

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

(21) **PI0609166-0 A2**



(22) Data de Depósito: 09/03/2006  
(43) Data da Publicação: 23/02/2010  
(RPI 2042)

(51) *Int.Cl.:*  
C08B 37/06 (2010.01)  
C12P 19/04 (2010.01)  
A23L 1/00 (2010.01)  
A23L 2/00 (2010.01)

(54) Título: **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PECTINA**

(30) Prioridade Unionista: 09/03/2005 US 60/659,936

(73) Titular(es): CARGILL INCORPORATED

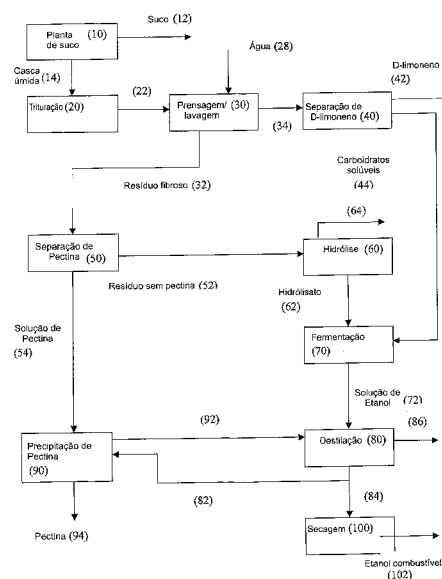
(72) Inventor(es): AHARON M. EYAL, LUCA ZULLO, TODD W. GUSEK

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006008989 de 09/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/096884 de 14/09/2006

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PECTINA. A presente invenção refere-se a um método para obtenção de pectina a partir de um material contendo pectina que envolve tratamento do material contendo pectina com uma enzima que faz com que a pectina seja liberada do material contendo pectina. Enzimas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, enzimas celulase, enzimas hemicelulase e suas misturas. Etanol e isopropanol são álcoois típicos utilizados na recuperação da pectina. É também descrita a pectina através do método e o uso da pectina em alimentos e bebidas.



Pet: 0200 701 57512  
PI: 0609166-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PECTINA**".

**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTES RELACIONADOS**

O presente Pedido de Patente reivindica prioridade do pedido de  
5 patente provisório U.S. co-pendente Nº de Série 60/659.936 depositado em  
9 de março, 2005, cujos conteúdos em sua totalidade são aqui incorporados  
a título de referência.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a um processo para obtenção de  
10 pectina a partir de um material contendo pectina, tal como fruta cítrica.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Um processo comercial para produção de pectina envolve trata-  
mento de uma casca cítrica com um ácido tal como ácido nítrico ou clorídrico  
para atingir um pH de cerca de 2 ou abaixo, e aquecimento por um período  
15 de 1-3 horas. Seguindo este tratamento, os sólidos da casca usados são  
separados do extrato de pectina e isopropanol é adicionado à fração líquida  
para precipitar a pectina. Sólidos de pectina são filtrados do sobrenadante  
líquido. A pectina é então lavada com mais isopropanol antes da secagem.  
O isopropanol coletado é recuperado através de destilação e a casca usada  
20 pode ser seca e queimada para combustível ou peletizada para uso em ra-  
ção animal.

Há, no entanto, uma necessidade contínua quanto a um proces-  
so que possa produzir rendimentos aumentados de pectina a partir de vários  
materiais contendo pectina.

**SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se à obtenção de pectina a partir de  
material contendo pectina. O processo envolve tratamento de um material  
contendo pectina em um meio aquoso com uma enzima para liberar a pecti-  
na do material contendo pectina. O produto resultante é submetido a um mé-  
30 todo de separação para separar resíduos insolúveis da solução de pectina. A  
pectina liberada pode ser então adequadamente recuperada através de  
qualquer técnica convencional, tal como através de contato da solução de

pectina com álcool, tal como, por exemplo, isopropanol ou etanol. Também, a descrição refere-se ao uso da pectina em alimentos e bebidas.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à obtenção de pectina a partir de material contendo pectina. O processo envolve tratamento de um material contendo pectina em um meio aquoso com uma enzima para liberar a pectina do material contendo pectina. O produto resultante é submetido a um método de separação para separar resíduo insolúvel da solução de pectina. A pectina liberada pode ser então adequadamente recuperada através de qualquer técnica convencional, tal como através de contato da solução de pectina com um álcool tal como, por exemplo, isopropanol ou etanol.

O termo material contendo pectina, conforme usado no presente processo, significa qualquer fonte de pectina que possa ser enzimaticamente tratada para liberar a pectina. Exemplar de materiais contendo pectina inclui, mas não está limitado a, qualquer fruta cítrica tal como limas, limões, laranjas, toranjas e tangerinas, ou similar; também adequadas para uso são frutas tropicais tal como goiaba, mamão, maracujá, manga e similar; e outras fontes que são adequadas tal como maçãs, beterrabas, girassóis, soja e similar. Misturas dos materiais contendo pectina podem ser usadas. Em uma modalidade, o material contendo pectina é uma fruta cítrica ou uma maçã. Em uma outra modalidade, o material contendo pectina é a casca de uma fruta, particularmente uma fruta cítrica, onde pelo menos uma porção do líquido foi removida da fruta. Em uma outra modalidade, o material contendo pectina é triturado para um tamanho menor antes do ou durante tratamento com uma enzima no presente processo.

O meio aquoso usado no processo para permitir o tratamento da enzima acontecer pode ser qualquer meio aquoso. Em uma modalidade, o meio aquoso pode ser água. Em uma outra modalidade, o meio aquoso pode ser água acidificada. Em uma outra modalidade, o meio aquoso pode ser água que contém sais orgânicos e inorgânicos, agentes de quelação, íons, agentes de oxidação, agentes de redução e similar. Em ainda uma outra modalidade, o meio aquoso pode ser um meio aquoso reciclado, por exem-

plo, o meio aquoso resultante de recuperação de pectina e destilação de álcool. Sem desejar ser limitado, o meio aquoso usado no processo pode ser uma combinação de um ou mais dos meios aquosos acima mencionados, ou outros meios aquosos. A quantidade de meio aquoso a ser utilizada é qual-  
 5 qualquer quantidade que vá permitir o tratamento do material contendo pectina com a enzima acontecer, para então liberar a pectina do material contendo pectina.

No presente processo, pode ser utilizada uma enzima, ou mistura de enzimas, no tratamento de um material contendo pectina para fazer  
 10 com que a pectina seja liberada. Qualquer quantidade de enzima pode ser usada, contanto que a enzima vá fazer com que a pectina seja liberada. Em uma modalidade, 20 UI (unidades internacionais) por g de sólidos de casca secos a 210 UI por g de sólidos de casca secos podem ser usados, onde uma UI libera um micromol de açúcar de redução (expresso como equivalen-  
 15 te de glicose) em um minuto sob condições de ensaio de pH 4,8 e 50°C. Exemplar de enzimas adequadas são enzimas celulasas e hemicelulasas, individualmente ou em combinação. Em uma modalidade, exemplos de celulasas que são adequadas para uso no presente processo incluem, mas não estão limitados a, endoglucanases, exoglucanases, celobioidrolases, e simi-  
 20 lar, e suas misturas. Exemplar de hemicelulasas que são enzimas adequadas para uso no presente processo para liberar pectina do material contendo pectina inclui, mas não está limitado a, xiloglicosidases, xilosidases, fucosidases, galactosidases, endoglucanases, manosidases, glucuronidases, ferulil estearases, endoxilanases, acetil xilan esterases, xilanases, arabinofuranosidases, e similar, e suas misturas. Dentre as muitas enzimas adequadas  
 25 para uso aqui, as que seguem são exemplares:

Disponíveis da AB Enzymes GmbH, de Feldbergstrasse 78, D-64293, Darmstadt, Alemanha, são as enzimas Ecostone, Biotouch, Rohament, Veron CP, Ecopulp, Econase e Veron 191;

30 Disponíveis da Genencor International, de 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1013 são as enzimas Multifect A40, Multifect xylanase, Optimash BG, Spezyme CP e GC 220;

Disponíveis da Novozymes A/de Krogshoejvej 36 2880 Bagsvaerd, Dinamarca, são as enzimas Cellusoft, Celluzyme, Cellulast, Fungamyl, Viscozyme, Alcalase 2.4L FG, Novozym FM 2.0L e similar;

Disponíveis da Dyadic International, de 140 Intracoastal Pointe Drive, Suite 404, Jupiter, Florida, 33477-5094, são as enzimas Rocksoft, Cellustar, Viscostar, Fibrezyme, Brewzyme, acid cellulase Nº 1, acid cellulase Nº 2, neutral cellulase Nº 1, neutral cellulase Nº 2 e beta-glucanase BPC e similar;

Disponível da Valley Research DA 3502 North Olive Road, South Bend, IN 46628, são as enzimas Cellulase 4000, Validose e similar;

Disponíveis da Deerland Enzymes, do 1680 Roberts Blvd., Suite 406, Kennesaw, GA 30144, são as enzimas Cellulase TR, Pentosanase e similar;

Disponíveis da Lyven, da Zac Normandial-11, Avenue du pays de Caen, 14460, Columbelles, França são as enzimas Cellulyve e similar;

Disponíveis da Enmex, da Rio Lerma No. 228 Fracç, Ind. San Nicolas Tlalnepantla, Edo. De Mexico 54030 México, são as enzimas Stonezyme e similar;

Disponíveis da Maps (Índia) Limited, da 302, Shapath-3, Near GNFC Info Tower, S.G. Road, Ahmedabad, 380054, Índia, são as enzimas Palkofeel, Palkosoft, Palkobake e similar;

Disponíveis da Bio Sun são as enzimas Biocitruzyme, Cellulase FG e similar;

Disponíveis da Biocatalyst são as enzimas Depol 740 L, Cellulase 13L-CO12L, Depol 692 L e similar;

Disponíveis da Lucigen Corporation, 2120 West Greenview Drive Suite 9, Middleton, WI 53582 são Cornblaster HE-I e Cornblaster HE-3.

Conforme mencionado aqui qualquer uma das enzimas adequadas para uso aqui para liberação de pectina a partir do material contendo pectina pode ser usada individualmente ou em combinação.

No presente processo, uma quantidade suficiente de um meio aquoso está presente para permitir que o tratamento enzimático do material

contendo pectina aconteça, deste modo para liberar a pectina do material contendo pectina e então formar uma solução de pectina. Tipicamente, o meio aquoso está presente em uma razão em peso de cerca de 300 partes de meio aquoso para cerca de 1 parte de pectina que está presente no material contendo pectina. Em uma modalidade, a quantidade de meio aquoso varia de a partir de cerca de 150 partes de meio aquoso a cerca de 1 parte de pectina no material contendo pectina. Em uma outra modalidade, a quantidade de meio aquoso utilizada varia de a partir de cerca de 75 partes de meio aquoso a cerca de 1 parte de pectina no material contendo pectina. Em uma modalidade ainda adicional, a quantidade de meio aquoso a ser utilizada no processo varia de a partir de cerca de 50 partes de meio aquoso a cerca de 1 parte de pectina no material contendo pectina.

No presente processo, qualquer quantidade de meio aquoso pode estar presente com o material contendo pectina para atingir liberação da pectina e então formar uma solução de pectina. Em uma modalidade, o meio aquoso é adicionado ao material contendo pectina. Sem desejar ser limitante, qualquer quantidade de meio aquoso pode ser adicionada ao material contendo pectina antes do ou durante o tratamento da enzima, para auxiliar na recuperação e processamento da pectina liberada, por exemplo, para ajustar a viscosidade da solução de pectina resultante.

