



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

(21) BR 102015018088-8 A2

(22) Data do Depósito: 29/07/2015

(43) Data da Publicação: 31/01/2017



(54) **Título:** PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO CONCENTRADO DE LIPASE

(51) **Int. Cl.:** C12N 9/20; C12P 5/00; C12P 7/64

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** LUCIANA FRANCISCO FLEURI; CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO CONCENTRADO DE LIPASE. A presente invenção se refere a um processo para obtenção do extrato concentrado de lipase de alta atividade a partir de subprodutos do processamento de laranja da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck variedade Pera. Tais subprodutos são basicamente o peel (casca), frit e core (bagaço). A presente invenção ainda se refere ao uso das lipases produzidas pelo processo produzido na presente invenção.

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO CONCENTRADO DE LIPASE**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se insere no campo das Ciências Biológicas, mais especificamente na área da Enzimologia, e descreve um processo para obtenção do extrato concentrado de lipase a partir de subprodutos do processamento de laranja.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A catálise enzimática, de maneira geral, ocorre em condições mais brandas de pH, temperatura e pressão em relação às catálises químicas, além de serem mais específicas quanto à reação e mais ambientalmente corretas. Os trabalhos atuais de processos para produção de lipases estão vinculados ao uso de substratos de baixo valor comercial que propiciem o crescimento de micro-organismos para a produção de biocatalisadores menos onerosos, além da busca dessas moléculas a partir de fontes vegetais. A presente invenção busca enzimas diretamente de resíduos vegetais para a obtenção de um produto de alto valor agregado e de baixo custo, fato este que limita a aplicação de lipases comerciais já existentes. Além disso, pesquisas sobre obtenção de lipases de matrizes vegetais são focadas em leguminosas de alta atividade lipolítica, porém com características diferentes das procuradas comercialmente. Muitas vezes as matrizes vegetais estudadas e selecionadas possuem alto custo, o que inviabiliza seu uso como fonte de enzima e/ou seu processamento a altas temperaturas ou com adição de solventes e implica em perda da atividade catalítica. A distribuição de lipases é detida por um número pequeno de grandes empresas multinacionais, o que

dificulta a expansão da aplicação dessas enzimas em diversos setores.

[003] Testes com matrizes cítricas já são encontrados na literatura, por exemplo, o estudo de Garcia *et al.* (1992), intitulado "*Lipid mobilization in Citrus cotyledons during germination*", registra a presença de lipases em sementes de limão siciliano. Assim, surgiu a ideia de pesquisar os resíduos provenientes do processamento de suco de laranja, já que o Brasil é o maior produtor desse suco concentrado e aproximadamente metade do peso bruto da fruta processada é considerado resíduo. O processo de extração do suco é mecânico, não utiliza temperaturas elevadas ou solventes, fatos estes que motivaram a busca de biocatalisadores com atividades intactas. O fato de já haver extração de óleo essencial de laranja despertou a atenção da possível presença de lipases, que no material vegetal estão relacionadas aos processos anabólicos e catabólicos para a manutenção e integridade da célula vegetal. Existem exemplos de substâncias encontradas nos resíduos de laranja que poderiam ser empregados para fins biotecnológicos, por exemplo, em Okino-Delgado e Fleuri, 2015, intitulado "*Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review*", que diz respeito ao uso de resíduos de laranja e manga, entretanto, sendo ainda pouco explorados para estes fins em escala comercial. Além disso, os produtos novos a serem obtidos podem apresentar maior valor agregado em relação ao próprio suco (produto principal do processo), o que poderia auxiliar a indústria de Citrus na busca de novas

alternativas biotecnológicas.

[004] Assim, extrato enzimático concentrado proveniente dos resíduos de laranja descrito na presente invenção apresentou uma elevada atividade e estabilidade, o que atrelado ao baixo custo dos processos envolvidos, contribuem para tornar este estudo passível de ser transformado em um processo patenteável para utilização em escala comercial.

ESTADO DA TÉCNICA

[005] O documento EP2141229 descreve uma preparação de lipase em pó que é um material granulado compreendendo uma lipase derivada de *Rhizopus oryzae* e/ou uma lipase derivada de *Rhizopus delemar* e um pó de soja tendo um teor de gordura de 5% em massa ou mais. A atividade de lipase é melhorada através da utilização desta preparação de lipase em pó. O referido documento é diferente da presente invenção, pois tais enzimas foram obtidas por processos fermentativos utilizando fungo, sendo que o material vegetal foi utilizado apenas como substrato.

