



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

CARTA PATENTE Nº BR 102020000575-8

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 102020000575-8

(22) Data do Depósito: 10/01/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 20/07/2021

(51) Classificação Internacional: A23C 19/04; C12N 9/58.

(52) Classificação CPC: A23C 19/041; C12N 9/58.

(54) Título: OBTENÇÃO DE UM AGENTE COAGULANTE DE LEITE PRODUZIDO PELO FUNGO AMPHOBOTRYS RICINI ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

(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: CLEDSON BARROS DE SOUZA; HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA; JOSÉ MARIA RODRIGUES DA LUZ; CLÁUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS; LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO; JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO; LARISSA COSTA SANTOS; FABIANA SARMENTO DE ALBUQUERQUE; SONIA SALGUEIRO MACHADO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 10/01/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 08/07/2025

Assinado digitalmente por:
Gisela Aparecida Silva Nogueira
Diretora de Patentes Substituta

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “Obtenção de um agente coagulante de leite produzido pelo fungo *Amphobotrys ricini* através de fermentação em estado sólido”

[001] A seguir, será descrita a invenção que consiste na obtenção de um agente coagulante de leite a partir do cultivo da espécie de fungo filamentoso *Amphobotrys ricini* em resíduo de farelo de trigo. A realização do invento é o preparo de extrato aquoso das enzimas produzidas pelo fungo filamentoso cultivado sobre farelo de trigo, que entre os constituintes, contém componente proteico capaz de coagular proteínas do leite.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPÕE A RESOLVER

[002] Entre as possibilidades de produção de alimentos a partir do leite, está a produção de diferentes tipos de queijo, produto que é produzido com o auxílio de agentes formadores de coágulo, que é composto das proteínas do leite insolubilizadas. Esses agentes coagulantes alteram propriedades físico-químicas do leite, de forma que a hidrólise de proteínas produz peptídeos menos solúveis e altera a organização das micelas compostas pelas proteínas do leite, separando-as da parte aquosa denominada soro.

[003] Os coágulos, ou a coalhada podem ser produzidos por acidificação, posto que as caseínas são insolúveis em pH=4.6, ou por agentes enzimáticos, proteases que são produzidas por diferentes organismos vivos (Robinson; Wilbey,1998). O agente enzimático tradicionalmente utilizado, o coalho, é de origem animal. Existe uma busca no mundo todo por agentes que possam substituí-lo, como proteases vegetais, fúngicas, bacterianas ou a utilização de técnicas como a tecnologia recombinante do DNA. Hábitos alimentares, alto custo, moral religiosa e disponibilidade limitada são fatores que impulsionam a busca por alternativas ao coalho tradicional (Bey et al., 2018).

[004] A invenção aqui documentada consiste na obtenção de um agente coagulante enzimático a partir de extração aquosa de cultura do fungo *Amphobotrys ricini* tendo como suporte sólido o resíduo de farelo de trigo.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[005] A presente invenção é o uso de um coagulante enzimático produzido por um fungo filamentosos, obtido através de cultivo e extração de baixo custo, em processamento de leite para a produção de laticínios, em especial os queijos, substituindo o coagulante animal tradicional por um agente produzido naturalmente por um fungo cultivado sobre resíduos agroindustriais do processamento de trigo, o farelo.

ESTADO DA TÉCNICA

[006] A produção mundial de queijo é estimada em cerca de 16.6 milhões de toneladas em 2020. Ao longo do tempo, houve maior produção de diferentes tipos de queijo, com variações de textura, sabor, maturação, origem do leite, e principalmente, diferentes agentes coagulantes utilizados em seus preparos (PM Food & Dairy Consulting: The World Cheese Market Report 2000-2020, 2017). A preparação enzimática mais utilizada pelo setor industrial de laticínios é uma preparação enzimática contendo proteases ácidas oriundas de tecidos animais, dentre as quais a principal enzima é a renina.

[007] O termo coalho remete às preparações produzidas a partir do quarto estômago de ruminantes em fase de lactação, mais especificamente bezerros, onde os principais responsáveis pela coagulação láctea são a quimosina e a pepsina, sendo a quimosina majoritária nos bezerros em lactação e após desmame, a pepsina passa a ser a enzima principal com atividade sobre as proteínas do leite (Brasil, 2011).