Conforme aqui indicado, se desejado, o material contendo pectina pode ser triturado através de qualquer método convencional para reduzir o tamanho do material contendo pectina, antes do ou durante o tratamento da enzima. Pode ser também vantajoso triturar o material contendo pectina antes da, ou após a, adição de um meio aquoso ao material contendo pectina.

Em uma modalidade, o tratamento enzimático do material contendo pectina é realizado sob condições ácidas. Em uma outra modalidade, a condição ácida do processo é mantida em um pH menor do que cerca de 7; em uma outra modalidade em um pH de menos do que cerca de 5; e em ainda uma modalidade adicional em um pH de menos do que cerca de 4. Tipicamente, o pH não será menor do que cerca de 2.

Em uma modalidade, o tratamento enzimático do material contendo pectina é realizado aqui em qualquer temperatura que resulte na pectina sendo liberada do material contendo pectina. Em uma modalidade, o tratamento enzimático é obtido em uma temperatura menor do que cerca de 100°C; em uma outra modalidade, em uma temperatura menor do que cerca de 80°C; e em uma modalidade adicional, em uma temperatura menor do que cerca de 60°C. Tipicamente, a temperatura não será menor do que cerca de 0°C.

Em uma modalidade, o tratamento enzimático do material contendo pectina é realizado por qualquer período de tempo que seja suficiente para permitir que a pectina seja liberada do material contendo pectina. Em uma modalidade, o tratamento enzimático do material contendo pectina é realizado por um período de tempo de menos do que 72 horas; em uma outra modalidade, por um período de menos do que 24 horas, em uma outra modalidade, por um período de menos do que cerca de 12 horas; e em uma modalidade adicional, por um período de menos do que cerca de 6 horas. Tipicamente, o período de tempo não será menos do que cerca de 1 hora.

O tratamento enzimático do material contendo pectina dá um produto que é, em geral, compreendido de resíduo insolúvel e uma solução de pectina compreendendo pectina liberada em um meio aquoso. O produto resultante pode então ser submetido a qualquer técnica convencional para separar a solução de pectina do resíduo insolúvel. Métodos típicos para separação da solução de pectina do resíduo insolúvel são filtração, centrifugação e similar.

Subseqüentemente, a pectina pode ser recuperada através de contato da solução de pectina do processo com um álcool tal como etanol ou isopropanol.

Em uma outra modalidade, o material contendo pectina pode ser pré-tratado para estabilizar o material contendo pectina. Em tal modalidade, o material contendo pectina é tratado para inativar enzimas, tal como pectina metilesterases, para estabilizar o material contendo pectina. Em uma modalidade, o material contendo pectina é uma fruta cítrica ou uma maçã da qual

pelo menos uma porção do líquido da fruta foi removida. Em uma outra modalidade, o material contendo pectina é uma casca. Pré-tratamento da casca estabiliza a casca contra deterioração pelas enzimas presentes na casa. O pré-tratamento acontece antes do tratamento enzimático do material contendo pectina para liberar a pectina.

Inativação das enzimas no material contendo pectina pode ser conseguida usando qualquer técnica conhecida. Por exemplo, em uma modalidade, o material contendo pectina pode ser curado com água quente, em uma temperatura de cerca de 80 a cerca de 100°C por cerca de 3 a 5 minutos. Em uma outra modalidade, o pré-tratamento de inativação de enzima pode ser obtido através de aquecimento usando quaisquer meios convencionais, tal como uma injeção de vapor modificada, extrusão, vapor pressurizado ou explosão de vapor, aplicação de radiofrequência, energia de micro-ondas, energia acústica tal como ultra-som ou alta pressão.

A pectina produzida aqui pode ser usada na produção de alimentos e bebidas.

#### OUTRAS MODALIDADES DA INVENÇÃO

O que segue relaciona-se a outras modalidades da invenção. Em particular, uma outra modalidade refere-se a um método para processamento de fruta que provê produção de etanol a partir da parte de não-suco da fruta cítrica. O etanol resultante poderia ser então usado no processo para obtenção de pectina descrito aqui, e provê uma vantagem econômica. Uma descrição de várias das modalidades é como segue:

- (A) Um método para processamento de fruta cítrica compreendendo:
- a. extração de suco da fruta para formar um produto de suco e um resíduo
  - b. seletivamente converter um resíduo compreendendo um material celulósico e um material pectínico em produtos, conversão que é caracterizada em:
    - i. conversão de pelo menos cerca de 20% do material celulósico em um carboidrato solúvel em água e/ou seu produto (por exemplo, para fermentação sem destruição substancial

de pectina), e

- ii. que pelo menos cerca de 10% do material de pectina são mantidos em um peso molecular de pelo menos 10.000 Dáltons (alternativamente: mantidos em uma forma tendo menos do que cerca de 5% de solubilidade em uma solução aquosa-etanol compreendendo pelo menos 10% de etanol).

5

O método de A, onde a fruta cítrica é selecionada de um grupo consistindo em laranjas, toranja, limões, limas, tangerinas e similar.

- O método de A, onde extração compreende o uso de equipamento tal como um extratores tipo espremedor (por exemplo, FMC) e extratores tipo escareador (por exemplo, Brown) e similar.

10

O método A, onde o resíduo compreende pelo menos um de casca, bagaço, núcleo, polpa, membranas, fritos e similar da fruta cítrica.

15

O método A, onde o resíduo é selecionado mais de um grupo consistindo em polpa ou núcleo lavado úmido resultante de um sistema de lavagem de polpa ou núcleo, e fritos, partículas de casca e sedimento resultantes de um sistema de recuperação de óleo.

- (B) O método de A, onde conversão de material celulósico compreende hidrólise.

20

O método de B, onde hidrólise forma açúcares solúveis em água tal como glicose, celobiose, arabinose, xilose, etc. (por exemplo, da hidrólise de hemicelulose).

25

- (C) O método de B, onde a hidrólise ou conversão é facilitada por um catalisador químico, tal como um composto ácido e/ou por um catalisador biológico, tal como um organismo e/ou enzima (ou mistura de diferentes enzimas) com atividade celulase.

O método de C, onde o catalisador é biológico.

30

- (D) O método de A, onde conversão de material celulósico compreende fermentação de pelo menos um hidrolisato de celulose para pelo menos um produto de fermentação.

- (E) O método de A, onde o componente resíduo também compreende pelo menos um carboidrato solúvel em água, compreendendo ainda uma

etapa de fermentação do carboidrato solúvel em água para pelo menos um produto de fermentação.

- 5 (F) O método de D e E, onde fermentação de pelo menos um hidrolisato de celulose e fermentação de pelo menos um carboidrato solúvel em água são conduzidas simultaneamente, de preferência no mesmo recipiente.

O método de D, E e F, onde o produto de fermentação é selecionado de um grupo consistindo em etanol, ácidos orgânicos, aminoácidos, sais de qualquer um desses ácidos, proteínas, carotenóides, enzimas e proteína de célula única.

- 10 (G) O método de A compreendendo ainda uma etapa de separação de material pectínico a partir de um componente resíduo.

O Método de G, onde separação compreende contato com um material ácido ou é biologicamente catalisada com uma enzima ou organismo adequado.

O método de G, onde separação forma um meio aquoso contendo o material de pectina e pelo menos cerca de 30% do material celulósico.

- 20 (H) O método de A, onde um componente resíduo compreende pelo menos um carboidrato solúvel em água, compreendendo ainda uma etapa de separação de pelo menos um carboidrato solúvel em água.

O método de H, onde separação compreende pelo menos um de pressionamento e contato com água ou com uma solução aquosa tal como cal ou solução ácida.

- 25 (I) O método de A, onde um componente resíduo compreende um material graxo tal como D-limoneno e óleo da casca, compreendendo ainda uma etapa de separação do material graxo.

O método de I, onde separação compreende pelo menos um de destilação, extração de solvente, desmulsificação e tratamento de enzima.

- 30 (J) O método de A, onde um componente resíduo compreende pelo menos um composto fenólico compreendendo ainda uma etapa de separação do pelo menos um composto fenólico.

O método de J, onde o composto fenólico é hesperidina e/ou um

outro flavonóide.

- (K) O método de A, onde um componente resíduo compreende pelo menos um de carotenóide, pigmento, essência, componente de aroma e glicosídeo limonóide, compreendendo ainda uma etapa de separação de pelo menos um carotenóide, pigmento, essência, componente de aroma e glicosídeo limonóide.

O método de K, onde separação compreende pelo menos um de extração (por exemplo, usando D-limoneno, etanol e/ou suas misturas como um extrator), destilação, precipitação, precipitação auxiliada por solvente, separação cromatográfica e separação de membrana.

O método de A, onde um material insolúvel em água é deixado após a etapa (b), compreendendo ainda uma etapa de separação de tal material insolúvel em água.

- (L) O método de A compreendendo as etapas de separação a partir de um material de resíduo de pelo menos um material de pectina, um carboidrato solúvel em água, D-limoneno, um composto fenólico, carotenóide, pigmento, essência, componente de aroma e glicosídeo limonóide e onde a separação é realizada antes da etapa (b), simultaneamente com ela, após ela ou após separação de material insolúvel em água.

- (M) O método de L compreendendo fermentação de pelo menos um produto, onde a separação e a fermentação são conduzidas em qualquer ordem ou simultaneamente.

- (N) O método de L ou M compreendendo as etapas de separação a partir de um material de resíduo de pelo menos dois materiais de pectina, um carboidrato solúvel em água, D-limoneno, um composto fenólico, carotenóide, pigmento, essência, componente de aroma e glicosídeo limonóide e onde separação de pelo menos um desses, separação de pelo menos um outro desses, etapa (b), separação de material insolúvel em água residual e/ou fermentação são realizadas em qualquer ordem ou simultaneamente.

O método de L, M e N, onde separação de materiais solúveis é realizada após a etapa (b) e após separação de material insolúvel em água

residual.

(O) O método de A compreendendo ainda a etapa de precipitação de um material pectínico a partir de um meio aquoso.

5 (P) O método de O, onde o meio aquoso compreende pelo menos um de etanol, um sal de alumínio, um sal de ferro e um íon de cálcio.

O método de P, onde o meio aquoso é formado através da fermentação de carboidratos em um meio aquoso compreendendo um material pectínico usando para este propósito um organismo sem nenhuma atividade de pectinase ou com baixa atividade de pectinase.

10 O método de P, onde o meio aquoso é formado através da adição de etanol a um meio aquoso compreendendo um material pectínico.

(Q) O método de A, onde o produto de fermentação é etanol e onde o etanol é separado das correntes de processo e concentrado através de destilação.

15 O método de Q, onde o etanol concentrado é seco, por exemplo, através de um método tal como contato com peneira molecular.

(R) Um método para a fabricação de etanol e pectina compreendendo as etapas de:

20 provisão de material de casca de citros compreendendo pectina e carboidrato;

fermentação dos carboidratos de material de casca de citros para formar pelo menos um produto de fermentação,

25 geração de um meio aquoso compreendendo pectina e etanol; e separação do etanol e da pectina a partir do meio aquoso (por exemplo, e usando o etanol separado para auxiliar na recuperação da pectina).

