



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1105687-8

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: PI 1105687-8

(22) Data do Depósito: 24/11/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 20/03/2018

(51) Classificação Internacional: C12P 1/02; A23L 2/84.

(52) Classificação CPC: C12P 1/02; A23L 2/84.

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO E MÉTODO DE CLARIFICAÇÃO DE BEBIDAS UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DE KLUYVEROMYCES

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Cidade Universitária, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070-560; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC. CGC/CPF: 83899526000182. Endereço: Campus Universitário, s/nº, Trindade, Florianópolis, SC, BRASIL(BR), 88040-970

(72) Inventor: LUCIANI TATSCH PIEMOLINI BARRETO; ANA PAULA LONGARAY DELAMARE; SERGIO ECHEVERRIGARAY; REGINA VASCONCELLOS ANTÔNIO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 24/11/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 02/02/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

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

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO E MÉTODO DE CLARIFICAÇÃO DE BEBIDAS UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DE *KLUYVEROMYCES*

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve produtos e processos compreendendo um excelente extrato enzimático, com elevada atividade de poligalacturonase, produzido por cepas selecionadas de *Kluyveromyces* sp., especialmente para a extração e clarificação de bebidas, em especial, bebidas fermentadas como suco de frutas ou vinho, por exemplo. A presente invenção se situa no campo da engenharia de alimentos, engenharia química, nutrição e biologia.

Antecedentes da Invenção

[0002] Os sucos de frutas, de acordo com as características físico-químicas de cada uma, apresentam diferentes graus de turvação natural. As indústrias de bebidas têm investido na obtenção de sucos límpidos, visto que a aparência visual do líquido influencia na decisão do consumidor no momento de optar por determinado produto (Tribess e Tadini 2006). Um dos principais problemas encontrados na preparação de sucos de frutas é a formação de colóides, devido principalmente à presença de pectinas. Vários estudos têm relatado que a despectinização utilizando pectinases no tratamento enzimático é uma alternativa eficiente (Landbo e Meyer, 2007, Kashyap et al. 2000).

[0003] Estas enzimas são utilizadas nas indústrias de alimentos para extração e clarificação de sucos de frutas, pois agem sobre as substâncias pécticas, aumentando o rendimento e melhorando o processamento (Landbo e Meyer, 2007; Bhat, 2000; Bravo, et al. 2000). A adição de pectinases é requerida em diferentes etapas na obtenção do suco. São utilizadas durante a maceração da polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes (Cardoso et al.,

1999; Kaur et al., 2004). Após a extração, as pectinases são adicionadas para clarificação e diminuição de viscosidade, agem desestabilizando as substâncias floculantes, provocando a coagulação e precipitação com consequente clarificação. Durante o tratamento enzimático, ocorre o aumento do tamanho das partículas insolúveis devido à redução da repulsão eletrostática entre as partículas coloidais, agrupando-as para remoção durante a filtração (Pilnik e Voragen, 1993; Barros et al., 2004).

[0004] As enzimas pectinolíticas são produzidas naturalmente por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Da Silva et al. 2005). Os fungos filamentosos têm sido usados por mais de 50 anos na produção de enzimas industriais, e a maioria deles produz várias enzimas simultaneamente (Dalboge, 1997). As pectinases usadas na indústria de alimentos são produzidas comercialmente por *Aspergillus niger* (Acuña-Argüelles et al., 1995). Esta espécie fúngica produz várias pectinases, incluindo a pectina metilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL). Entretanto, há casos onde as pectinases são usadas para finalidades específicas. Muitas pectinases comerciais obtidas do *Aspergillus niger* apresentam baixa atividade de PG e elevada atividade do PL e do PME. A hidrólise da pectina por PME produz metanol (Da Silva, 2005), composto tóxico e indesejável em alguns produtos alimentícios, como bebidas fermentadas.