[006] O documento EP2035556 descreve um método para a produção de lipase recombinante *Yarrowia lipolytica* resistente ao ácido, utilizando um meio de cultura sem quaisquer produtos de origem animal ou misturas não caracterizadas, tais como triptona, peptona ou soro do leite, além de seus usos. O referido documento não apresenta conflito com a presente invenção, pois as enzimas foram obtidas por processos fermentativos utilizando levedura recombinante, utilizando como substratos meios de cultivo complexos.

[007] O documento EP2186886 descreve um método para a

produção de uma lipase purificada, que compreende as etapas de: (a) colocar um éster parcial de um ácido graxo de glicerina e um triglicerídeo de cadeia média em contato com uma lipase para purificar a lipase; e (b) coletar a lipase purificada. De acordo com este método de produção, a lipase purificada pode ser obtida, em que o conteúdo de impurezas, tais como o silício, é diminuído. Ao contrário da presente invenção, no referido documento as enzimas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade, baseando-se na complementariedade das interações entre biomoléculas [enzima (lipase) e substrato (ésteres de ácido graxo e triglicerídeos de cadeia média)].

[008] O documento CN103642771 descreve um método de extração e armazenamento de lipase de farelo de arroz, que é usado principalmente para a extração da lipase por um método de oscilação de água deionizada ou água destilada. Tal documento não apresenta colidência com a presente invenção, pois as enzimas foram obtidas de resíduos de arroz.

[009] O documento W02013109136 refere-se a um método para a produção de lipase por fermentação de *Candida cylindracea* a partir de óleo de palma como um substrato, em que a fermentação é realizada a uma temperatura na faixa de 25 a 35 °C, a um pH na faixa de 5,5 a 7,5 e a uma velocidade de agitação na faixa de 250 a 750 rpm. Tal documento difere da presente invenção, pois as lipases foram obtidas por processos fermentativos utilizando levedura, empregando como componente do meio de cultivo óleo vegetal.

[010] Conforme pode ser observado acima, nenhum dos

documentos do estado da técnica descreve um processo para obtenção de extrato concentrado de lipase a partir de subprodutos do processamento de laranja, utilizando sulfato de amônio para a concentração e/ou purificação parcial das lipases, baseando-se na solubilidade das enzimas em solução saturada de sal, fenômeno este conhecido como "salting out". Além disso, na presente invenção, o processo de obtenção de lipases englobou moagem, padronização de granulometria, liofilização e fracionamento com sal visando aumentar a durabilidade, estabilidade e atividade por grama de extrato.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[011] A presente invenção se refere a um processo para obtenção de extrato concentrado de lipase de alta atividade a partir de subprodutos do processamento de laranja, como *peel* ou casca, que é a parte colorida da casca da laranja, composta pelo epicarpo; *frit*, que é a parte mais externa do epicarpo, utilizada para extração de óleo essencial; e o *core* ou bagaço, que é a parte branca da laranja, localizada entre a casca e a polpa e é composta pelo mesocarpo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção refere-se a um processo para obtenção do extrato concentrado de lipase de alta atividade a partir de subprodutos do processamento de laranja da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck variedade Pera, compreendendo as seguintes etapas:

- (a) coleta de subprodutos do processamento de laranja;
- (b) trituração mecânica;
- (c) congelamento por 24 horas;

- (d) liofilização por 48 horas;
- (e) congelamento;
- (f) fracionamento;
- (g) centrifugação;
- (h) diálise do precipitado;
- (i) congelamento por 24 horas;
- (j) liofilização por 48 horas.

[013] Os equipamentos utilizados para o processamento industrial de suco de laranja separam o resíduo utilizado em basicamente 3 frações:

- *Peel* ou casca: é a parte colorida da casca da laranja, composta pelo epicarpo;
- *Frit*: é a parte mais externa do epicarpo, utilizada para extração de óleo essencial; e
- *Core* ou bagaço: é a parte branca da laranja, localizada entre a casca e a polpa e é composta pelo mesocarpo.