O método de R compreendendo ainda fermentação de açúcar *in situ* (por exemplo, fermentação de açúcares na presença de pectina).

30 (S) O método de R compreendendo ainda uma etapa de formação de uma solução aquosa de carboidratos.

O método de S, onde formação da solução aquosa envolve pelo menos um de separação de carboidratos solúveis em água e hidrólise de um

material celulósico.

- (T) Os métodos anteriores compreendendo a etapa de tratamento de um componente resíduo ou um material de casca de citros antes da conversão, extração de carboidrato solúvel e/ou hidrólise de carboidratos insolúveis em água.

5

O método de T, onde tratamento envolve pelo menos um de trituração, tratamento com uma solução de cal, ou uma solução ácida, destilação ou destilação com vapor de componentes voláteis tal como óleo da casca e separação de pelo menos um de pectina, D-limoneno, hesperidina (por exemplo, para a produção de adoçante de alta intensidade), carotenóide, pigmento, essência, glicosídeo limonóide e componente de aroma.

10

O método de R, onde fermentação é de uma solução aquosa compreendendo carboidratos e pectina.

O método de R, onde o pelo menos um produto de fermentação é etanol.

15

- (U) Os métodos anteriores, onde um componente não-fermentado do material de casca de citros é usado para energia.

- (V) Os métodos anteriores, onde um componente não-fermentado do material de casca de citros é usado como um ingrediente em ração animal, por exemplo, combinado (e seco) com péletes de polpa de citros (CPP).

20

- (W) Os métodos anteriores, onde um componente não-fermentado e um produto de fermentação do material de casca de citros são usados como ingredientes em ração animal, por exemplo, combinados (e secos) com CPP.

25

- (X) Os métodos anteriores, onde pelo menos um carboidrato resultante do material de resíduo (por exemplo, separado ou formado em hidrólise) é separado e usado para aplicações comerciais, por exemplo, como um adoçante.

30

O método de X, onde separação usa pelo menos um método cromatográfico e precipitação de materiais de não-carboidrato.

- (Y) Um método compreendendo as etapas de:

- provisão de material de casca de citros;  
 extração de carboidratos solúveis em água a partir do material de casca de citros para formar uma solução aquosa de carboidratos solúveis em água e um resíduo fibroso e separação entre a solução e o resíduo;
- 5                   solubilização da pectina no material fibroso para formar um meio aquoso compreendendo pectina e um segundo resíduo e separação do meio aquoso a partir do segundo resíduo;
- hidrólise de carboidratos insolúveis em água no segundo resíduo para formar uma solução de hidrolisato;
- 10                  fermentação de carboidratos em pelo menos um da solução aquosa da etapa (b) e o hidrolisato da etapa (d) para formar etanol;
- uso do etanol para precipitar pectina a partir do meio aquoso contendo pectina da etapa (c) e
- destilação do etanol.
- 15    (Z)   Um método compreendendo as etapas de:
- a.    provisão de material de casca de citros;
- b.    hidrólise de carboidratos insolúveis em água no material de casca de citros para formar uma solução aquosa compreendendo carboidratos e pectina
- 20           c.    fermentação de carboidratos na solução aquosa em etanol
- d.    precipitação de pectina (por exemplo, com etanol) a partir da solução aquosa e
- e.    destilação do etanol.
- (AA) Os métodos anteriores onde uma solução compreendendo
- 25           ácido galacturônico e/ou seu sal é formada, compreendendo ainda a etapa de conversão do ácido ou do sal em ácido ascórbico.
- (BB) Uma preparação de carboidratos contendo pelo menos um de sacarose, frutose e glicose produzidos de acordo com
- 30           qualquer um dos métodos acima.
- (CC) Um produto de pigmento e/ou aromatizante e/ou de essência produzido de acordo com qualquer um dos métodos aci-

ma. O pigmento é compreendido de composto carotenóide e similar. Aromatizantes e essências são compreendidos de álcoois, aldeídos, ésteres, hidrocarbonos e compostos similares.

- 5 (DD) Uma fibra alimentar produzida a partir de um produto componente não-fermentado de acordo com qualquer um dos métodos acima. A fibra alimentar é compreendida de um complexo de carboidratos incluindo pectinas, celulose e hemicelulose ambos solúveis e insolúveis em água. A fibra a-
- 10 limentar pode também compreender proteína.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é um fluxograma de um método para processamento de fruta cítrica de acordo com uma modalidade exemplar.

- 15 A figura 2 é um fluxograma de um método para processamento de fruta cítrica de acordo com uma modalidade alternativa da presente invenção.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES ALTERNATIVAS DA INVENÇÃO

- 20 De acordo com um método para processamento de fruta cítrica para separar pectina e produzir um álcool (por exemplo, etanol), suco é extraído da fruta cítrica, deixando um resíduo compreendendo componentes de não-suco da fruta (referido a seguir como "resíduo"). Qualquer fruta cítrica é adequada, por exemplo, laranjas, toranja, limões, limas, tangerinas e similar. Extração de suco pode usar equipamento bem-conhecido da indústria de
- 25 suco, tal como extratores tipo espremedor (por exemplo, FMC) e extratores tipo escareadores (por exemplo, Brown). De acordo com uma outra modalidade, todo o resíduo é tratado no processo e nenhuma separação de componentes de resíduo acontece antes do processo. De acordo com uma modalidade alternativa, frações selecionadas do resíduo são tratadas separa-
- 30 damente, por exemplo, quando recuperação de um componente é desejada e onde este componente é concentrado em frações selecionadas. O material tratado é referido a seguir como "componente de resíduo". De acordo com

uma outra modalidade, o resíduo é cominuído, por exemplo, triturado antes de tratamento adicional.

De acordo com uma modalidade exemplar, o componente resíduo compreende um material celulósico e um material hemicelulósico e um material de pectina (ou "pectináceo") e é seletivamente convertido em produtos. De acordo com uma modalidade, uma fração significativa do material celulósico é convertida em carboidratos solúveis em água e/ou pelo menos um produto deles. A fração é pelo menos cerca de 20%, adequadamente pelo menos cerca de 40%, mais adequadamente pelo menos cerca de 60%. De acordo com uma modalidade, uma fração significativa do material pectínico não é hidrolisada, ou de outro modo convertida em produtos de peso molecular menor do que cerca de 10.000 Dáltons. Alternativamente, uma fração significativa do material pectínico é mantida em uma forma tendo menos do que cerca de 5% de solubilidade em uma solução aquosa-etanol compreendendo pelo menos 10% de etanol.

De acordo com uma outra modalidade, o material celulósico do componente resíduo é hidrolisado em glicose. Qualquer catalisador seletivo de celulose poderia ser usado para facilitar a hidrólise, por exemplo, um catalisador químico (por exemplo, um material ácido) ou um catalisador biológico (uma enzima e/ou um organismo com atividade celulase). O termo "seletivo" conforme usado na presente invenção refere-se à habilidade do catalisador em hidrolisar material celulósico. O catalisador é selecionado de modo que ele hidrolise eficientemente material celulósico. Particularmente atraentes são catalisadores biológicos de alta atividade de celulase. Enzimas endógenas poderiam ser também usadas.

De acordo com uma modalidade alternativa, o material celulósico do componente resíduo é convertido em pelo menos um produto de fermentação, por exemplo, por organismos capazes de hidrolisá-lo e fermentação do hidrolisato. Fermentação poderia (também) ser de hidrolisato formado através de um outro método (por exemplo, usando hidrólise química ou enzimaticamente catalisada) e/ou carboidratos solúveis em água presentes no material resíduo.

Um ou mais produtos de fermentação poderiam ser formados usando um organismo de fermentação e condições de fermentação adequadas. Tais produtos podem incluir etanol (por exemplo, para bebidas e/ou combustível), ácido cítrico (para alimento e aplicação industrial), ácido acético (por exemplo, para ração e descongelamento), vários outros ácidos carboxílicos, aminoácidos, sais de qualquer um de ácido cítrico, acético, carbóxico e amino, proteínas e proteínas de célula única (por exemplo, para aplicações de ração), carotenóides e enzimas (por exemplo, celulase). Produtos preferido são selecionados com base em necessidades comerciais. De acordo com uma outra modalidade, pelo menos uma fração dos carboidratos é fermentada em um álcool (por exemplo, etanol), ácido acético e/ou ácido cítrico ou um aminoácido.

De acordo com uma outra modalidade, carboidratos solúveis em água são separados do material resíduo antes da etapa de conversão ou simultaneamente com ela. Tal separação pode usar pelo menos um método tal como tratamento enzimático, pressionamento e extração com água, com uma solução aquosa ou com uma solução de cal ou com uma solução ácida. De acordo com uma outra modalidade, carboidratos separados são combinados com produtos de hidrólise de celulose antes da fermentação. De acordo com uma modalidade alternativa, esses são fermentados separadamente.

De acordo com uma modalidade alternativa, material pectínico é separado de um componente resíduo, por exemplo, através de contato com um material ácido ou com uma enzima adequada, e forma um meio aquoso contendo o material pectínico e menos do que cerca de 30% do material de celulose. No caso separação usa um contato com um ácido, as condições de acordo com uma outra modalidade são de pH na faixa entre cerca de 1 e cerca de 2,5, uma temperatura entre cerca de 50°C e cerca de 130°C e tempo de residência entre cerca de 1 e 200 minutos. Embora tal separação pudesse ser feita em qualquer estágio, conduzi-la antes da conversão do material celulósico permite o uso de meios mais eficientes para conversão de material celulósico, sem converter mais material pectínico em formas de peso

molecular menor do que desejado.

O material resíduo compreende tipicamente vários componentes de valor comercial relativamente alto. Esses incluem D-limonenos (por exemplo, a serem usados como um solvente ou biocida); compostos fenólicos de valor nutracêutico e/ou uns que provejam precursores para outros produtos atraentes (por exemplo, hesperidina); carotenóides, pigmentos, componentes de aroma, essências e glicosídeos limonóide. De acordo com uma outra modalidade, esses componentes ou alguns deles são separados do material de resíduo em qualquer estágio adequado do processo (por exemplo, antes da conversão de material celulósico, após ela ou simultaneamente com ela). Separação de tais compostos pode usar métodos conhecidos, tal como tratamento enzimático, extração, cristalização, destilação, precipitação, adsorção, separação de membrana, troca de íon, extração de solvente (por exemplo, com D-limoneno, etanol e/ou sua mistura), etc.

De acordo com uma outra modalidade, pectina é produzida a partir do componente resíduo. Pectina é dissolvida em água, solução aquosa ou em uma das correntes de processo, por exemplo, através da ação de um ácido ou uma enzima adequada, para formar um meio aquoso contendo-a. Embora vários métodos possam ser usado para separá-la, precipitação é preferida. De acordo com uma outra modalidade, precipitação é facilitada pela existência de solvente na solução, por exemplo, um alanol, por exemplo, etanol ou isopropanol ou acetona. Etanol poderia ser formado na solução através da fermentação de carboidrato ou adicionado a partir de outra fonte. De acordo com uma modalidade alternativa, pectina é separada através da adição de pelo menos um de sal de alumínio, sal de ferro, sal de cálcio e base de cálcio. Opcionalmente, a solução compreendendo pectina é concentrada antes da precipitação, por exemplo, usando métodos tal como microfiltração, ultrafiltração, osmose reversa e evaporação de água. A pectina separada poderia ser purificada mais, por exemplo, através de sua lavagem com soluções de água-alanol e secas, por exemplo, com ar quente.