[0005] As leveduras apresentam uma fonte alternativa para a produção em grande escala das enzimas comerciais (Braga et al., 1998), com algumas vantagens sobre fungos filamentosos. Em relação à produção da pectinases, algumas linhagens de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *K. lactis*, são capazes de produzir somente poligalacturonases e não apresentam atividade metilesterase (Blanco et al., 1999). Consequentemente, suas pectinases podem ser usadas para clarificar suco de fruta e vinho sem liberar metanol (Fernández-González et al., 2004).

[0006] As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são utilizadas em bioprocessos para produção de diversas enzimas, como lactase, inulinase, pectinase e lipase

(Fonseca et al., 2007). *K. lactis* é atualmente a espécie mais estudada dentro do gênero *Kluyveromyces*. Porém, sua congênere *K. marxianus* também apresenta potenciais aplicações em diversos segmentos da biotecnologia (Fonseca et al., 2008) e possui uma alta capacidade de produção de enzimas pectinolíticas (SCHWAN et al., 1997). O estudo de microrganismos produtores de pectinases é fundamental para a obtenção de enzimas com características adequadas a processos industriais específicos.

[0007] A presente invenção vem trazer um produto novo e inventivo, com maior poder de clarificação do que os produtos conhecidos do estado da técnica, compreendendo enzimas pectinolíticas obtidas de *Kluyveromyces sp.* Em especial, a presente invenção traz um extrato enzimático obtido a partir de cepas de *Kluyveromyces sp* que, de acordo com os resultados obtidos, apresentam um resultado superior quando comparado aos extratos enzimáticos comercialmente utilizados.

[0008] No âmbito patentário foram encontrados alguns documentos citando o uso de leveduras para clarificação de suco.

[0009] O documento US 2006/0003053 descreve um método para extração de sucos compreendendo misturar uma enzima, preferencialmente pectinase e/ou amilase com o extrato do suco para separar a parte mais doce do suco do resto do suco.

[0010] O documento US 3,711,294 descreve o uso de pectinas em sucos, preferencialmente até se obter um nível de pectinas solúveis de cerca de 0,01 a 0,15%, permitindo a remoção dos sólidos insolúveis.

[0011] O documento US 4,109,017 descreve um método para clarificação de sucos compreendendo o tratamento do suco com pectinase em uma temperatura entre 35 °C e 55 °C e subsequente contato com gelatina e sol de sílica.

[0012] Diversos outros documentos (US 4,971,811; US 5,320,861; US 5,578,335; US 6,355,284; US 6,492,159) também foram encontrados e descrevem diferentes métodos para obtenção e clarificação de sucos a partir

do uso de enzimas pectinases, preferencialmente.

[0013] A presente invenção difere de todos os documentos citados por ser um pedido de patente de seleção, uma vez que demonstra que a extração enzimática a partir de *Kluyveromyces sp* apresenta extratos cujos resultados na extração e clarificação de sucos são comprovadamente superiores em comparação a outros extratos enzimáticos comerciais conhecidos, fatos não citados e nem demonstrados em nenhum documento do estado da técnica.

[0014] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Objetos da Invenção

[0015] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um novo e inventivo extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp* para ser utilizado na extração e clarificação de bebidas, em especial, bebidas fermentadas como suco de frutas ou vinho, apresentando como principal vantagem os resultados excelentes obtidos, especialmente, em relação ao rendimento, dos índices de cor, intensidade de cor, coloração e turbidez da bebida.

[0016] É, portanto, um objeto da presente invenção um processo de produção de extrato enzimático para extração e/ou clarificação de bebidas compreendendo a etapa de crescer *Kluyveromyces sp*. em meio para produção de poligalacturonase.

[0017] É também um objeto da presente invenção o extrato para extração e/ou clarificação de bebidas obtido a partir desse processo.

[0018] É, adicionalmente, um objeto da presente invenção o uso de extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp*. para extração e/ou clarificação de bebidas.

[0019] É, adicionalmente, um objeto da presente invenção uma composição para extração e/ou clarificação de bebidas compreendendo:

- a) extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp*;
- b) veículo aceitável.

[0020] É, também, um objeto da presente invenção o método de extração e/ou clarificação de bebidas compreendendo a etapa de contatar o suco de frutas com extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp*.