Obtenção do extrato bruto de lipase:

[014] Após o processamento, as matrizes foram embaladas, armazenadas por 2 dias a 5 °C, trituradas mecanicamente até atingir granulometria homogênea de 0,5 cm³, congeladas por 24 horas e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização foram novamente trituradas e depois armazenadas congeladas a aproximadamente -7 °C.

[015] A liofilização foi realizada com os objetivos de retirada de água do sistema, concentração enzimática e homogeneização da amostra. Após a trituração as amostras passaram por peneira 20 mesh abertura 0,84 mm.

Obtenção do extrato concentrado de lipase:

[016] Os extratos enzimáticos brutos foram fracionados

por precipitação com sulfato de amônio com 40, 60 e 80% de saturação. Após a adição de sulfato de amônio para saturação a 40%, o extrato foi centrifugado por 10 minutos à 5 °C e 10.000 rpm e o volume precipitado submetido à diálise em membrana de celulose por 24 horas a 5 °C. Após a diálise, o extrato foi congelado e liofilizado por 24 horas. O procedimento foi repetido para saturação de 60 e 80% do sal.

[017] A Tabela 1 abaixo mostra a obtenção e concentração de lipases de resíduos do processamento de laranja da variedade pera.

Resíduos de laranja	Tratamento	Rendimento (%)	Fator de Purificação	Atividade relativa (bruto/concentrado) (%)
<i>Frit</i>	Extrato Bruto	100	1	100
	80% de sal	11,96	1,15	245,93
	60% de sal	23,66	1	213,91
	40% de sal	47,63	1,10	207,94
Casca (Peel)	Extrato Bruto	100	1	100
	80% de sal	23,8	1,77	261,53
	60% de sal	29,0	1,93	290,38
	40% de sal	47,82	1,52	223,07
Bagaço (Core)	Extrato Bruto	100	1	100
	80% de sal	23,31	1,41	296,37
	60% de sal	11,73	1,57	265,94
	40% de sal	19,94	1,84	184,06

[018] Os índices demonstrados na Tabela 1 acima

evidenciam:

[019] Atividade específica: relaciona a atividade de lipase pela concentração de proteínas totais (U/mg);

[020] Rendimento (%): relaciona atividade do total de cada fração (grama de amostra) pelo total de atividade antes do fracionamento;

[021] Fator de purificação: relaciona a atividade específica dos extratos concentrados em relação ao extrato bruto;

[022] Atividade relativa % (extrato bruto/extrato concentrado): este índice compara a atividade obtida por grama de cada extrato. Utilizando como 100% a atividade obtida com um grama de extrato bruto e relacionando a atividade obtida para um grama de extrato concentrado.

Análise da atividade de lipase

[023] Para a verificação da presença de lipases, sua atividade foi avaliada utilizando um sistema composto por 5 mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (na proporção de 1:4, v/v), 2 mL de solução tampão fosfato (0,5 M, pH 7,0) e 1 g do resíduo (fonte de enzima). O sistema de reação foi incubado a 40 °C por 30 minutos em banho termostaticado com agitação recíproca de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1, v/v), e os ácidos graxos liberados na reação de hidrólise catalisada pelas lipases contidas nos resíduos de laranja, titulados com NaOH (0,05 M) e 5 gotas de fenolftaleína.

Análise de proteínas totais

[024] Após cada etapa da obtenção dos extratos brutos e concentrados de lipases, uma alíquota foi analisada quando

ao teor de proteínas totais pelo método de Biureto.

Usos

[025] Atualmente, as lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico e industrial. As características inerentes a este tipo de enzima, tais como ação sob condições amenas, estabilidade em solventes orgânicos, especificidade para substrato e seletividade, propiciam a utilização destas em diversos campos de aplicação. Entretanto, devido ao elevado custo das lipases comerciais atuais muitas aplicações são pouco exploradas, entre as áreas que poderiam iniciar ou expandir a aplicação de lipases se destacam:

- Biodiesel: as lipases podem catalisar a transformação de óleos vegetais em biodiesel, a qual ocorre pela alcoólise, hidrólise seguida de esterificação ou esterificação de ácidos graxos livres. A produção enzimática de biodiesel possui vantagens em relação ao processo químico, como possibilidade de reação em condições brandas (baixas temperatura e pressão) que implica em redução de custos com energia; separação do glicerol, o qual é um subproduto da reação e que apresenta valor comercial e redução de resíduos;