Etanol formado através de fermentação é separado do licor de fermentação e de outras correntes, tal como a solução contendo etanol dei-

xada após precipitação de pectina. Separação e concentração usam destilação de acordo com uma outra modalidade. O etanol separado e concentrado poderia ser seco, por exemplo, através de contato com peneiras moleculares. Os componentes não-voláteis do licor de fermentação apresentam um  
5 ingrediente alimentício atraente e poderiam ser usados para aumentar a qualidade da ração e outros componentes da ração, incluindo frações insolúveis do processo e CPP.

De acordo com uma outra modalidade do método para processamento de uma fruta cítrica, etanol e pectina são produzidos a partir do material resíduo (também referido aqui como material de casca de citros). De  
10 acordo com uma outra modalidade, suco é extraído da fruta e separado do material de casca de citros residual, que compreende pectina e carboidratos. Esses carboidratos são fermentados (do jeito que são ou após tratamento adicional, tal como hidrólise) para formar pelo menos um produto de fermentação. De acordo com uma outra modalidade, o processo também compreende  
15 geração de um meio aquoso compreendendo pectina e etanol e separação de etanol e pectina a partir do meio aquoso.

De acordo com uma modalidade do método, um material não-fermentado é usado para energia, como um ingrediente em ração ou como  
20 uma fibra alimentar. Tal material pode incluir fibra não-hidratada e resíduos de destilação de etanol. No caso de uso em ração, outros componentes poderiam ser adicionados, por exemplo, produtos de fermentação.

De acordo com uma modalidade do processo, carboidratos separados do resíduo e/ou formados em hidrólise são separados e usados  
25 como adoçantes. Métodos de separação podem incluir separação e/ou precipitação cromatográfica de materiais insolúveis incluindo materiais não-carboidrato.

De acordo com uma modalidade do método, o material resíduo ou o material de casca de citrops é tratado, antes da conversão ou simultaneamente com ela, com pelo menos um método de trituração, tratamento  
30 com calor, extrusão, tratamento com uma solução de cal, uma solução ácida, tratamento enzimático, destilação ou destilação com vapor de compo-

nentes voláteis tal como óleo de casca e separação de pelo menos um de pectina, D-limoneno, hesperidina, carotenóide, pigmento, essência, glicosídeos limonóide e componente de aroma.

A figura 1 mostra um fluxograma de uma modalidade exemplar de um método para processamento de fruta cítrica para separar pectina e produzir um álcool (por exemplo, etanol). Uma planta de suco cítrica (10) gera suco (12) e casca úmida (14) como o subproduto principal. De acordo com uma modalidade do método, a casca úmida junto com outros subprodutos tal como bagaço, núcleo, polpa, membranas, frits e similar é triturada ou moída em (20), usando métodos tal como moagem com martelo para formar casca úmida triturada (22). A casca úmida triturada compreende carboidratos solúveis em água, tal como sacarose, glicose e frutose e carboidrato insolúveis em água (polissacarídeos), tal como celulose e hemicelulose. Ela compreende também pectina, flavonóides, ácidos orgânicos, pigmentos, aromas, essências, vitaminas e D-limoneno, de acordo com uma outra modalidade. Carboidratos solúveis são extraídos de acordo com uma outra modalidade da casca (30) para formar uma solução aquosa de carboidratos solúveis (34) e um resíduo fibroso (32), que são separados. Extração pode envolver pressionamento da casca úmida ou contato da casca úmida com pH ajustado com adição possível de água fresca em uma temperatura adequada e várias combinações desses.

A corrente (34) contém D-limoneno de acordo com uma outra modalidade, e pode ser tratada para a separação de D-limoneno para aplicação comercial. A separação (40) pode usar um método tal como destilação, extração de solvente e desmulsificação. De acordo com uma outra modalidade, etanol ou um outro solvente orgânico é usado para extração de D-limoneno. De acordo com uma outra modalidade, D-limoneno é separado através de desmulsificação, que pode ou não ser auxiliada pelo uso de agentes químicos adequados. Alternativamente, D-limoneno é deixado na solução aquosa (34) e é separado em uma etapa posterior, por exemplo, após fermentação (70).

O resíduo fibroso (32) é tratado, de acordo com uma outra mo-

dalidade, para separação de pectina (50). Separação de pectina pode ser realizada através de contato dela com uma solução ácida. Qualquer ácido relativamente forte é adequado. De acordo com uma outra modalidade, separação é feita em pH de cerca de 2 e cerca de 80°C durante cerca de 2-3  
5 horas. Um meio aquoso compreendendo pectina (54) é formado e separado do resíduo fibroso sem pectina (52).

O resíduo fibroso sem pectina (52) é hidrolisado (60), de acordo com uma outra modalidade, para formar um hidrolisato compreendendo carboidratos fermentáveis (62). Hidrólise é facilitada, de acordo com uma outra  
10 modalidade, usando um catalisador químico, tipicamente um ácido, e temperatura elevada. De acordo com uma modalidade alternativa, um catalisador biológico é usado, por exemplo, uma enzima ou uma mistura de enzimas tendo atividade de celulose. Opcionalmente, catalisadores químicos e biológicos são combinados, por exemplo, hidrólise ácida seguido por hidrólise  
15 enzimática. De acordo com uma modalidade do processo, a hidrólise do resíduo sem pectina o converte completamente em componentes solúveis. Alternativamente, parte dele é deixada insolúvel. De acordo com uma outra modalidade, esses insolúveis são separados da corrente de hidrolisato (62) e de uma corrente de insolúveis (64). Esses insolúveis são de uso comercial,  
20 por exemplo, como um ingrediente na ração e/ou para geração de energia. De acordo com uma outra modalidade, esses insolúveis são misturados com casca úmida para formar péletes de polpa de citros (CPP).

De acordo com uma modalidade exemplar conforme mostrado na figura 1, carboidratos extraídos (44) e carboidratos formados em hidrólise  
25 (62) são fermentados (70) para formarem um produto de fermentação (72). De acordo com uma outra modalidade, hidrólise enzimática do resíduo é combinada com fermentação, por exemplo, conduzida no mesmo recipiente. Vários produtos de fermentação poderiam ser formados e mais de um produto de fermentação é gerado de acordo com uma outra modalidade. Etanol é  
30 um produto de fermentação de pelo menos parte do carboidrato nas correntes (44) e/ou (62), de acordo com uma outra modalidade. A solução de etanol formada (caldo) pode ser purificada usando técnicas de separação co-

nhecidas, tal como destilação (80), formando uma solução de etanol concentrada (84). Os componentes não-voláteis do caldo de fermentação (86) são adequados como ingredientes de ração e/ou para outras aplicações, tal como para geração de energia. De acordo com uma outra modalidade, esses

5 componentes não-voláteis são misturados com casca úmida para formarem péletes de polpa de citros (CPP) de valor melhorado. A solução de etanol concentrada poderia ser seca (100), por exemplo, em peneiras moleculares, para formar etanol de grau de combustível (102).

De acordo com uma modalidade exemplar conforme mostrado

10 na figura 1, pectina (94) é separada da solução aquosa contendo-a (90). De acordo com uma outra modalidade, etanol concentrado é usado para facilitar a precipitação de pectina. Uma corrente de solução de etanol concentrada (82) pode ser misturada com a corrente contendo pectina (54), com o que pectina precipita e é separada da solução aquosa, que contém etanol (92).

15 Este etanol poderia ser separado da solução através de destilação.

A figura 2 mostra um fluxograma de uma modalidade alternativa. Uma planta de suco cítrica (10) gera suco (12) casca úmida e outros subprodutos conforme descrito anteriormente (14). De acordo com uma modalidade do método, a casca úmida é triturada ou moída em (20), usando métodos tal como um moedor de martelo e formando casca úmida triturada como

20 o subproduto predominante (22). A casca úmida triturada compreende carboidratos solúveis em água, tal como sacarose, glicose e frutose e carboidratos insolúveis em água (polissacarídeos), tal como celulose e hemicelulose. Ela também compreende pectina e D-limoneno, de acordo com uma outra modalidade.

25

A casca úmida triturada (22) é hidrolisada (110), de acordo com uma outra modalidade, para formar um hidrolisato compreendendo carboidratos fermentáveis (114). Esses carboidratos fermentados incluem produtos de hidrólise de carboidratos insolúveis e, de acordo com uma outra modalidade, também carboidratos solúveis presentes inicialmente na casca úmida

30 triturada. Hidrólise é facilitada, de acordo com uma outra modalidade, usando um catalisador químico, tipicamente um ácido, e temperatura elevada. De

acordo com uma modalidade alternativa, um catalisador biológico é usado, por exemplo, uma enzima ou mistura de enzimas tendo atividade de celulase. Opcionalmente, catálises química e biológica são combinadas, por exemplo, hidrólise ácida seguido por hidrólise enzimática. As condições em  
5 hidrólise são escolhidas, de acordo com uma outra modalidade, de modo que hidrólise é seletiva no sentido de que pectina não hidrolisa ou de modo que sua hidrólise é limitada. Catálise enzimática é adequada para tal hidrólise seletiva.

De acordo com uma modalidade do processo, a hidrólise da  
10 casca úmida triturada a converte completamente em componentes solúveis. Alternativamente, parte dela é deixada como insolúveis. De acordo com uma outra modalidade, esses insolúveis são separados da corrente de hidrolisato (114) e formam uma corrente de insolúveis (112). Esses insolúveis são de uso comercial, por exemplo, como um ingrediente em ração e/ou para gera-  
15 ção de energia. De acordo com uma outra modalidade, esses insolúveis são misturados com casca úmida para formarem péletes de polpa de citros (CPP).

A corrente de hidrolisato (114) contém D-limoneno de acordo com uma outra modalidade, e pode ser tratada para a separação de D-limoneno (122) para aplicação comercial. A separação (120) pode usar um  
20 método tal como destilação, extração de solvente e desmulsificação. De acordo com uma outra modalidade, etanol é usado para extração de D-limoneno. Alternativamente, D-limoneno é deixado na corrente de hidrólise (114) e é separado e em uma etapa posterior, por exemplo, após fermentação (130).  
25

De acordo com a modalidade conforme mostrado na figura 2, carboidratos extraídos e carboidratos formados na hidrólise na corrente de hidrolisato (114) são fermentados para formarem um produto de fermentação em uma operação de fermentação (130). Vários produtos de fermentação  
30 poderiam ser formados e mais de um produto de fermentação é gerado de acordo com uma outra modalidade. Etanol é um produto de fermentação de pelo menos parte dos carboidratos na corrente (114), de acordo com uma

outra modalidade. A solução de etanol formada (caldo) (144) é purificada usando técnicas de separação conhecidas, tal como destilação (150), formando uma solução de etanol concentrada (152). Os componentes não-voláteis do caldo de fermentação (154) são adequados como ingrediente de ração e para outras aplicações, tal como para geração de energia. De acordo com uma outra modalidade, esses componentes não-voláteis são misturados com casca úmida para formarem péletes de polpa de citros (CPP) de valor aperfeiçoado. A solução de etanol concentrada (152) poderia ser seca (160), por exemplo, em peneira molecular, para formar etanol de grau de combustível.

