia*, efeito da sazonalidade na hidrólise do substrato BApNA: Os extratos brutos das sementes verdes (SV) e secas (SS) foram preparados na mesma razão (m/v) e, em seguida submetidos ao ensaio enzimático com o substrato BApNA.

[051] **Figura 2:** Ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: “R1”, “R2” e “R3” representam análises em triplicata da coagulação do leite bovino em pó desnatado. “B” representa o controle negativo, em que fora adicionado o tampão Tris-HCl ao leite reconstituído.

[052] **Figura 3:** Curva de tempo da ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: Ambas as análises foram realizadas em triplicata e, a reação processada a 37 °C.

[053] **Figura 4:** Temperatura ótima da ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: “B37°” representa o controle negativo incubado a 37 °C; “R37°” correspondem as análises em triplicata da coagulação do leite reconstituído. “B50°” refere-se ao controle negativo incubado a 50 °C, ao passo que “R50°” representam as reações em triplicada da atividade coagulante do extrato enzimático das sementes de *C. stipularia* a 50 °C.

[054] **Figura 5:** Ação coagulante do extrato das sementes verdes de *C. stipularia*: “R1”, “R2” e “R3” representam análises em triplicata da coagulação do leite integral bovino pasteurizado. “B” representa o controle negativo, em que fora adicionado o tampão Tris-HCl ao leite.

VANTAGENS DA PATENTE

[055] A forte demanda no consumo de derivados do leite, a busca por fontes alternativas de material coagulante tem crescido de forma bem acentuada, principalmente aqueles de origem vegetal, com na finalidade de alavancar a produtividade e minimizar o seu custo de produção. Diante das considerações apresentadas, no tocante a propagação alternativa de tecnologia enzimática, utilizando extrato vegetal na coagulação do leite, a presente invenção apresenta algumas vantagens, das quais se destacam:

[056] A utilização de ensaio enzimático com substrato conjugado, como forma de detectar o material com maior atividade proteolítica (sementes verdes) que favoreceu a otimização do processo de coagulação, atrelado ao maior rendimento de hidrólise.

[057] A metodologia de extração das proteases séricas foi inteiramente compatível com a aplicação biotecnológica sugerida, uma vez que o tampão de extração utilizado na preparação do extrato enzimático não modificou os parâmetros constituintes do leite.

[058] A mistura de enzima pertencente à família das serino proteases foi obtida do extrato de sementes verdes de *C. stipularia*, a qual apresentou excelente atividade coagulante do leite bovino desnatado e integral, quando submetidas à incubação a 50 °C.

[059] A implementação deste invento possibilita uma maior diversificação da biotecnologia brasileira, uma vez que utiliza um recurso natural, agregando valor de forma sustentável à biomassa gerada pela espécie estudada.

[060] A invenção defendida é aplicável na área de Biotecnologia, especificamente na indústria de produtos lácteos, apresentando-se como nova proposta de coagulante vegetal, em substituição ao método tradicional de coagulação do leite, podendo inclusive, influenciar os segmentos do agronegócio.

REIVINDICAÇÕES

1. Obtenção de coagulante de leite a partir das sementes verdes de *Crotalaria stipularia* (Desv. 1814) (Farbales: Fabaceae), **caracterizado por** compreender o extrato das sementes verdes da planta *Crotalaria stipularia*, com a adição de solução tampão de Tris-HCl 50 mM às sementes verdes trituradas de *C. stipularia* (0,789g de semente para 20 mL de solução).