[008] Desde 1961, houve uma grande redução na disponibilidade de coalho tradicional devido a baixa disponibilidade da preparação enzimática de origem animal. Isso ocorre por causa da diminuição do abate de bezerros no mundo, sendo a fabricação de queijos com coalho de bezerro correspondente a 33% da

produção mundial (Cirium et al., 2019). A principal característica do coalho de bezerro é o processamento da k-caseína em para-k-caseína e glicomacropeptídeo que são formados a partir da clivagem da k-caseína nos resíduos de fenilalanina 105 e metionina 106 (Foltmann, 1966; Shah, Mir and Paray, 2014). A seguir, as frações para-k-caseína, α e β precipitam na presença de cálcio, formando um coágulo firme de estado gelatinoso (Chitpinityol and Crabbe, 1997; Badgujar and Mahajan, 2014).

[009] Ainda que proteases obtidas de fontes alternativas ao coalho de bezerro tendam a exibir menor especificidade, podendo produzir pouca coagulação e coalho de sabor amargo e odores desagradáveis (Visser, 1993; Jacob, Jaros and Rohm, 2011), a preferência por processamentos isentos de exploração animal, a defesa dos direitos animais e a baixa disponibilidade do coalho tradicional leva à busca dessas alternativas ao seu uso (Jacob, Jaros and Rohm, 2011; Shah, Mir and Paray, 2014).

[010] Agentes com potencial para a fabricação de queijos devem possuir uma alta atividade coagulante e uma baixa atividade proteolítica, o que indica uma maior especificidade da enzima ao processar a k-caseína em detrimento a outras proteínas nas condições de temperatura e pH de preparo dos queijos (Dalglish 1992; Fox and Kelly 2004). Também devem demonstrar termolabilidade suficiente para serem inativadas e assegurar a integridade de outros constituintes do alimento após o preparo. Os principais substitutos para o coalho são proteases microbianas, vegetais e aquelas modificadas geneticamente com expressão heterológica através de tecnologia recombinante do DNA (Jacob, Jaros and Rohm, 2011).

[011] Os fungos são um grupo de micro-organismos produtores de um grande número de proteases com diferentes aplicações, incluindo coagulação de leite, podendo ser cultivados em diferentes suportes produzindo quantidades significativas de enzima. As proteases fúngicas tendem a conservar atividade em um amplo intervalo de pH e temperatura, o que as torna interessantes

industrialmente. Uma grande quantidade de trabalhos tem sido realizada para entender aspectos biotecnológicos da fermentação em estado sólido e quais tipos de micro-organismos possuem maior potencial para produção de biomoléculas nesse modelo de cultivo (Singh et al., 2016; Hölker, Höfer and Lenz, 2004; Singhania et al., 2009).

[012] O cultivo de micro-organismos em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais para a obtenção de enzimas é uma abordagem que visa aproveitar material sem valor comercial para produção de baixo custo de biomoléculas industrialmente importantes. Os fungos têm sido usados para a produção de biomoléculas de interesse industrial com as enzimas, que geralmente são encontradas extracelularmente, facilitando a extração do meio de cultivo (Germano et al., 2003).

[013] Uma série de micro-organismos tem sido usado para obter proteases com capacidade de coagulação do leite (Meng et al., 2018; Cirium et al., 2019; Merheb-Dini et al., 2010; Majumder, Banik and Kowala; 2015; Silva et al., 2017; Ozturkoglu-Budak et al., 2016; Silva et al., 2019; Ayana, Ibrahim and Saber, 2016). Muitas patentes envolvendo obtenção de enzimas de diferentes organismos com potencial aplicação na produção de queijos foram depositadas no Brasil, bem como em outros países. A patente BR 102018002232-6 A2 documenta a obtenção de um agente coagulante de leite a partir do látex da espécie vegetal *Euphorbia milii*. O documento US 2011/0008492 A1 relata a obtenção de uma enzima semelhante à quimosina de um animal da ordem *Tylopoda*. O documento BR 102015012996-3 A2 mostra a capacidade de frações proteicas do látex de duas espécies vegetais coagularem proteínas do leite de bovinos e de caprinos. O PI 1101014-2 A2 demonstra utilização de uma protease fungica de *Thermomucor sp.* na formação de coágulo de leite bovino. O EP 1 365 019 B1 mostra a produção de uma enzima a partir de fermentação em meio químico modificado do fungo *Mucor miehei* com capacidade de coagulação de leite bovino.