[0021] Em uma realização preferencial, as leveduras utilizadas são cepas selecionadas com alta atividade poligalacturonásica pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* e seu crescimento ocorre em meios completos sintéticos ou naturais.

[0022] Em uma realização preferencial, a produção de poligalacturonase pelas cepas selecionadas de *Kluyveromyces sp*. é realizada sob temperatura de 28 °C a 32 °C em meio sintético com pectina como única fonte de carbono e sob aeração constante.

[0023] Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza o extrato bruto ou concentrado com elevada atividade de poligalacturonase produzido por cepas selecionadas de *Kluyveromyces sp*. na extração e clarificação de suco de frutas.

[0024] Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza o extrato bruto ou concentrado com elevada atividade de poligalacturonase produzido por cepas selecionadas de *Kluyveromyces sp*. na extração de cor em processo enológicos.

[0025] Esses e outros objetos desta invenção serão valorizados e melhor compreendidos pelos versados na arte a partir da descrição detalhada a seguir.

Descrição detalhada da Invenção

[0026] Os exemplos a seguir não tem a intenção de limitar a invenção, mas somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de concretizá-la.

Levedura *Kluyveromyces sp*

[0027] A levedura *Kluyveromyces sp* da presente invenção compreende todas e quaisquer espécies desse gênero. Em uma realização preferencial, a

presente invenção utiliza a levedura selecionada *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013.

Extração e/ou clarificação

[0028] O termo “extração e/ou clarificação” de bebidas da presente invenção compreende a extração e/ou e clarificação e/ou extração de cor de bebidas.

Bebidas

[0029] O termo “bebidas” da presente invenção compreende todos os tipos de bebidas que podem ser consumidas por humanos e/ou animais incluindo, mas não se restringindo a, bebidas fermentadas como, por exemplo, suco de frutas ou vinho.

Meio

[0030] O “meio” da presente invenção compreende qualquer meio sintético ou natural adequado ao organismo que o utiliza para seu crescimento.

Processo de produção de extrato enzimático

[0031] A presente invenção compreende um processo de produção de extrato enzimático para extração e/ou clarificação de bebidas compreendendo a etapa de crescer *Kluyveromyces sp.* em meio adequado para produção de poligalacturonase.

Extrato

[0032] A presente invenção compreende o extrato para extração e/ou clarificação de bebidas obtido a partir desse processo.

Uso de extrato

[0033] A presente invenção adicionalmente compreende o uso de extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp.* para extração e/ou clarificação de bebidas.

Composição

[0034] A presente invenção adicionalmente compreende uma composição para extração e/ou clarificação de bebidas compreendendo:

- a) extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp.*;
- b) veículo aceitável.

Método de extração

[0035] É, também, um objeto da presente invenção o método de extração e/ou clarificação de bebidas compreendendo a etapa de contatar o suco de frutas com extrato enzimático obtido a partir de *Kluyveromyces sp.*

Exemplo 1: Maceração de suco de uva

[0036] O presente exemplo consiste da produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 para utilização na maceração de suco de uva.

Produção do extrato enzimático

[0037] Para a obtenção do extrato pectinolítico, a levedura *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 foi crescida em meio contendo 2% glicose, 1% extrato de levedura, e 1% peptona, a 28 °C por 24 horas. Esta cultura inicial foi utilizada como pré-inóculo para o cultivo em meio sintético-pectina (0,5% extrato de levedura, 1% pectina cítrica Genu® tipo 105 Lote LI82026, 0,67% Yeast Nitrogen Base, pH 5,0). A nova cultura foi incubada por 48 horas, crescidas a 28 °C sem agitação. Após este período a levedura foi removida por centrifugação à 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante (extrato bruto - EB) foi analisado quanto a atividade de poligalacturonase (PG).

Quantificação da atividade de poligalacturonase

[0038] A atividade poligalacturonásica (PG) foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom Libra S12) com comprimento de onda de 595nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol (equivalentes em ácido galacturônico) de grupos redutores por minuto. A quantificação de grupos redutores foi realizada por comparação com uma curva padrão de ácido galacturônico (0 a 80 µg) submetida às mesmas condições.