A corrente de hidrolisato (114) compreende pectina. De acordo com uma outra modalidade, pectina é separada da solução para formar um produto comercial. De acordo com uma outra modalidade, separação é através de precipitação de pectina. Tal separação pode ser feita em vários estágios do processo, por exemplo, antes da separação de D-limoneno, simultaneamente com ela ou após ela. De acordo com uma outra modalidade, pectina é separada através de precipitação e precipitação é facilitada pela presença de etanol em solução. Etanol poderia ser adicionado, por exemplo, através de uma fração da solução de etanol concentrada (152) à corrente de hidrolisato (opcionalmente integrada com extração de D-limoneno). Alternativamente ela é adicionada após extração de D-limoneno. De acordo com a modalidade conforme mostrado na figura 2, pectina é deixada na solução de carboidrato alimentada à fermentação (124) de modo que o caldo de fermentação (132) contém ambos etanol e pectina. Pectina (142) pode ser separada do caldo em (140) através de precipitação facilitada através do ajuste da concentração de água e/ou etanol nela. Ajuste pode envolver concentração através de remoção de água e/ou adição de solução de etanol concentrada, por exemplo, da etapa de destilação.

Os exemplos que seguem são apresentados para ilustrar a presente invenção e para auxiliar um versado na técnica a fazê-la e usá-la. Os exemplos não pretendem de modo algum limitar o escopo da invenção.

Ao realizar os exemplos que seguem, os procedimentos de teste

que seguem foram usados.

#### Determinação Teor de Pectina das Amostras

A um grama de material de amostra de pectina seco foram adicionados 100 ml de isopropanol acidificado a 60%. Isopropanol acidificado é 60% de isopropanol ao qual ácido clorídrico foi adicionado em uma concentração de 5%. O material no isopropanol acidificado foi agitado por 10 minutos, então filtrado em um cadinho de filtro tarado. O material foi lavado com seis lavagens de 15 ml do isopropanol ácido. O material foi então lavado com isopropanol a 60%, então com azeótropo isopropanol (87% v/v, gravidade específica 0,82). O material foi seco a 105°C por 1 hora, então esfriado e pesado. O teor de pectina é o peso seco de material precipitado com isopropanol sobre o peso seco de partida do material de amostra.

#### Viscosidade da Pectina

Uma solução a 1% peso/volume de pectina em água foi preparada. 60-120 minutos após dissolução, a temperatura da solução foi ajustada para 25°C. A viscosidade da solução foi medida em milli-Pascals usando um viscosímetro com um número 1 de haste ("spindle") e uma velocidade de 60. O viscosímetro utilizado era um Brookfield DV-1 Série Viscometer.

#### Determinação do Teor de Ácido Galacturônico (Gal A) e Grau de Esterificação (DE)

Ácido galacturônico é uma medida da pureza da pectina, e DE é uma medida da funcionalidade da pectina.

No procedimento para determinação do ácido galacturônico, 100 ml de água destilada foram adicionados a 0,5 g de material que foi dissolvido em 2,0 ml de azeótropo isopropanol. Usando uma solução indicadora de fenolftaleína, o material foi titulado com hidróxido de sódio a 0,1M até a cor mudar. O ponto final de titulação foi então usado para quantificar os grupos de ácido carboxílico nos resíduos de ácido galacturônico.

Ao material titulado, 20 ml de hidróxido de sódio a 0,5M foram adicionados, misturados e a solução foi deixada descansar por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 20,0 ml de ácido clorídrico a 0,5M foram adicionados e misturados bem com a solução. Este material foi então

titulado com hidróxido de sódio a 0,1M para um rosa fraco e ponto que dá o título de saponificação incorreto. O título é corrigido através da subtração do volume de titulação de 100 ml de água destilada que tinha sido misturada primeiro com os 20 ml de hidróxido de sódio a 0,5M, e então os 20,0 ml de ácido clorídrico a 0,5M. O DE é o segundo título dividido pelo primeiro e

5 segundo título adicionados juntos, dando uma substituição % do éster.

#### Análises de Sacarose, Glicose e Frutose

Amostras foram analisadas a partir de açúcares primeiro diluindo com água se necessário, então filtrando as amostras com um filtro Whatman

10 de náilon de 0,45 micron. As amostras foram misturadas com uma resina de troca de íon (mistura 1:1 de resinas Dowex 66 e Dowex 88) e agitadas vigorosamente. As amostras foram analisadas usando um fluxo isocrático através de uma coluna de cálcio Biorad HPX-42C a 85°C usando água como o eluente. O tamanho da injeção era 4 microlitros e a taxa de fluxo era 0,9

15 ml/min e um detector de índice refrativo foi usado. Resinas Dowex 66 e Dowex 88 estão disponíveis da Dow Chemical Company, Midland, Michigan.

#### EXEMPLOS 1-28

Nos Exemplos 1-28, são descritos procedimentos para obtenção de pectina a partir de cascas de laranja. Casca de laranja úmida foi tratada com ácido nítrico, nos Exemplos 1-8, para liberar a pectina. Casca de laranja

20 úmida foi tratada com enzima Multifect A40 da Genencor International, nos Exemplos 9-13, para liberar a pectina. No Exemplo 14, casca de laranja úmida foi tratada com enzima Cellucast da Novozyme 1,5L para liberar a pectina. Nos Exemplos 15-20, enzima Multifect A40 da Genencor Internacional e

25 enzima Biocatalysts Depol 740 L foram usadas em casca da laranja úmida ou sozinhas ou em combinação para liberar a pectina. No Exemplo 21, nenhuma enzima foi adicionada e nenhuma recuperação de pectina foi observada. No Exemplo 22, enzima Cellulase FG da Biosun foi usada para tratar casca de laranja úmida para liberar pectina. Nos Exemplos 23-26, a enzima Multi-

30 fect A40 da Genencor International em combinação com D692L da Biocatalyst foi adicionada a uma casca de laranja úmida para liberar pectina. Nos exemplos 27 e 28, a enzima Depol 740 L da Biocatalyst foi adicionada à

casca de laranja úmida em combinações com ou Multifect A40 da Genencor International ou Speczyme CP.

Ao realizar os exemplos, o procedimento que segue foi praticado.

5 O tamanho dos pedaços de casca de laranja congelados foi reduzido através de trituração em um triturador de carne de tamanho doméstico (Modelo Nº MM6386; Maverick Industries, Inc., Edison NJ 08837). A fim de inativar enzimas pectil metil estearase vários frascos contendo um peso úmido de partida ou de 250 g ou 100 g de casca cada um foram curados  
10 com 250 a 500 ml de água cada um aumentando a temperatura para 80°C ou 100°C em uma placa quente e mantendo-a por tempos diferentes conforme indicado na Tabela 1. As amostras 9 a 12 na Tabela 1 foram ajustadas para pH 1,7 com ácido nítrico e foram curadas em pH 1,7. A umidade percentual da casca foi determinada ser 79,1% através de secagem de uma  
15 porção em um forno a 85°C da noite para o dia. Os 250 ou 100 g de material de partida foram divididos na metade após cura e os pesos secos de partida usados no experimento são indicados na Tabela 1.

Após cura, os sólidos foram recuperados através de filtração em gaze de algodão e a casca úmida foi tratada ou com ácido nítrico ou enzi-  
20 mas para hidrolisar a matriz celulósica e liberar pectina e açúcares solúveis. A hidrólise ácida dos sólidos foi realizada a 80°C ou 95°C por 1 ou 3 horas em ácido nítrico a 1M. As hidrólises enzimáticas dos sólidos foram realizadas a 50-55°C por até 72 horas, usando preparações de celulase comercialmente disponíveis (ou A40 da Genencor ou Celluclast 1,5L da Novozy-  
25 mes). Após a hidrólise ter parado, os sólidos secos foram removidos através de filtração em uma gaze. Em todos os casos, a quantidade de sólidos secos era significativamente menor do que a quantidade de material de partida e, como pode ser visto na Tabela 1, o tratamento com enzima foi mais eficaz do que o tratamento com ácido na hidrólise da casca de laranja. Isto é mos-  
30 trado através de comparação da coluna de peso seco da amostra de partida com a coluna de peso seco de casca residual.

Ao filtrado de hidrólise um volume igual de etanol absoluto foi

adicionado e o material precipitado resultante foi filtrado em um papel filtro Whatman, então lavado com 100 ml de etanol frio. A quantidade final recuperada, que é a fração de pectina insolúvel em etanol, é mostrada na coluna indicada "peso seco da fração de pectina" na Tabela 1. O material foi removido do papel filtro, seco e analisado quanto à proteína. Para análises de pectina (1% de Viscosidade, Ácido galacturônico (GalA) e Grau de Esterificação (DE)), amostras individuais foram combinadas conforme designado na tabela abaixo. A pectina é principalmente composta do éster metilado de ácido poligalacturônico e determinação do ácido galacturônico e grau de esterificação dá uma indicação da quantidade e qualidade da pectina presente em uma amostra. Conforme mostrado na Tabela 1, em todo os casos o tratamento com enzima deu uma recuperação maior de pectina do que o tratamento com ácido. O filtrado de etanol de amostras selecionadas da Tabela 1 foi analisado quanto à glicose, frutose e sacarose, e a quantidade de açúcares totais com base nos sólidos secos de partida (ds) foi calculada. Esses açúcares estão disponíveis para outros usos, tal como um substrato para fermentação. As análises de açúcar são mostradas na Tabela 2.

Tabela 1

Recuperação de Pectina a partir de Tratamentos Enzimático e Ácido de Casca de Laranja

| Nº da Amostra | Peso Seco (g) da Amostra | Tempo Cura (min) | Temp. de Cura (°C) | Ajuste do pH de Cura | Tipo de Hidrol. | Quant. da Enzima (ml) | Temp. da Hidrol. (°C) | Tempo da Hidrol. (h) | Peso Seco da Casca Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a partir do Início | Viscosidade a 1% (mPas) | GalA (%) | DE (%) |
|---------------|--------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|----------|--------|
| 1             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 80                    | 1                    | 10,82                           | 1,2478                             | 4,8                                            | 33                      | 61,0     | 66,9   |
| 2             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 80                    | 1                    | 11,98                           | 3,0498                             | 11,7                                           |                         |          |        |
| 3             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 80                    | 3                    | 11,89                           | 3,2805                             | 12,5                                           | 16                      | 64,6     | 66,7   |
| 4             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 80                    | 3                    | 10,04                           | 30,13                              | 12,00                                          |                         |          |        |
| 5             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 95                    | 3                    | 6,78                            | 6,4                                | 24,50                                          | 5                       | 59,2     | 62,8   |
| 6             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 95                    | 3                    | 6,95                            | 5,54                               | 21,20                                          |                         |          |        |