DESENHOS

Figura 1

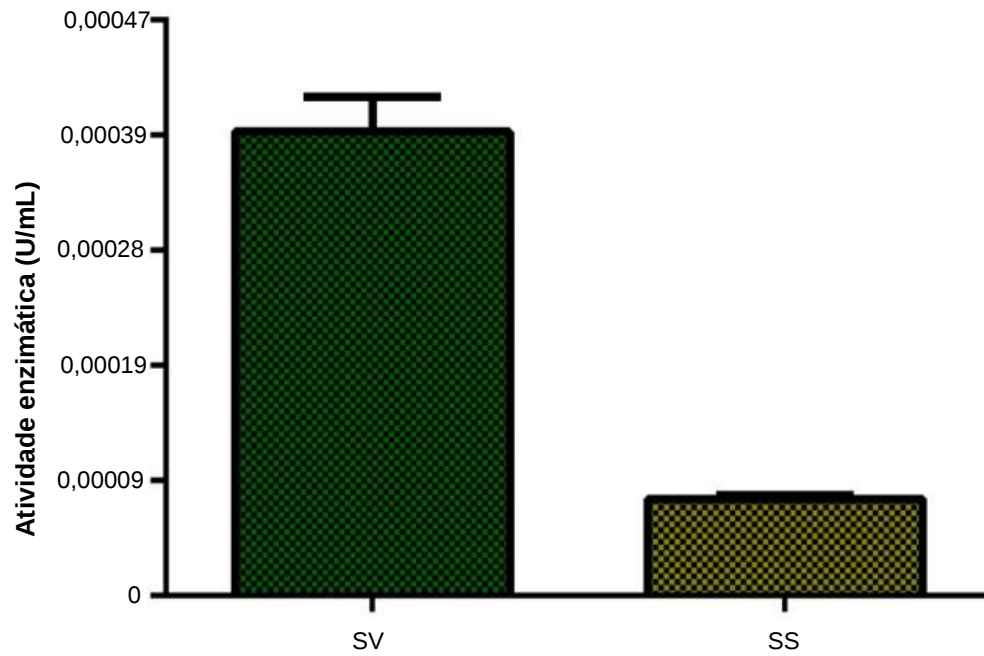


Figura 2

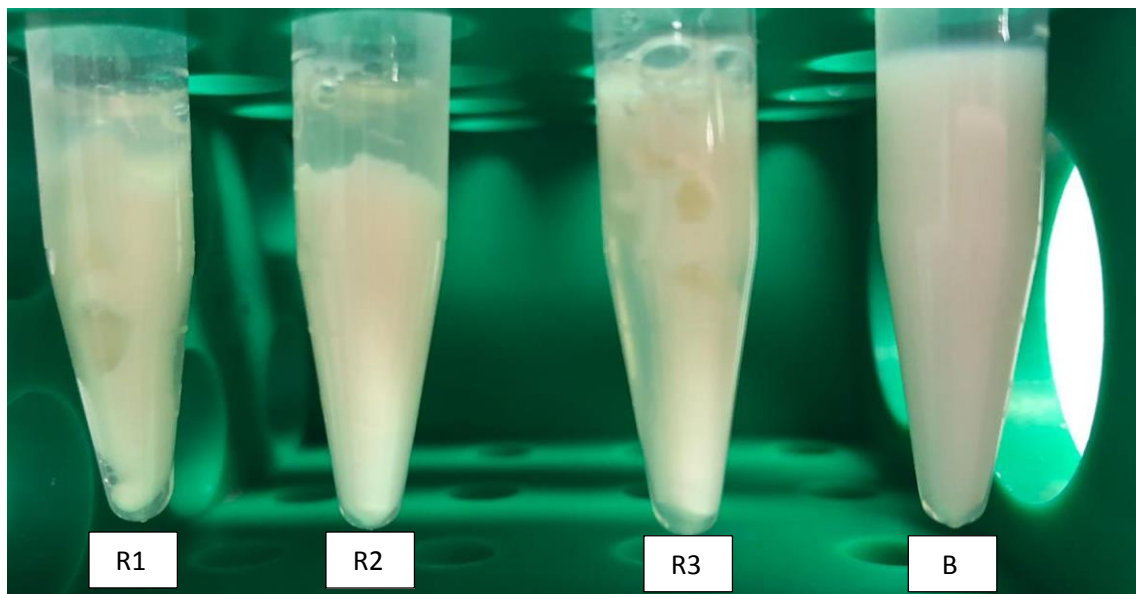