[0039] Para descrever o efeito da enzima poligalacturonase nos parâmetros de cor, foram realizadas leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de

420 nm, 520 nm e 620 nm, em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS, EUA). A intensidade de cor (IC) foi expressa com base no somatório das absorbâncias 420 nm, 520 nm e 620 nm (equação 1) e a tonalidade de cor (coloração) foi expressa com base na relação das absorbâncias 420 nm e 520 nm (equação 2).

$$IC_{420/520/620} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$GA_{420/520} = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

Maceração do suco de uva

[0040] Uva tinta da variedade Bordô de *Vitis labrusca* foi higienizada e selecionada quanto à sanidade. Durante a etapa de maceração, amostras de aproximadamente 200g da uva levemente macerada foram tratadas com o preparado enzimático comercial Novozym®33095 (Novozymes Latin America LTDA, Brasil) e o extrato enzimático bruto produzido por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013, ambos na concentração de 1U poligalacturonase/mL (PG/mL). Para cada ensaio foram feitas amostras controle isentas de enzimas pectinolíticas. Controles e tratamentos foram incubados a temperatura de 50 °C por 60 min. As uvas foram mantidas sob agitação durante a etapa de hidrólise enzimática, em um agitador de bancada Certomat U (B. Braun Biotech, RFA), sendo após resfriadas em banho de gelo para paralisar a ação enzimática. Os sucos foram obtidos através da maceração completa das uvas e prensagem, após cada tratamento.

Tabela 1. Médias do rendimento, dos índices de cor, intensidade de cor, coloração e turbidez dos produtos obtidos após maceração da uva.

Variável	Preparado Enzimático	Extrato enzimático	
	Comercial Novozym®33095	bruto de <i>K. marxianus</i> IBKLU013	Controle
Rendimento	89,40 ± 5,40 ^a	80,40 ± 4,80 ^a	62,80 ± 3,90 ^b
Índice de cor (420)	1,97 ± 0,01 ^b	2,84 ± 0,14 ^a	1,49 ± 0,15 ^c

Índice de cor (520)	14,29 ± 0,11 ^b	16,19 ± 0,12 ^a	10,61 ± 0,23 ^c
Índice de cor (620)	0,14 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,03 ^b
Intensidade de cor	16,41 ± 0,12 ^b	19,38 ± 0,13 ^a	11,28 ± 0,25 ^c
Coloração	1,38 ± 0,03 ^b	1,76 ± 0,02 ^a	1,43 ± 0,02 ^b
Turbidez	14,69 ± 1,32 ^a	12,73 ± 0,59 ^b	16,68 ± 0,72 ^a

Legenda da tabela 1: Letras iguais para cada linha não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$).

[0041] Os resultados obtidos na maceração da polpa (Tabela 1) com o extrato enzimático produzido por *K. marxianus* IBKLU013 foram significativamente superiores, quando comparados aos obtidos com o preparado enzimático comercial e o controle (sem tratamento com pectinases).

Exemplo 2: Clarificação do suco de uva

[0042] O presente exemplo consiste da utilização de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 na clarificação de suco de uva.

[0043] Em um volume de 50 mL de suco foram adicionadas 1U PG/ml do preparado enzimático comercial Pectinex®Ultra Color (Novozymes Latin America LTDA, Brasil) ou do extrato enzimático bruto de *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013. Para cada ensaio foram feitas amostras controle isentas de enzimas pectinolíticas. Os ensaios foram conduzidos em um banho termostatizado (B. Braun Biotech modelo Certomat WR, Alemanha). As demais condições de hidrólise, tempo, temperatura e concentração enzimática, foram as mesmas utilizadas para a etapa de maceração enzimática. Após o tratamento, os sucos foram resfriados em banho de gelo para interromper a ação da enzima e filtrados em papel filtro (Whatman nº1) para posterior análise.

Tabela 2. Médias dos índices de cor, intensidade de cor, coloração e turbidez do suco de uva após clarificação.