Tabela 1 (continuidade)

| Nº da Amostra | Peso Seco (g) da Amostra | Tempo Cura (min) | Temp. de Cura (oC) | Ajuste do pH de Cura | Tipo de Hidrol. | Quant. da Enzima (ml) | Temp. da Hidrol. (oC) | Tempo da Hidrol. (h) | Peso Seco da Casca Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a partir do Início | Viscosidade a 1% (mPas) | GalA (%) | DE (%) |
|---------------|--------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|----------|--------|
| 7             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 95                    | 1                    | 11,14                           | 3,0681                             | 11,80                                          | 16                      | 69,5     | 67,5   |
| 8             | 26,14                    | 3                | 100                | Não                  | Ácido           | 0                     | 95                    | 1                    | 7,81                            | 3,84                               | 14,70                                          |                         |          |        |
| 9             | 20,91                    | 5                | 80                 | pH 1,7               | Enzima A40      | 0,2                   | 55                    | 5,45                 | 1,95                            | 80,2                               | 38,40                                          | 6                       | 45,8     | 62,5   |
| 10            | 20,91                    | 5                | 80                 | pH 1,7               | Enzima A40      | 0,2                   | 55                    | 17                   | 1,46                            | 7,2                                | 34,40                                          |                         |          |        |
| 11            | 20,91                    | 5                | 80                 | pH 1,7               | Enzima A40      | 2                     | 55                    | 5,45                 | 0,37                            | 8,07                               | 38,60                                          | 4                       | 48,4     | 61,0   |
| 12            | 20,91                    | 5                | 80                 | pH 1,7               | Enzima A40      | 2                     | 55                    | 18                   | 0,29                            | 8,24                               | 39,40                                          |                         |          |        |

Tabela 1 (continuidade)

| Nº da Amostra | Peso Seco (g) da Amostra | Tempo Cura (min) | Temp. de Cura (oC) | Ajuste do pH de Cura | Tipo de Hidrol.   | Quant. da Enzima (ml) | Temp. da Hidrol. (oC) | Tempo da Hidrol. (h) | Peso Seco da Casca Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a partir do Início | Viscosidade a 1% (mPas) | GalA (%) | DE (%) |
|---------------|--------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|----------|--------|
| 13            | 20,91                    | 3                | 80                 | Não                  | Enzima A40        | 0,2 (0h)              | 50                    | 72                   | 4,34                            | 5,94                               | 28,40                                          | 7                       | 47,1     | 61,2   |
|               |                          |                  |                    |                      |                   | 0,2 (24 h)            |                       |                      |                                 |                                    |                                                |                         |          |        |
| 14            | 20,91                    | 3                | 80                 | Não                  | Enzima Celluclast | 0,6 (0 h)             | 50                    | 72                   | 4,06                            | 5,58                               | 26,70                                          | 10                      | 49,7     | 64,4   |
|               |                          |                  |                    |                      |                   | 0,6 (24 h)            |                       |                      |                                 |                                    |                                                |                         |          |        |

**Tabela 2****Análise do Filtrado de Etanol após Recuperação e Lavagem de Pectina**

| Nº da amostra | Glicose | Frutose | Sacarose | Açúcar total |
|---------------|---------|---------|----------|--------------|
| Da Tabela 1   | g/kgDS  | g/kgDS  | G/kgDS   | d/kgDS       |
| 4             | 15,3    | 29,08   | 56,62    | 101          |
|               |         |         |          |              |
| 5             | 18,73   | 43,19   | 92,09    | 154,01       |
|               |         |         |          |              |
| 6             | 16,34   | 38,51   | 45,28    | 100,12       |
|               |         |         |          |              |
| 7             | 11,33   | 40,55   | 76,73    | 128,61       |
|               |         |         |          |              |
| 12            | 69,3    | 30,73   | 0        | 100,03       |
|               |         |         |          |              |
| 14            | 30,51   | 11,78   | 0        | 42,3         |

- Na Tabela 3. Depol 740 L, uma preparação de esterase de ácido ferrúlico da Biocatalyst (Wales UK) e BioSun Cellulase FG (Tampa Florida)
- 5 foram adicionadas sozinhas ou com A40 da Genencor. Em todos os casos, recuperação de pectina era maior do que 20%. Essas enzimas podem ser usadas para preparar pectina a partir de casca de laranja.

Tabela 3

Preparação de Pectina a partir de Casca de Laranja Usando Tratamento com Enzima

| Nº da Amostra | Peso Seco da Amostra (g) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (°C) | Ajuste do pH da Cura | Nome & Quant. da Enzima (ml) | Temp. de Hidrol. (°C) | Tempo de Hidrol. (h) | Peso Seco da Casca Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Rescuspuração de Pectina a partir do Início |
|---------------|--------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 15            | 20,91                    | 60                  | 100                | Não                  | A40-0,2                      | 55                    | 18                   | 6,54                            | 4,86                               | 23,2                                             |
| 16            | 20,91                    | 5                   | 80                 | pH 1,7               | A40-0,2                      | 55                    | 18                   | 0,75                            | 8,99                               | 43                                               |
| 17            | 20,91                    | 5                   | 80                 | pH 1,7               | D740L-0,2                    | 55                    | 4,45                 | 0,64                            | 6,07                               | 29                                               |
| 18            | 20,91                    | 5                   | 80                 | pH 1,7               | D740L-0,2                    | 55                    | 14,5                 | 0,56                            | 4,36                               | 20,8                                             |
| 19            | 20,91                    | 5                   | 80                 | pH 1,7               | D740L-0,2                    | 55                    | 4,45                 | 0,68                            | 5,43                               | 26                                               |

Tabela 3 (continuação)

| Nº da Amostra | Peso Seco da Amostra (g) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (°C) | Ajuste do pH da Cura | Nome & Quant. da Enzima (ml) | Temp. de Hidrol. (°C) | Tempo de Hidrol. (h) | Peso Seco da Casca Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Rescuação de Pectina a partir do Início |
|---------------|--------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|
| 20            | 20,91                    | 5                   | 80                 | pH 1,7               | D740L-0,2                    | 55                    | 14,5                 | 0,52                            | 4,69                               | 22,4                                         |
|               |                          |                     |                    |                      |                              |                       |                      |                                 |                                    |                                              |
| 21            | 20,91                    | 3                   | 80                 | Não                  | Nenhum                       | 50                    | 72                   | 13,45                           | 0,01                               | 0                                            |
|               |                          |                     |                    |                      |                              |                       |                      |                                 |                                    |                                              |
| 22            | 20,91                    | 3                   | 80                 | Não                  | BioSUn                       | 50                    | 72                   | 1,18                            | 4,72                               | 22,6                                         |
|               |                          |                     |                    |                      | Celulase FG                  |                       |                      |                                 |                                    |                                              |
|               |                          |                     |                    |                      | 0,6 a 0,24 h                 |                       |                      |                                 |                                    |                                              |

Os experimentos sumarizados na Tabela 4 envolveram o uso de várias misturas de enzima. As enzimas comercialmente disponíveis Depol 692L da Biocatalysts (Wales, UK) que contêm esterases, celulasas e hemicelulasas de ácido ferrúlico e Spezyme CP da Genencor (Rochester, Nova York) que contêm celulasas, hemiceluloase e B-glucanases foram adicionadas em misturas com A40 da Genencor à casca. Alta viscosidade gerada por essas preparações de enzima impediram a filtragem e recuperação de material do tipo pectina.

Tabela 4

Tratamento de Casca de Laranja com Misturas de Enzima

| Nº da Amostra | Peso Se-co da Amostra (g) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (°C) | Ajuste do pH da Cura | Nome & Quant. da Enzima (ml) | Temp. de Hidrol. (°C) | Tempo de Hidrol. (h) | Peso Se-co da Casca Residual (g) | Peso Se-co da Fração de Pectina (g) | % de Rescuação de Pectina a partir do Início |
|---------------|---------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|
| 23            | 20,91                     | 3                   | 100                | Não                  | A40-0,2                      | 55                    | 3                    | 5,69                             | 2,46                                | 11,7                                         |
| 24            | 20,91                     | 3                   | 100                | Não                  | D69L-2                       | 55                    | 18                   | 30,5                             | Nenhum                              | 0                                            |
| 25            | 20,91                     | 3                   | 100                | Não                  | A40-0,2                      | 55                    | 18                   | 3,82                             | Nenhum                              | 0                                            |
| 26            | 20,91                     | 3                   | 100                | Não                  | D69L-2                       | 55                    | 18                   | 2,72                             | 1,17                                | 5,6                                          |
| 27            | 20,91                     | 3                   | 100                | Não                  | A40-0,2                      | 55                    | 18                   | 9,4                              | 2,51                                | 12                                           |
| 28            | 20,91                     | 3                   | 100                | Não                  | D740L-0,2                    | 55                    | 18                   | 8,91                             | 1,74                                | 8,3                                          |
|               |                           |                     |                    |                      | SpezCP-0,05                  |                       |                      |                                  |                                     |                                              |

### Exemplo 29

Neste exemplo é mostrado o tratamento de uma casca de laranja com uma enzima em um reator de 3 litros, para liberar pectina. O procedimento é como segue:

- 5 O tamanho de pedaços de casca de laranja congelados foi reduzido através de trituração em um moedor de carne de tamanho doméstico, comercial. A fim de inativar enzimas pectina metil estearase um peso seco de partida de 2464,8 g de casca foi curado com seis litros de água aumentando a temperatura para 95°C em uma placa quente e mantendo-a em
- 10 95°C por dez minutos. A umidade percentual da casca foi determinada ser 79,6% através da secagem de uma porção em um forno a 85°C da noite para o dia. A água curada foi analisada quanto ao teor de açúcar e foi verificada conter 3,4 g/l de sacarose, 5,7 g/l de glicose e 6,1 g/l de frutose.

- Após a cura, os sólidos foram recuperados através de filtração
- 15 em gaze e então 2100 g em peso líquido de casca foram divididos igualmente em dois fermentadores New Brunswick de 3 litros que continham cada um 2,4 litros de água estéril. A cada fermentador, 4,2 ml de enzima Multifect A40 da Genencor International foram adicionados. Os fermentadores foram agitados a 500 rpm, mantidos em 55°C e um pH de 5,2 através da adição de
- 20 hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, e incubados por 7 horas.

- No final da incubação, os conteúdos do fermentador foram filtrados em gaze e 89,7 g de sólidos em uma base seca foram recuperados. Isto demonstrou que os sólidos foram reduzidos dos 502,8 gramas iniciais. Ao filtrado do fluxo um volume igual de etanol absoluto foi adicionado e o material
- 25 foi incubado da noite para o dia a 4°C. O material precipitado foi filtrado em papel filtro Whatman No. 4 e lavado com 2 volumes de etanol frio. O material foi removido do papel filtro, seco e analisado. Recuperação de sólidos a partir do material de partida foi 21% e este material foi determinado ser 81,5% de pectina através de isopropanol acidificado. Resíduos de ácido galacturônico foram determinados estar entre 46 e 50% e o grau de esterificação
- 30 foi determinado ser 64.

### Exemplo 30

Fermentação de Açúcares de Casca é mostrada neste exemplo como segue:

- A água de cura do Exemplo 29 continha 3,4 g/l de sacarose, 5,7 g/l de glicose e 6,1 g/l de frutose. Quatro fermentações foram preparadas.
- 5 Primeiro, inóculo foi preparado usando um meio contendo extrato de levedura a 0,1% e glicose a 0,6% em pH 7,0 e levedura seca em pelota a 0,2% incubada a 30°C por 20 horas com agitação em um agitador giratório a 150 rpm. Um inóculo a 5% foi adicionado aos quatro frascos. Os controles continham extrato de levedura a 1% e peptona a 2% e  $\text{CaCO}_3$  a 1,5% e ou 5 ou
- 10 50 g/l de glicose. Os dois frascos experimentais continham água de cura não-diluída à qual o extrato de levedura a 1%, peptona a 2% e  $\text{CaCO}_3$  a 1,5% foram adicionados. A primeira fermentação de água de cura não tinha quaisquer açúcares adicionados exceto o que já estava presente, e a segunda tinha glicose adicionada para 50 g/l. Os frascos foram incubados por
- 15 18 horas a 30°C em pH 7,0. As concentrações de etanol são mostradas na Tabela 3. Os dados mostram que os açúcares em água de cura de casca podem servir como um substrato para fermentação de etanol, e que nenhuma inibição é observada.