- Química fina: as lipases são utilizadas na produção de misturas racêmicas ou para remoção de alguns componentes indesejados;

- Indústria de alimentos: essas enzimas são empregadas na liberação de ácidos graxos através da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos tipos de alimentos. Dependendo do ácido graxo liberado sabores, colorações ou cheiros são modificados, alterando

características organolépticas, físico-químicas e nutricionais do produto final;

- Biorremediação: entre os resíduos mais tóxicos ao meio ambiente estão os que apresentam elevado teor de lipídeos, até triglicerídeos considerados saudáveis podem se tornar tóxicos após o aquecimento. Neste contexto, reações catalisadas por lipases podem modificar a estrutura dos glicerídeos diminuindo o efeito tóxico destes resíduos;

- Compostos com atividade biológica: a modificação de glicerídeos e ácidos graxos livres, principalmente por reesterificação, também pode ser utilizada para aumentar a atividade biológica, como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral.

[026] Além dos usos mencionados, algumas empresas também podem tirar proveito da tecnologia empregada na presente invenção, por exemplo, aquelas empresas envolvidas no processamento de laranja para suco, que possuem grandes volumes dos resíduos estudados. Cerca de 50% do peso bruto da laranja é convertido em suco, os outros 50% é resíduo desse processo, sendo uma pequena parcela utilizada para extração de óleo essencial e o restante é comercializado como alimento animal, utilizado para geração de energia ou descartado. O uso como fonte de lipases agregaria alto valor a esses resíduos, sem afetar a produção de suco, pois o processamento da laranja não precisaria de modificações.

[027] Além disso, empresas que produzem a enzima lipase sempre buscam equilibrar atividade e custo nas enzimas comercializadas e as lipases provenientes da laranja possuem alta atividade e são de baixo custo.

[028] Empresas que necessitam de lipase em seus

processos, como o processo de extração dessas enzimas é simples e as próprias empresas que necessitam de lipases em seus processos poderiam comprar os resíduos, extrair as lipases e aplicá-las.

[029] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obtenção de extrato concentrado de lipase de alta atividade compreendendo as seguintes etapas:

(a) coleta de subprodutos do processamento de laranja;

(b) trituração mecânica;

(c) congelamento por 24 horas;

(d) liofilização por 48 horas;

(e) congelamento;

caracterizado pelo fato de compreender ainda as seguintes etapas:

(f) fracionamento;

(g) centrifugação;

(h) diálise do precipitado;

(i) congelamento por 24 horas; e

(j) liofilização por 48 horas.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do extrato de lipase de alta atividade ser obtido a partir de subprodutos do processamento de laranja da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck variedade Pera.

3. Processo, de acordo com a presente 2, **caracterizado** pelo fato dos subprodutos do processamento de laranja serem em três frações: *peel* (casca), *frit* e *core* (bagaço).

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato dos extratos enzimáticos brutos serem fracionados por precipitação de sulfato de amônio com 40% de saturação.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato do extrato ser centrifugado por 10 minutos a 5 °C e 10.000 rpm.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do volume precipitado após a centrifugação ser submetido à dialise em membrana de celulose por 24 horas a 5 °C.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato das etapas (g) a (j) serem repetidas para o fracionamento por precipitação com sulfato de amônio com 60 e 80% de saturação.

8. Uso das lipases produzidas conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de ser para catalisar a transformação de óleos vegetais em biodiesel; na produção de misturas racêmicas ou remoção de componentes indesejados; na liberação de ácidos graxos pela hidrólise seletiva de óleos e gorduras dos alimentos; na diminuição do efeito tóxico dos glicerídeos pela modificação de sua estrutura, principalmente por reesterificação.

RESUMO**PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO CONCENTRADO DE LIPASE**

A presente invenção se refere a um processo para obtenção do extrato concentrado de lipase de alta atividade a partir de subprodutos do processamento de laranja da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck variedade Pera. Tais subprodutos são basicamente o *peel* (casca), *frit* e *core* (bagaço). A presente invenção ainda se refere ao uso das lipases produzidas pelo processo produzido na presente invenção.