Variável	Preparado Enzimático	Extrato enzimático bruto	
	Comercial Pectinex®Ultra	de <i>K. marxianus</i> IBKLU013	Controle
Índice de cor (420)	1,42 ± 0,03 ^c	1,76 ± 0,06 ^a	1,60 ± 0,04 ^b
Índice de cor (520)	7,86 ± 0,04 ^c	10,54 ± 0,08 ^a	9,51 ± 0,07 ^b
Índice de cor (620)	0,13 ± 0,00 ^c	0,23 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,00 ^b
Intensidade de cor	9,42 ± 0,38 ^c	12,53 ± 0,83 ^a	11,30 ± 0,07 ^b
Coloração	1,81 ± 0,03 ^a	1,68 ± 0,06 ^b	1,68 ± 0,08 ^b
Turbidez	9,09 ± 0,42 ^c	11,15 ± 0,69 ^b	15,24 ± 0,22 ^a

Legenda da tabela 2: Letras iguais para cada linha não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$).

[0044] A Intensidade de cor (I420 + I520 + I620) foi significativamente superior no suco utilizando o extrato enzimático bruto de *K. marxianus* IBKLU013 (Tabela 2). Já a diminuição dos valores da coloração (I420/I520), observada na Tabela 2, corresponde a um aumento mais acentuado do índice de cor a 520nm, que mede a cor vermelha, em relação ao I 420 que mede a cor marrom dos sucos de uva.

Determinação de antocianinas

[0045] A determinação das antocianinas totais no suco macerado e no suco clarificado foi realizada através da leitura da absorbância no comprimento de onda após uma varredura entre os comprimentos de 380 a 700nm (Di Stefano et al., 1989). Os resultados foram obtidos utilizando um coeficiente de extinção molar da antocianina predominante nas frutas, a cianidina 3-glucosídeo, sendo expressos em mg de cianidina-3-glucosídeo, antocianina majoritária, em 100g de amostra.

Tabela 3. Teores de antocianina no suco após maceração e clarificação.

Tratamento	Teor de Antocianina (mg/100g)	
	Suco após maceração	Suco após clarificação
Controle	21,07 ± 1,47 ^b	18,45 ± 0,50 ^b
Preparado comercial*	24,30 ± 0,83 ^a	15,04 ± 0,69 ^c
Extrato enzimático bruto de <i>K. marxianus</i>		
IBKLU013	27,62 ± 2,12 ^a	25,22 ± 2,14 ^a

Legenda da tabela 3: Letras iguais para cada produto não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$). * Novozym®33095 (maceração), Pectinex®Ultra Color (clarificação).

[0046] As pectinases também atuam melhorando as características visuais (cor e turbidez), devido à maior liberação de antocianinas das uvas tintas para o suco. As antocianinas tiveram uma diminuição significativa no tratamento utilizando o preparado enzimático comercial após clarificação do suco. Este valor se deve, provavelmente, ao aumento da diluição das antocianinas, provocada pela ação da enzima pectinase e maceração por tempo prolongado.

Determinação de polifenóis

[0047] O índice de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, através da formação de um complexo azul resultante da oxidação dos fenóis presentes na amostra. A absorbância foi determinada a 765nm em espectrofotômetro (Genesys modelo 10UV) (Singleton e Rossi, 1965). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico em 100g de polpa ou suco de fruta.

Tabela 4. Teor de polifenóis no suco após maceração e clarificação.

Tratamento	Teor de Polifenóis Totais (mg/100g)	
	Suco após maceração	Suco após clarificação
Controle	1952,35 ± 203,68 ^a	1699,52 ± 150,55 ^a
Preparação comercial*	1733,09 ± 98,27 ^b	1509,23 ± 65,76 ^b
Extrato enzimático bruto de <i>K. marxianus</i> IBKLU013	2168,98 ± 195,57 ^a	1924,04 ± 210,50 ^a

Legenda da tabela 4: Letras iguais para cada produto não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$). * Novozym®33095 (maceração), Pectinex®Ultra Color (clarificação)

[0048] Em relação ao teor de polifenóis no suco tanto após maceração quanto após clarificação observam-se resultados mais expressivos com o emprego do extrato enzimático bruto de *K. marxianus* IBKLU013.