Tabela 5:

- 20 Produção de etanol em Água de Cura de Casca de Laranja

| Amostra      | Concentração de glicose | Etanol   |
|--------------|-------------------------|----------|
| Controle     | 5 g/l                   | 1,2 g/l  |
| Controle     | 50 g/l                  | 19,3 g/l |
| Água de cura | 5 g/l                   | 4,5 g/l  |
| Água de cura | 50 g/l                  | 20,0 g/l |

#### EXEMPLOS 31-46

Ao realizar os Exemplos 31-40, o procedimento que segue foi praticado.

- A fim de inativar enzima pectina metil esterase, um béquer con-
- 25 tendo um peso líquido de partida de 800 g de beterraba grosseiramente picada foi curado em 2800 mL de água através do aumento da temperatura para 95°C em uma placa quente e manutenção dela em 90-95°C por três

minutos. Em alguns exemplos, o tamanho dos pedaços de beterrada grosseiramente picada foi reduzido através de trituração em um *Deluxe Food Grinder* (Modelo No.MM6386; Maverick Insutries, Inc., Edison, NJ 08837). A umidade percentual da beterraba curada foi determinada ser 79,1% através de secagem de uma porção em um forno a 70°C até que um peso constante fosse obtido. O peso seco de partida para cada um dos Exemplos 31-40 era 20,9 g, conforme indicado na Tabela 6.

Após cura, os sólidos de beterraba foram recuperados através de filtração em gaze. A alíquotas de 100 g de beterraba curada foram adicionados ou 200 mL de água ou 200 mL de citrato de sódio a 200 mM, pH 4,2. A suspensão de água-beterraba foi tratada com ácido nítrico a 1M para atingir um pH de 1,6-1,9, enquanto as suspensões de citrato-beterraba foram tratadas com enzimas (ou Multifect A40 da Genencor, Lucigen Cornblaster HE-1, Lucigen Cornblaster HE-3, Dyadic Acid Cellulase No. 1 ou Dyadic Neutral Cellulase No. 2) para hidrolisar as matrizes celulósicas e/ou hemicelulósicas e liberar pectina e açúcares solúveis. A hidrólise ácida foi realizada a 95°C por 1 hora. As hidrólises enzimáticas foram realizadas em um agitador-incubadora a 50°C com agitação a 250-270 rpm por 68-70 horas. Após a hidrólise ter parado, os sólidos secos (solúveis) foram removidos através de filtração em uma gaze. Em todos os casos, a quantidade de sólidos secos era significativamente menos do que a quantidade de material de partida. Isto é mostrado comparando a coluna de peso seco da amostra de partida com a coluna de peso seco da beterraba residual.

Ao filtrado um volume igual de álcool isopropílico (IPA) foi adicionado, a mistura foi armazenada a 4°C por até 72 horas e o material precipitado resultante foi filtrado em papel filtro Whatman 1, então lavado com 3 x 100 ml de IPA. O peso final da pectina insolúvel de IPA recuperada é mostrado na coluna indicada "peso seco da fração de pectina" na Tabela 6. O material foi seco a 42°C até que um peso constante foi obtido.

Os resultados dos Exemplos 31-40 são apresentados na Tabela 6.

Nos Exemplos realizados 41-46, o procedimento que segue foi

praticado.

Polpa de maçã foi preparada misturando quantidades iguais de maçãs *Gala*, Braebun e Red Delicious menos os talos em um misturador de velocidade 14 Hamilton Beach (Hamilton Beach/Proctor-Silex, Washington, NC 27889) até que uma pasta fina se formou. A pasta foi filtrada em uma gaze para remover o suco. A fim de inativar enzimas pectina metil esterase um béquer contendo um peso úmido de partida de 800 g de polpa de maçã foi curado em 2000 mL de água através do aumento da temperatura para 95°C em uma placa quente e mantendo-a a 90-95°C por três minutos. A umidade percentual da polpa de maçã curada foi determinada ser 88,0% através de secagem de uma porção em um forno a 70°C até um peso constante ser obtido. O peso seco de partida para cada um dos Exemplos 41-46 era 12,9 g conforme indicado na Tabela 7.

Após cura, os sólidos foram recuperados através de filtragem em uma gaze. A alíquotas de 100 g de polpa de maçã curada foram adicionados ou 200 mL de água ou 200 mL de citrato de sódio a 200 mM, pH 4,2. A suspensão de água-polpa foi tratada com ácido nítrico a 1M para atingir um pH de 1,6-1,9, enquanto as suspensões de citrato-polpa foram tratadas com enzimas (ou Multifect A40 da Genencor, Lucigen Cornblaster HE-1, Lucigen Cornblaster HE-3, Dyadic Acid Cellulase Nº 1 ou Dyadic Neutral Cellulase Nº 2) para hidrolisar as matrizes celulósicas e/ou hemicelulósicas e liberar pectina e açúcares solúveis. A hidrólise ácida foi realizada a 95°C por 1 hora. As hidrólises enzimáticas foram realizadas em um agitador-incubadora a 50°C com agitação a 250-270 rpm por 70 horas. Após a hidrólise ter parado, os sólidos secos (solúveis) foram removidos através de filtragem em uma gaze. Em todos os casos exceto um, a quantidade de sólidos secos era significativamente menos do que a quantidade de material de partida. Isto é mostrado comparando a coluna de peso seco da amostra de partida com a coluna de peso seco da polpa de residual.

Ao filtrado um volume igual de álcool isopropílico (IPA) foi adicionado, a mistura foi armazenada a 4°C por até 72 horas e o material precipitado resultante foi filtrado em papel filtro Whatman 1, então lavado com 3 x

100 ml de IPA. O peso final da pectina insolúvel de IPA recuperada é mostrado na coluna indicada "peso seco da fração de pectina" na Tabela 7. O material foi seco a 42°C até que um peso constante foi obtido.

Os resultados dos Exemplos 41-46 são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6

Recuperação de Pectina a partir de Tratamentos Enzimático e Ácido de Beterraba Picada

| Nº da Amostra | Triturada | Peso Seco da Amostra (g) (após cura) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (oC) | Tipo de Hidrólise | Nomes das Enzimas | Vol/Pe so das Enzimas | Líquido de Hidrólise     | Volume de Líquido (ml) | Temp. de Hidról. (oC) | Tempo de Hidról. (h) | Peso Seco de Beterraba Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a Partir do Início |
|---------------|-----------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| 31            | Não       | 20,9                                 | 3                   | 90-95°C            | ácida (pH1,6-1,9) |                   |                       | H <sub>2</sub> O         | 200                    | 90-95°C               | 1                    | 8,9                                 | 1,37                               | 6,6                                            |
| 32            | Não       | 20,9                                 |                     |                    | enzima A40        |                   | 2 mL                  | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 14,6                                | 1,48                               | 7,1                                            |
| 33            | Não       | 20,9                                 |                     |                    | enzima            | Cornblaster HE-1  | 1 mL                  | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 15,9                                | 0,34                               | 1,6                                            |

Tabela 6 (continuação)

| Nº da Amostra | Triturada | Peso Seco da Amostra (g) (após cura) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (oC) | Tipo de Hidrólise | Nomes das Enzimas     | Vol/Pe so das Enzimas | Líquido de Hidrólise     | Volume de Líquido (ml) | Temp. de Hidról. (oC) | Tempo de Hidról. (h) | Peso Seco de Berraba Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a Partir do Início |
|---------------|-----------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| 34            | Não       | 20,9                                 |                     |                    | enzima            | Cornblaster HE-3      | 1 mL                  | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 15,9                              | 0,76                               | 3,6                                            |
| 35            | Não       | 20,9                                 |                     |                    | enzima            | Celulase No. 1 ácida  | 0,03 g                | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 16,4                              | 0,77                               | 3,7                                            |
| 36            | Não       | 20,9                                 |                     |                    | enzima            | Celulase No. 2 neutra | 0,05 g                | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 16,9                              | 0,57                               | 2,7                                            |
| 37            | Sim       | 20,9                                 |                     |                    | ácida (pH1,6,19)  |                       |                       | H <sub>2</sub> O         | 200                    | 90-95°C               | 1                    | 8,1                               | 1,34                               | 6,4                                            |



Tabela 7

Recuperação de Pectina a partir de Tratamentos Enzimático e Ácido de Polpa de Maça

| Nº da Amostra | Triturada | Peso Seco da Amostra (g) (após cura) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (oC) | Tipo de Hidrólise | Nomes das Enzimas | Vol/Pe so das Enzimas | Líquido de Hidrólise     | Volume de Líquido (ml) | Temp. de Hidról. (oC) | Tempo de Hidról. (h) | Peso Seco de Berraba Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a Partir do Início |
|---------------|-----------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| 41            | Sim       | 12,8                                 | 3                   | 90-95°C            | ácida (pH1,6-1,9) |                   |                       | H <sub>2</sub> O         | 200                    | 90-95°C               | 1                    | 8,9                               | 1,09                               | 8,5                                            |
| 42            | Sim       | 12,8                                 |                     |                    | enzima            | A40               | 2 mL                  | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 1,5                               | 1,75                               | 13,7                                           |
| 43            | Sim       | 12,8                                 |                     |                    | enzima            | Cornblaster HE-1  | 1 mL                  | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 12,8                              | 0,72                               | 5,6                                            |

Tabela 7 (continuação)

| Nº da Amostra | Triturada | Peso Seco da Amostra (g) (após cura) | Tempo de Cura (min) | Temp. de Cura (oC) | Tipo de Hidrólise | Nomes das Enzimas     | Vol/Pe so das Enzimas | Líquido de Hidrólise     | Volume de Líquido (ml) | Temp. de Hidról. (oC) | Tempo de Hidról. (h) | Peso Seco de Berraba Residual (g) | Peso Seco da Fração de Pectina (g) | % de Recuperação de Pectina a Partir do Início |
|---------------|-----------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| 44            | Sim       | 12,8                                 |                     |                    | enzima            | Cornblaster HE-3      | 1 mL                  | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 12,5                              | 0,67                               | 5,2                                            |
| 45            | Sim       | 12,8                                 |                     |                    | enzima            | Celulase No. 1 ácida  | 0,03 g                | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 7,6                               | 1,22                               | 9,5                                            |
| 46            | Sim       | 12,8                                 |                     |                    | enzima            | Celulase No. 2 neutra | 0,05 g                | Citrato a 200 mM, pH 4,2 | 200                    | 50°C                  | 70                   | 7,3                               | 0,95                               | 7,4                                            |

A partir dos dados das Tabela 6 e 7, as observações que seguem podem ser feitas:

Os dados nas colunas indicadas com Peso Seco de Beterraba Residual e Peso Seco de Polpa Residual mostram que ambos tratamentos com ácido e enzimas digerem a biomassa de maçã e beterraba e liberam pectina que pode ser precipitada através da adição de álcool isopropílico. A enzima que liberou mais pectina da beterraba picada e polpa de maçã, conforme medido através dos pesos secos de fração de pectina, é a Genencor Multifect A40. As hidrólises enzimáticas da polpa de maçã liberaram mais pectina do que as hidrólises comparáveis da beterraba picada (vide colunas indicadas com % de Recuperação de Pectina do Início).