Figura 3

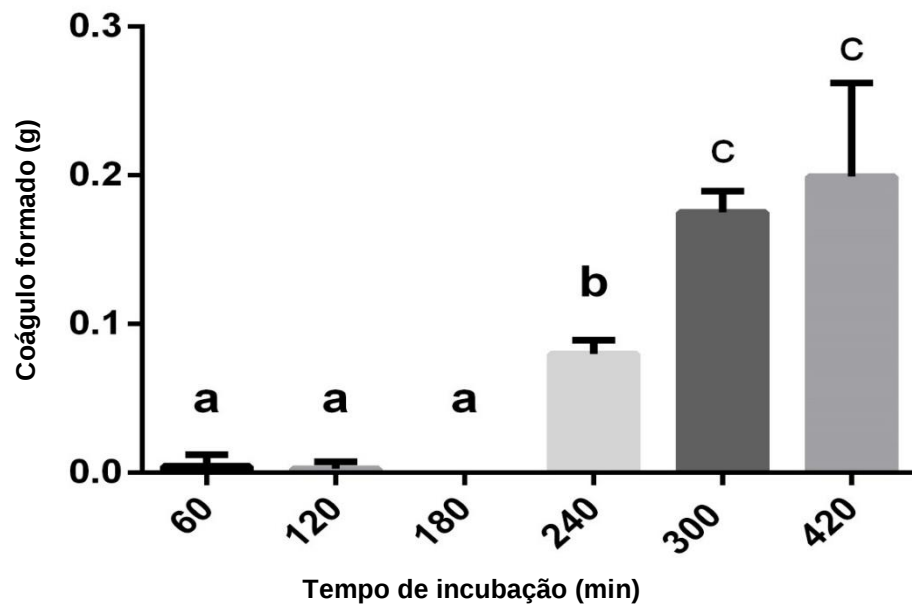


Figura 4

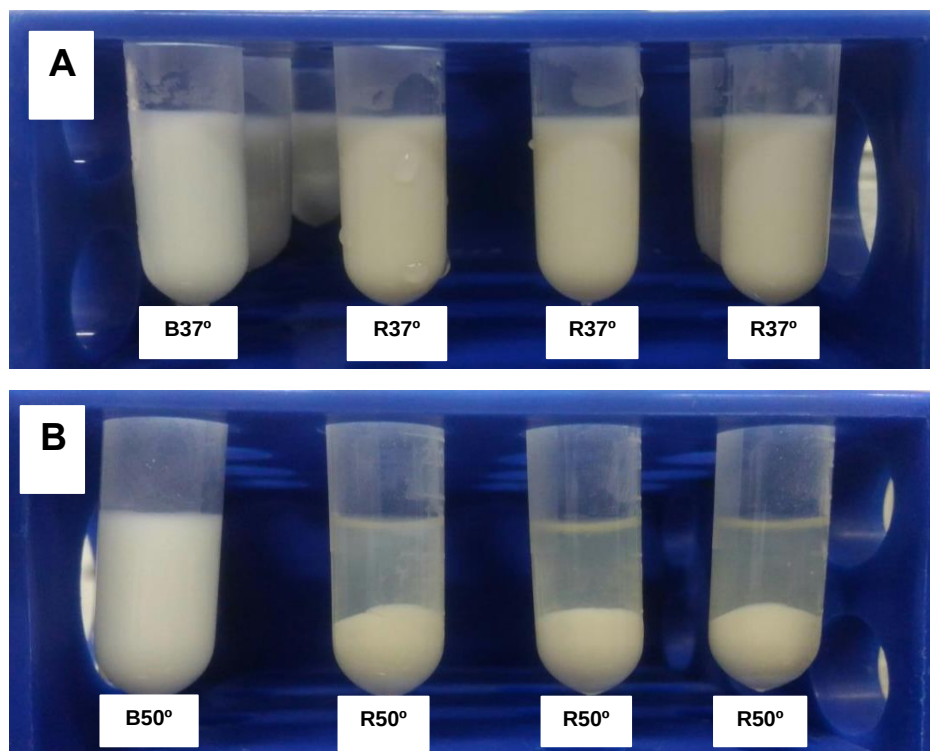


Figura 5