Exemplo 3: Maceração de suco de araçá vermelho

[0049] O presente exemplo consiste da utilização de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 na maceração de suco de araçá vermelho.

[0050] Frutos de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foram higienizados e selecionados quanto à sanidade. Durante a etapa de maceração, amostras de aproximadamente 200g das frutas foram trituradas com auxílio de um liquidificador, e tratadas com o preparado enzimático comercial Ultrazym®APF L (Novozymes Latin America Ltda., Brasil) e o extrato enzimático bruto produzido por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013, ambos na concentração de 1U poligalacturonase/mL (PG/mL). Os ensaios foram realizados em banho termostatizado (B. BRAUN BIOTECH modelo Certomat WR, Alemanha), em temperatura de 50 °C por 60 min de reação. As amostras foram resfriadas em banho de gelo, para interromper a reação, e centrifugadas por 10 min, a 3500 rpm e a 20 °C. Foram preparadas amostras controle em que as preparações enzimáticas foram substituídas por água destilada.

Tabela 5: Médias do rendimento, dos índices de cor, intensidade de cor, coloração e turbidez dos produtos obtidos após maceração do araçá vermelho.

Variável	Preparado Enzimático	Extrato enzimático	
	Comercial Ultrazym®APF L	bruto de <i>K. marxianus</i> IBKLU013	Controle
Rendimento (%)	65,28 ± 4,50 ^a	55,81 ± 0,97 ^b	52,14 ± 0,27 ^c
Índice de cor (420)	2,62 ± 0,74 ^a	3,09 ± 0,38 ^a	1,12 ± 0,11 ^b
Índice de cor (520)	1,56 ± 0,04 ^b	2,30 ± 0,29 ^a	0,88 ± 0,08 ^c
Índice de cor (620)	1,12 ± 0,00 ^b	1,46 ± 0,16 ^a	0,22 ± 0,01 ^c
Intensidade de cor	5,31 ± 0,08 ^b	6,85 ± 0,83 ^a	2,22 ± 0,21 ^c
Coloração	1,67 ± 0,43 ^a	1,34 ± 0,00 ^a	1,26 ± 0,00 ^a
Turbidez	0,65 ± 0,06 ^b	2,04 ± 0,25 ^a	2,91 ± 0,66 ^a

Legenda da tabela 5: Letras iguais para cada linha não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$).

Exemplo 4: Clarificação do suco de araçá

[0051] O presente exemplo consiste da utilização de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 na clarificação de suco de araçá vermelho.

[0052] Em um volume de 50 mL de suco araçá vermelho foram adicionadas 1U PG/ml do preparado enzimático comercial Ultrazym®APF L (Novozymes Latin America LTDA, Brasil) ou do extrato enzimático bruto de *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013. Para cada ensaio foram feitas amostras controle isentas de enzimas pectinolíticas. Os ensaios foram conduzidos em um banho termostático (B. Braun Biotech modelo Certomat WR, Alemanha). As demais condições de hidrólise, tempo, temperatura e concentração enzimática, foram as mesmas utilizadas para a etapa de maceração enzimática. Após o tratamento, os sucos foram resfriados em banho de gelo para interromper a ação da enzima e centrifugadas por 10 min, a 3500 rpm e a 20 °C para posterior análise.

Tabela 6: Médias dos índices de cor, intensidade de cor, coloração e turbidez do suco de araçá vermelho após clarificação.

Variável	Preparado Enzimático	Extrato enzimático bruto	
	Comercial Ultrazym®APF L	de <i>K. marxianus</i> IBKLU013	Controle
Índice de cor (420)	0,66 ± 0,03 ^c	1,40 ± 0,06 ^a	1,24 ± 0,11 ^b
Índice de cor (520)	0,59 ± 0,04 ^c	1,04 ± 0,29 ^a	0,88 ± 0,12 ^b
Índice de cor (620)	0,08 ± 0,02 ^c	0,39 ± 0,04 ^b	0,53 ± 0,04 ^a
Intensidade de cor	1,33 ± 0,10 ^b	2,84 ± 0,12 ^a	2,65 ± 0,27 ^a
Coloração	1,11 ± 0,02 ^b	1,34 ± 0,02 ^a	1,40 ± 0,02 ^a
Turbidez	0,42 ± 0,03 ^c	0,83 ± 0,03 ^b	2,13 ± 0,11 ^a

Legenda da tabela 6: Letras iguais para cada linha não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$).