[014] O fungo *Amphobotrys ricini* é um fungo filamentoso que mostra propriedades compatíveis para seu cultivo através de fermentação em estado sólido, sendo um secretor de enzimas extracelulares hidrolíticas com potencial biotecnológico, como um endoglucanase (Silva et al., 2018). O mofo cinzento foi isolado de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis*) e pode infectar essa planta em qualquer estágio, sendo uma das doenças mais importantes para essa cultura (Documentos 137, Embrapa, 2005; Angelo et al., 2011).

[015] A doença vegetal foi relatada pela primeira vez nos EUA em meados de 1918 (Godfrey, 1923) e no Brasil, em São Paulo, 1932 (Gonçalves, 1936), tendo documentadas ocorrências em outros países, bem como em outros tipos de plantações (Amiri, Onofre and Peres, 2016; Yu et al., 2014). Embora *A. ricini* tenha nicho ecológico fitopatogênico, suas enzimas podem ser obtidas a partir de diferentes processos de extração e purificação a partir do crescimento saprofítico em resíduos vegetais ou resíduos agroindustriais, de forma que a possibilidade de disseminação do fungo no ambiente é nula ou muito baixa.

[016] A única patente encontrada envolvendo esse fungo é US4909826, que trata do uso dessa espécie no controle biológico de uma erva daninha (*Caperonia palustris*). O presente documento inclui a possibilidade de processar a extração enzimática de forma a garantir a ausência de qualquer forma de disseminação do fungo. Como já existe o relato da caracterização de uma endoglucanase com potencial biotecnológico descrito, outras enzimas desse fungo podem apresentar requisitos para outros tipos de aplicação. Além disso, não há relato na literatura científica de infecções no organismo humano devido, principal ao seu nicho ecológico de fitopatogênico ou saprofítico de vegetais. Nouani et al. (2009) documenta o isolamento de uma protease e a possibilidade de utilização no processamento de leite, tendo como fonte, a espécie *Rhizomucor pusillus*, uma espécie de fungo que pode ocasionar doenças em humanos, o que mostra a possibilidade de utilizar enzimas de espécies causadoras de doenças sem disseminá-las.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[017] A invenção aqui apresentada pode ser descrita como a obtenção de um agente coagulante enzimático de leite bovino a partir de extração aquosa de uma fermentação em estado sólido do fungo *A. ricini* tendo como suporte o resíduo de farelo de trigo.

[018] A composição do invento pode envolver a adição de adjuvantes que potencializem a ação da enzima sobre as proteínas do leite, bem como sua estabilidade, como cofatores e/ou coenzimas, sais, agentes complexantes, diferentes soluções tampão em diversos pHs, inibidores enzimáticos, antioxidantes e antimicrobianos.

[019] Está incorporada a essa invenção também a possibilidade da aplicação de diferentes abordagens de obtenção e enriquecimento da enzima, como o uso de diferentes agentes precipitantes para fracionamento proteico, técnicas de isolamento de proteínas e imobilização enzimática para as proteases presentes no extrato a serem utilizadas.

[020] A amostra pode ser submetida a processo de diálise, diluição ou concentração, seja para maior eficácia em sua ação coagulante, seja pela possibilidade de modificar características sensoriais da mostra em relação àquelas do extrato *in natura*.

[021] A extração enzimática pode ser liofilizada, mantido sob refrigeração e protegido da luz, em faixa ideal de refrigeração entre 2°C e -6°C, para posterior uso em processo de coagulação láctea ou para aquisição do produto na forma comercial.

[022] A seguir, serão relatados experimentos realizados para a obtenção da enzima, bem como para a investigação de sua atividade coagulante.

Preparo de fermentação em estado sólido da espécie *A. ricini*

[023] O fungo foi obtido originalmente da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (URM-UFPE) e possui número de registro 5627. O inóculo foi preparado a partir de uma placa de Petri contendo meio de cultura Agar Batata

Dextrose (Vetec) onde o fungo foi cultivado a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 20 ± 5 dias e armazenado sob refrigeração ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 30 ± 5 dias. Após o crescimento micelial, um disco de 1 ± 0.5 cm de diâmetro foi adicionado a cada um de 3 erlemeyers de 125 mL contendo 10 ± 3 g de resíduo de farelo de trigo previamente submetido a secagem sob circulação de ar a 50°C por 24 ± 2 hs e autoclavado a 1 atm por 30 min, farelo obtido de empresas da cidade de Maceió, Alagoas. Todo o processo de inoculação do disco de micélio no resíduo foi realizado em capela de fluxo laminar. A fermentação foi executada em estado estacionário a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ nos tempos variando de um a 15 dias de incubação para posterior extração das enzimas presentes no resíduo.