No entanto, em todos os casos, o uso de enzima no tratamento de beterraba e da polpa de maçã foi bem-sucedido na recuperação de pectina.

A invenção foi descrita com referência a várias modalidades e técnicas específicas e ilustrativas. No entanto, um versado na técnica vai reconhecer que muitas variações e modificações podem ser feitas enquanto permanecendo dentro do espírito e escopo da invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de pectina a partir de um material contendo pectina compreendendo:
  - tratamento do material contendo pectina em um meio aquoso com enzima para liberar pectina do material contendo pectina deste modo formando uma solução de pectina; e
  - separação da solução de pectina de um resíduo insolúvel.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, onde a solução de pectina é contatada com um álcool.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o material contendo pectina é selecionado do grupo consistindo em uma fruta cítrica, uma fruta tropical, uma maçã, uma beterraba, um girassol, uma soja e suas misturas.
4. Método de acordo com a reivindicação 3, onde o material contendo pectina é selecionado do grupo consistindo em uma fruta cítrica e uma maçã.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o material contendo pectina é uma fruta cítrica a partir da qual pelo menos uma porção do líquido da fruta foi removida.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o meio aquoso é água.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, onde a enzima é selecionada do grupo consistindo em uma enzima celulase, uma enzima hemicelulase e uma mistura delas.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, onde a razão em peso de meio aquoso para a pectina contida no material contendo pectina está na faixa de cerca de 10 a cerca de 300 partes de meio aquoso para cerca de 1 parte de pectina.
9. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o material contendo pectina é triturado para um tamanho menor, antes do ou durante o tratamento com enzima.
10. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o tratamento

com enzima do material contendo pectina é realizado sob condições ácidas.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, onde o tratamento com enzima do material contendo pectina é realizado em um pH de menos do que cerca de 5.

5                    12. Método de acordo com a reivindicação 11, onde o pH é menor do que cerca de 4.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o tratamento com enzima do material contendo pectina é realizado em uma temperatura de menos do que cerca de 100°C.

10                   14. Método de acordo com a reivindicação 13, onde a temperatura é menor do que cerca de 60°C.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o tratamento com enzima do material contendo pectina é realizado por um período de menos do que cerca de 72 horas.

15                   16. Método de acordo com a reivindicação 15, onde o período é menos do que cerca de 6 horas.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, onde a solução de pectina é separada do resíduo insolúvel através de filtragem ou centrifugação.

20                   18. Método de acordo com a reivindicação 2, onde o álcool é selecionado do grupo consistindo em etanol e isopropanol.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o material contendo pectina é pré-tratado para estabilizar o material contendo pectina através de inativação de enzimas no material contendo pectina.

25                   20. Método de acordo com a reivindicação 19, onde o pré-tratamento compreende aquecimento do material contendo pectina.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, onde o material contendo pectina é aquecido com água quente em uma temperatura de cerca de 80°C a cerca de 100°C, por um período de cerca de 3 a 5 minutos.

30                   22. Pectina produzida de acordo com o método como definido na reivindicação 2.

23. Pectina produzida de acordo com o método como definido na

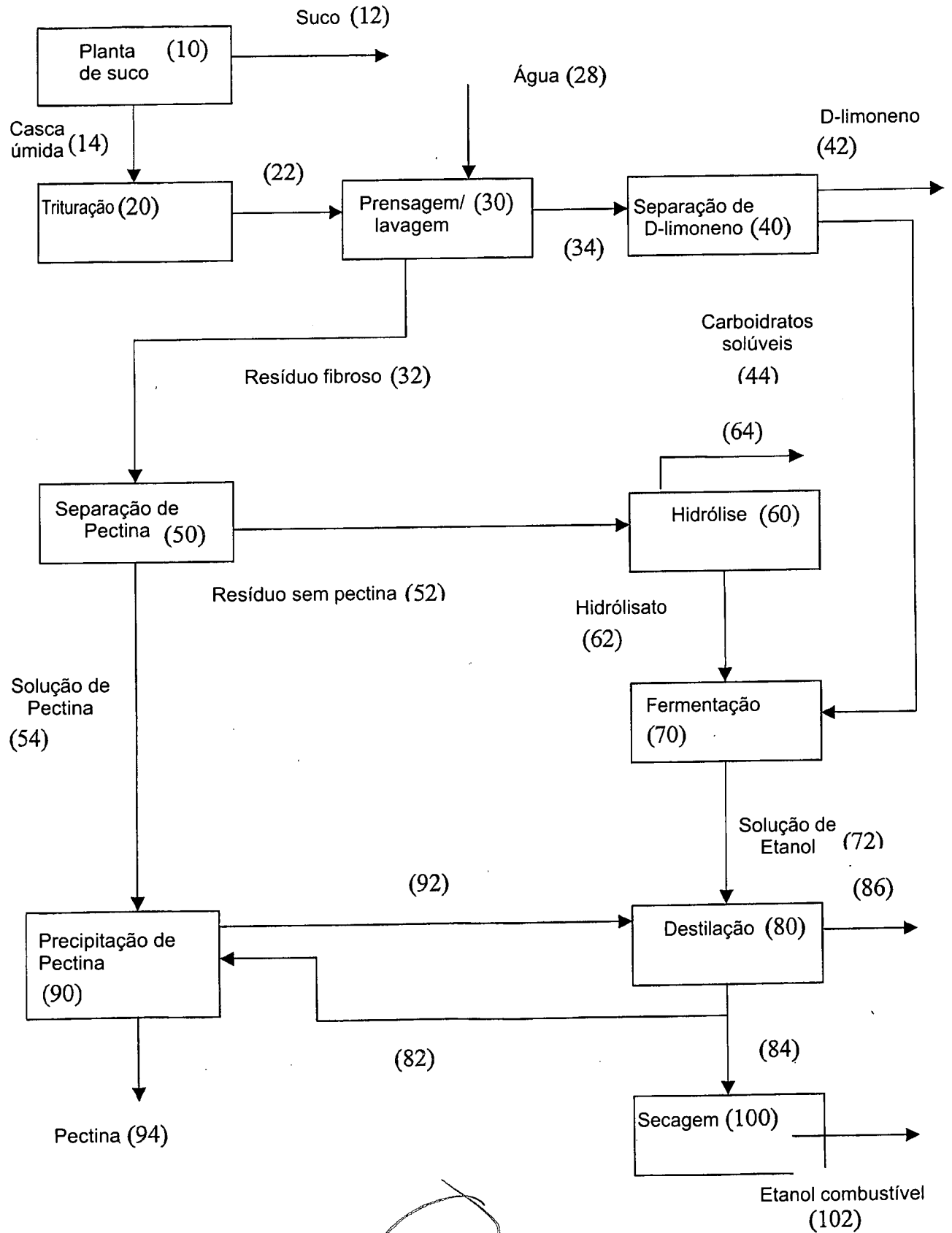
reivindicação 18.

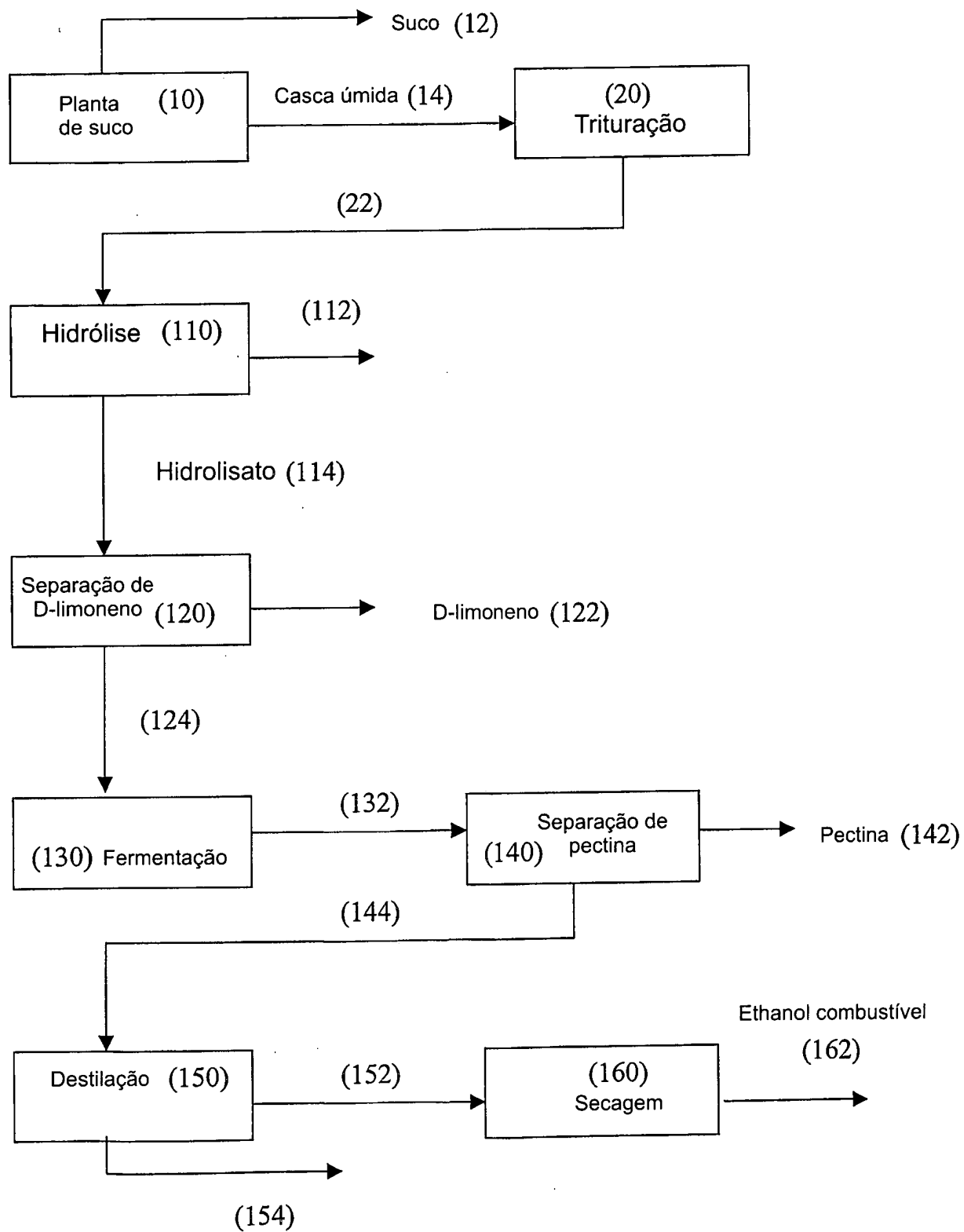
24. Composição alimentícia compreendendo pectina como definido na reivindicação 22.

5 25. Composição alimentícia compreendendo pectina como definido na reivindicação 23.

26. Composição de bebida compreendendo pectina como definido na reivindicação 22.

27. Composição de bebida compreendendo pectina como definido na reivindicação 23.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

## RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PECTINA"**.

A presente invenção refere-se a um método para obtenção de pectina a partir de um material contendo pectina que envolve tratamento do material contendo pectina com uma enzima que faz com que a pectina seja liberada do material contendo pectina. Enzimas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, enzimas celulase, enzimas hemicelulase e suas misturas. Etanol e isopropanol são álcoois típicos utilizados na recuperação da pectina. É também descrita a pectina através do método e o uso da pectina em alimentos e bebidas.