Exemplo 5: Processo de vinificação

[0053] O presente exemplo consiste da utilização de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 na extração de cor no processo produtivo de vinho.

Método de vinificação

[0054] O experimento foi realizado com a uva da variedade *Cabernet Sauvignon*. As uvas foram coletadas, divididas em 2 lotes de 1,2 kg cada, e realizadas as microvinificações com três repetições. Em ambos os lotes, realizou-se a sulfitação (30mg/L de dióxido de enxofre) e a leitura do °Brix e do pH. O meio foi inoculado com uma densidade celular de 5×10^6 UFC mL⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. O mosto foi colocado em frasco Duran e válvula de Miller com capacidade para 1 litro e adicionado extrato enzimático bruto de *K. marxianus* IBKLU013. O primeiro tratamento foi adotado como testemunha, sem adição da poligalacturonase, já no segundo, foram adicionados 0,8U PG/mL de poligalacturonase.

Tabela 7. Médias dos índices de cor, intensidade de cor e coloração dos vinhos obtidos por microvinificações da uva da variedade *Cabernet Sauvignon*.

Variável	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118	+ Extrato enzimático bruto de <i>K. marxianus</i> IBKLU013
Índice de cor (420)	3,08 ± 0,07 ^a	3,19 ± 0,09 ^a
Índice de cor (520)	6,14 ± 0,27 ^b	7,69 ± 0,29 ^a
Índice de cor (620)	0,76 ± 0,02 ^a	0,90 ± 0,14 ^a
Intensidade de cor	9,98 ± 0,04 ^b	11,78 ± 0,24 ^a
Coloração	0,50 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,02 ^b

Letras iguais para cada variável não diferem estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$).

[0055] Foram registrados valores significativamente diferentes para o Índice de cor a 520 nm, sendo o maior valor encontrado no tratamento com a adição de extrato bruto enzimático de *K. marxianus* IBKLU013. De forma semelhante foi observado um aumento significativo na Intensidade de cor (I 420 + I 520 + I 620), com a adição de extrato bruto enzimático de *K. marxianus* IBKLU013 em relação a fermentação sem adição extrato bruto enzimático de *K. marxianus* IBKLU013. Os valores de coloração mostraram-se também com diferença significativa entre os tratamentos, com e sem a adição de extrato bruto enzimático de *K. marxianus* IBKLU013.

[0056] Os versados na arte valorizaram os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Processo de produção de extrato enzimático para extração e/ou clarificação de bebidas **caracterizado por** compreender as etapas de:

a) crescimento de *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013 em meio sintético com pectina como única fonte de carbono;

b) centrifugação do meio após a etapa de crescimento de *Kluyveromyces marxianus* IBKLU013.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** produção de extrato enzimático ser realizada sob temperatura de 28 °C a 32 °C, por 48 horas.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** meio sintético com pectina compreender de 0,5% de extrato de levedura, 0,67% de fonte de nitrogênio e 1% pectina cítrica.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** em que o pH do meio sintético é 5,0.

5. Método de extração e/ou clarificação de bebidas **caracterizado por** compreender a etapa de contatar a bebida com um extrato enzimático obtido através de um processo de produção conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o extrato enzimático apresenta atividade de pelo menos 1U poligalacturonase/mL.

6. Método de extração e/ou clarificação de bebidas, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** etapa de contatar a bebida ser realizada a 50 °C por 60 min.

7. Método de extração e/ou clarificação de bebidas, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado pela** bebida ser um suco de frutas.

8. Método de extração e/ou clarificação de bebidas, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado por** ser utilizado na extração de cor em processos enológicos.