Preparo de extrato bruto enzimático a partir de fermentação em estado sólido

[024] Foram adicionados ao resíduo com crescimento micelial, que corresponde a toda a massa de trigo no erlmyer, 20 ± 2 mL de solução tampão de $\text{pH}=3\pm 0,5$ de 100 mM de tartarato de sódio + 5 mM de EDTA, que foi deixado em contato com o resíduo macerado por 10 min a 25°C . Em seguida, o conteúdo extraído do meio pelo tampão foi centrifugado a 9000 xg, 15 min, 25°C , onde o sobrenadante foi filtrado em papel whatman e o corpo de fundo, descartado. O sobrenadante após centrifugação e filtração foi chamado de extrato bruto.

Zimografia

[025] Foi preparado um gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970) em concentração de 12% de poliacrilamida, com pequenas modificações, onde a água foi substituída no gel inferior por uma solução de 0.4% caseína. Foi executada uma eletroforese nativa, sendo aplicadas alíquotas de cada um dos tempos de cultivo (1 a 15 dias) $25\text{ }\mu\text{L}$ + $5\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de amostra (0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,001% de azul de Bromofenol) cada. A eletroforese foi executada a voltagem constante de 90 mV e após o fim da corrida, o gel foi lavado duas vezes por solução 2.5% de triton-X por 15 min cada, para posteriormente ser deixado em tampão 200 mM Tris-HCl

pH=8.0 em temperatura de 37°C por 12 horas. Depois de decorrido o tempo de incubação, o gel foi corado por solução de comassie blue G-250 a 1% e depois descorado com solução descorante (50% metanol, 10% ácido acético) até que fosse possível visualizar a hidrólise da caseína.

Curva de tempo de coagulação

[026] Foram executados ensaios de coagulação de leite em triplicata para quatro tempos diferentes, 1, 2, 3 e 4 horas a 37°C. Cada triplicata foi preparada com 0.2 mL da fermentação de maior atividade hidrolítica da caseína + 1 mL de leite desnatado reconstituído Molico. O leite foi dissolvido à 25°C, em 10% (w/v), em uma solução de 10 mM de cloreto de cálcio e ajustado para pH=6.5 com HCl (Arima et al., 1970). Cada triplicata do ensaio de coagulação foi confrontada com um branco que teve 0.2 mL de solução de extração no lugar da extração enzimática. Ao fim de cada tempo, cada triplicata com seu controle foi centrifugada em centrífuga de microtubos Interprise por 2 min para a visualização da atividade coagulante. O mesmo procedimento foi executado em para outra curva de tempo a 50°C, nos tempos de 30 min, 1, 2 e 3 horas.

Ensaio de temperatura ótima de coagulação

[027] Duas triplicatas preparadas com 0.2 mL da extração de maior atividade caseinolítica + 1 mL de leite desnatado reconstituído Molico preparado da mesma forma relatada na curva de tempo de coagulação. Ambas foram encubadas por 1 hora, uma em temperatura de 37°C e outra a 50°C. Ao término do tempo de encubação, ambas foram submetidas à centrifugação em centrífuga de microtubos Interprise por 2 min para visualização da coagulação.

Ensaio de estabilidade térmica

[028] Foram preparadas duas triplicatas e seus respectivos controles como relatado no ensaio da curva de tempo de coagulação. Em uma delas, o extrato foi aquecido por 10 min a 100°C antes da incubação e no outro, a enzima não foi aquecida previamente. Ambas foram mantidas por 4 horas sob temperatura de 37°C e ao final do tempo de encubação, ambas foram submetidas a

centrifugação em microcentrifuga de microtubos Interprise por 2 min a fim de verificar se houve coagulação do leite na triplicata onde a enzima foi fervida antes da encubação.

Cálculo da atividade coagulante

[029] O cálculo da atividade foi feito a partir da quantidade de enzima necessária para coagular 10 mL de caseína em 40 min de reação a 37°C conforme a equação MCA (U/mL) = $[(2400 \times V)/t] \times v$, em que “V” é o volume do leite em mL, “t” se refere ao tempo de coagulação em segundos e “v” é o volume da extração enzimática usado em mL.

RESULTADOS OBTIDOS

Preparo do extrato enzimático e verificação de atividade caseínolítica através de zimografia

[030] As extrações dos diferentes tempos de cultivo após o processo de preparo da zimografia se apresentaram como mostra a figura 1, em que as canaletas enumeradas como 1, 2 e 3 correspondem às extrações nos tempos 0, 7 e 14, respectivamente. O branqueamento da área que a amostra percorreu corresponde à presença de atividade hidrolítica da caseína presente no gel, assim como a ausência desse clareamento corresponde à ausência dessa atividade. É possível observar que a extração no tempo 0 não apresenta capacidade de degradação da caseína, enquanto que a extração de 7 dias possui atividade hidrolítica, porém visivelmente menor que o cultivo de 14 dias, que apresentou a maior atividade, e por essa razão, foi escolhido para realizar os ensaios de coagulação de leite seguintes. Esse resultado permite afirmar que existe uma protease alcalina com capacidade de hidrolisar a caseína na extração enzimática.

Curva de tempo de coagulação de leite

[031] Após os ensaios de tempo de coagulação, foi avaliada a formação de coágulo após centrifugação. O menor tempo de coagulação a 37°C, que foi correspondente a 1 hora, não apresentou atividade visível de processamento da

caseína. Porém, a partir da segunda hora do teste, é possível observar alguma atividade coagulante, que aumenta gradativamente, atingindo sua máxima atividade de coagulação na triplicata incubada por 4 horas, como mostrado na figura 2. Já na curva de tempo a 50°C, o início da coagulação é observado com 30 min de reação, alcançando a máxima atividade de coagulação com 1 hora de reação. A atividade do extrato foi calculada considerando o período de incubação onde ocorreu coagulação total da caseína para a temperatura de 37°C (4 horas), em que o resultado foi correspondente a 33 mU/mL de enzima.

[032] A ausência da coagulação de caseína nos controles de cada triplicata nos permite afirmar que a deposição da fração insolúvel das proteínas do leite é decorrente da presença de enzimas produzidas pelo fungo cultivado. A deposição gradativa de proteínas com o aumento do tempo de incubação é outra evidência da presença de atividade coagulante proveniente de enzimas. O aumento da atividade da enzima decorrente do aumento da temperatura também é uma característica apresentada por diversas enzimas proteolíticas.

Temperatura ótima

[033] A figura 3 mostra a diferença da coagulação enzimática do leite nas temperaturas de 37°C e 50°C no mesmo tempo de incubação. É possível afirmar que a hidrólise ocorre consideravelmente mais rápida a 50°C do que em 37°C, pois a coagulação máxima é obtida na temperatura de 50°C em uma hora, o que só acontece com 4 horas de incubação a 37°C, segundo o ensaio de curva de tempo, não sendo possível observar formação de deposição de peptídeos insolúveis na triplicata submetida à temperatura de 37°C por uma hora. O coagulante extraído apresenta atividade ótima em torno de 50°C, como também foi relatado na patente BR 10 2012 029500A-2 de coagulante extraído fungo de gênero *Aspergillus* que apresenta atividade ótima em intervalo entre 40 e 50°C e Nouani et al. (2009) documentaram o isolamento de uma protease coagulante extraída da espécie *R. pusillus*, que apresenta atividade ótima a 50°C.

Estabilidade térmica

[034] A triplicata de reação correspondente à máxima atividade coagulante foi mantida pelo mesmo tempo de incubação sobre as mesmas condições que a triplicata que foi fervida antes do ensaio. A figura 4 mostra que o extrato fervido inativou a atividade coagulante observada após 4 horas de reação a 37°C, demonstrando que a atividade advinda da extração cessa quando submetida a altas temperaturas, característica exibida pelas enzimas proteicas de uma forma geral e que ela pode ser inativada através de aumento de temperatura. Uma característica importante de novos agentes coagulantes potenciais é que possam ser inativados após o processo industrial, para que não continuem a agir sobre outras proteínas do soro após a fabricação do laticínio.

VANTAGENS DA PATENTE

[035] Posto que o processamento de laticínios seja uma atividade econômica importante no Brasil e no resto do mundo, é imperativo que se busquem alternativas viáveis para essa tarefa, levado em consideração a demanda que há desses produtos no mercado e fatores que impulsionam a busca por alternativas ao coalho tradicional e outras fontes de origem animal. A invenção proposta, obtenção de extrato coagulante a partir de cultivo de fungos em resíduos sólidos, apresenta algumas vantagens na sua obtenção e utilização frente ao coalho de origem animal, a saber:

[036] A utilização de resíduo agroindustrial para a obtenção da enzima, dando destino a um material sem valor comercial, que somaria apenas ao montante de resíduos sólidos a serem descartados, tornam-se substrato para o crescimento do fungo e obtenção de biomoléculas com importância biotecnológica.

[037] Facilidade de obtenção do inóculo fúngico, bem como condições de cultivo, sendo a produção da enzima limitada pela quantidade de substrato disponível para o cultivo do micro-organismo produtor. O baixo custo do substrato, bem como a manutenção de células viáveis para inoculação do fungo são fatores favoráveis para a aplicação da enzima em processos industriais que

podem influenciar diferentes frações do agronegócio, com a possibilidade de participação de diferentes setores em uma cadeia de produção de laticínios.

[038] A origem microbiana da enzima contorna quaisquer problemas no que diz respeito à exploração de animais e alguns costumes atrelados a certas religiões, bem como a disponibilidade da enzima quando se compara ao coalho tradicional.

[039] O processo de obtenção do extrato enzimático é simples e de baixo custo, e o extrato é passível de diferentes processamentos para atender demandas de mercado.

[040] O ensaio de coagulação de leite pelo extrato enzimático foi bastante reprodutivo, o que assegura a possibilidade de aplicação na cadeia produtiva.

[041] O uso de um micro-organismo fitopatogênico de grande importância econômica no setor agrícola para a obtenção de enzimas passíveis de aplicação biotecnológica em setor econômico importante, além de mérito científico na descoberta de uma atividade ainda não descrita na literatura.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[042] **Figura 1.** Gel de zimografia. A canaleta 1 é correspondente à extração do resíduo de farelo de trigo autoclavado sem inoculação do fungo. A canaleta 2 é a amostra da extração feita a partir de cultivo de sete dias e a canaleta enumerada como 3 é relativa à extração do cultivo do fungo após 14 dias. A área clara no gel indica onde houve hidrólise da caseína, sendo visivelmente mais pronunciada na canaleta 3.

[043] **Figura 2.** Reações de coagulação de leite em diferentes tempos. a, b, c e d correspondem, respectivamente, às reações de coagulação e seus respectivos controles nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas à temperatura de 37°C. As letras e e f se referem respectivamente às reações de coagulação e seus controles associados para a temperatura de 50°C nos tempos de 30 min e 1 hora, onde ocorreu coagulação total do leite pelo extrato, fato que ocorre com o leite em 4 horas de reação em temperatura de 37°C.

[044] **Figura 3** Reações de formação de coágulo e respectivos controles. a e b correspondem, respectivamente, aos ensaios de coagulação para a temperatura de 37°C e 50°C após 1 hora de incubação, onde percebe-se uma clara atividade coagulante na temperatura mais elevada em comparação ao branco.

[045] **Figura 4** Teste de estabilidade térmica. A letra a mostra a é referente ao ensaio de coagulação com prévia fervura do extrato, e a letra b mostra a máxima formação de coágulo após as 4 horas de incubação do extrato com o leite em que é possível visualizar que altas temperaturas em curto período de tempo são capazes de inativar a enzima processadora da caseína.

REIVINDICAÇÕES

01. Obtenção de um agente coagulador de leite desnatado em pó a partir de cultivo em estado sólido da espécie *Amphobotrys ricini* **caracterizado por** seguir as seguintes etapas:

- a) Cultivo, por até 20 dias, de *Amphobotrys ricini*, em meio BDA a 25 ± 3 °C seguido de armazenamento refrigerado;
- b) Inoculação de discos de micélio, $1 \pm 0,5$ cm, em frascos cônicos contendo 5 g de farelo de trigo seco e autoclavado com fermentação por até 15 dias a 25 ± 3 °C;
- c) Extração enzimática, por adição no resíduo fermentado, de 20 ± 2 mL de tampão tartarato de sódio 100 mM (pH $3 \pm 0,5$) com 5 mM de EDTA, mantendo-se em contato por 10 minutos a 25 °C;
- d) Após incubação em b) o material foi macerado em grau de porcelana e o extrato centrifugado ($9000 \times g$, 15 min, 25 °C) para a obtenção de um sobrenadante;
- e) O sobrenadante obtido em d) foi filtrado em papel filtro, obtendo-se o extrato bruto.

DESENHOS

FIGURA 1

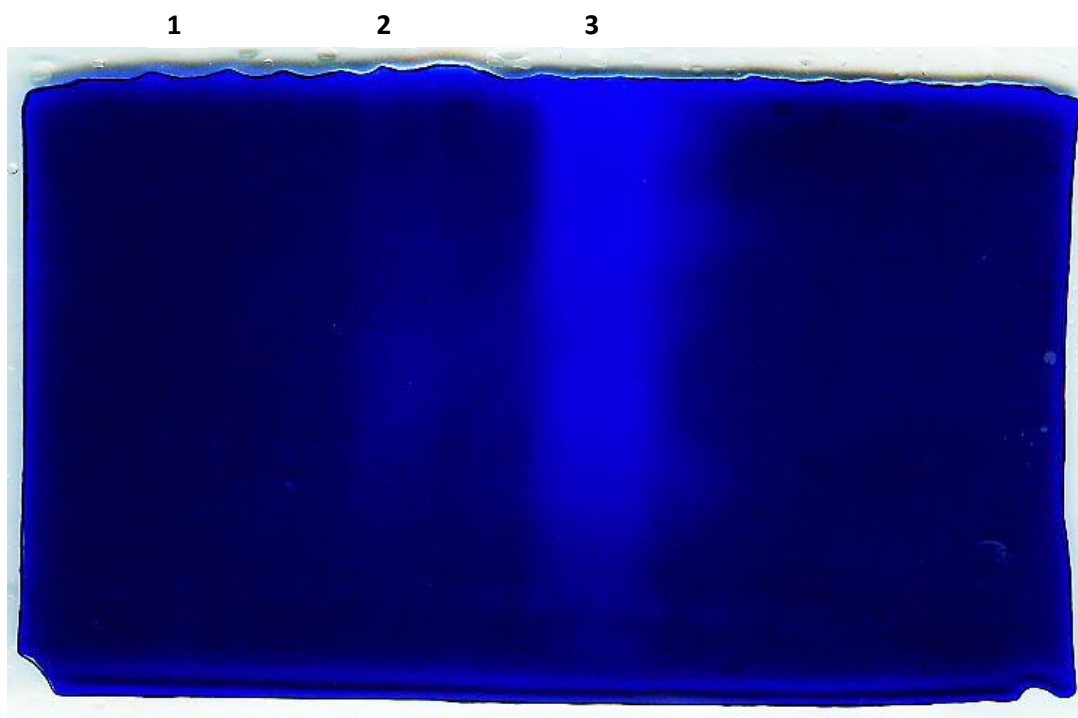


FIGURA 2

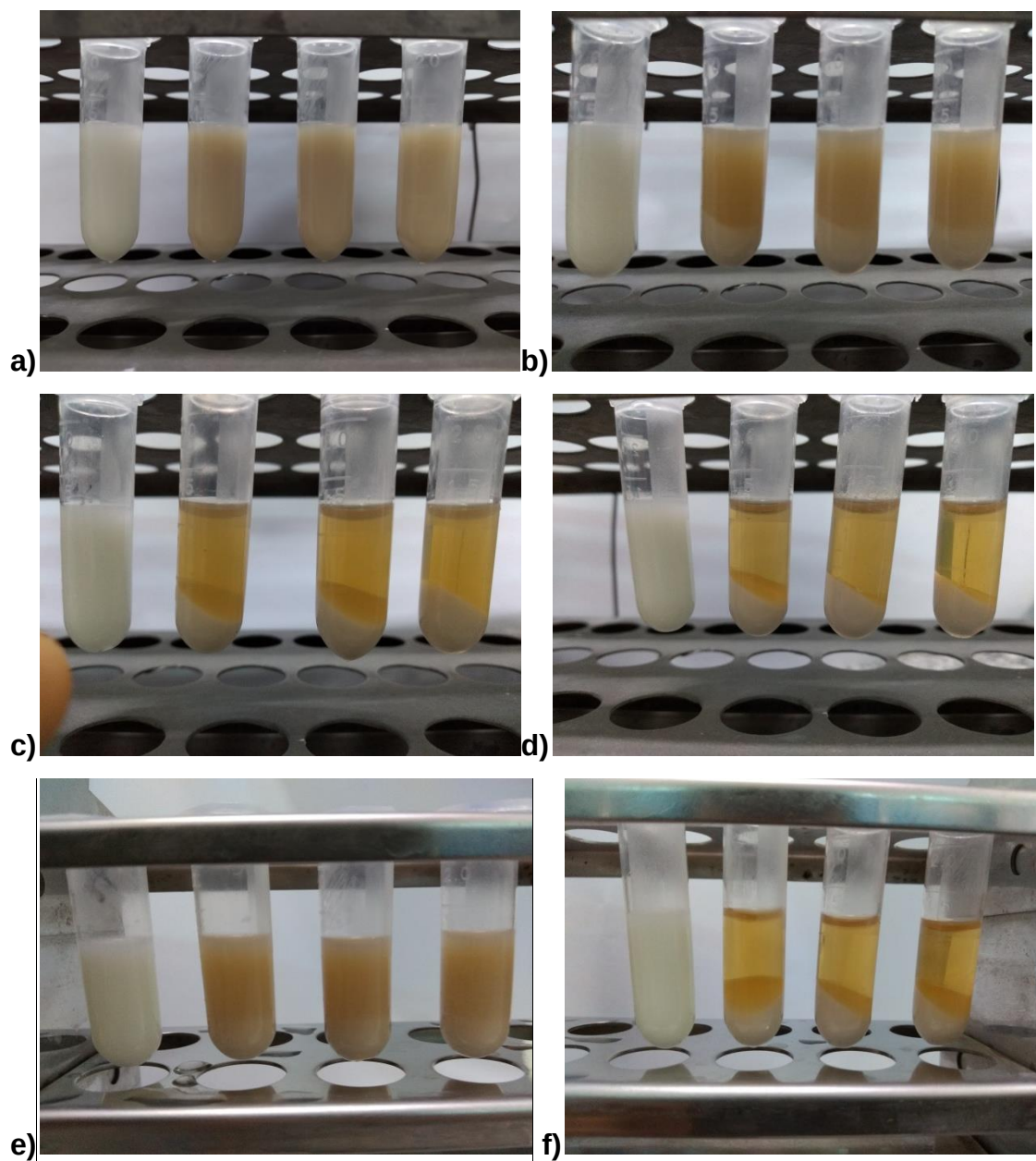


FIGURA 3

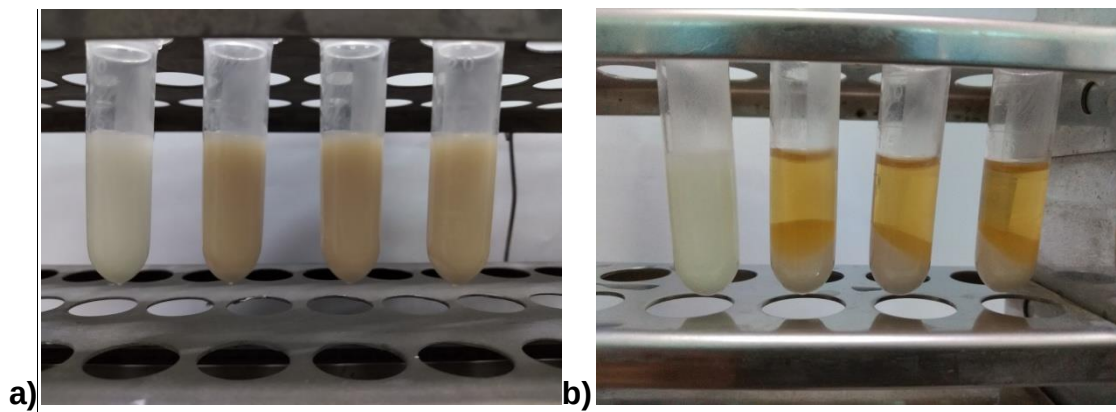


FIGURA 4

