



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

(21) PI 0720852-9 A2



(22) Data de Depósito: 04/12/2007
(43) Data da Publicação: 11/03/2014
(RPI 2253)

(51) Int.Cl.:
B01D 17/04
B01D 11/02
C11B 1/06
C11B 1/12
C11B 3/00

(54) Título: DESEMULSIFICAÇÃO AUXILIADA POR ENZIMA DE EXTRATOS DE LIPÍDIO AQUOSOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 US 60/876,879

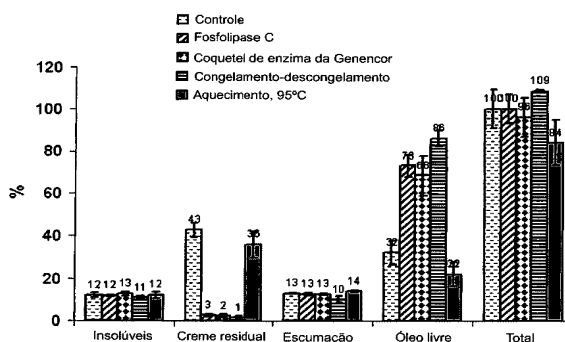
(73) Titular(es): Danisco US INC., Genecor Division, IOWA STATE UNIVERSITY

(72) Inventor(es): Buddhi Prasad Lamsal, Charles E. Glatz, Cheng Zhang, Christopher Penet, Jianping Wu, Lawrence A. Johnson, Peter Birschbach, Stephanie Jung

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007024897 de 04/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/088489de 24/07/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DESEMULSIFICAÇÃO AUXILIADA POR ENZIMA DE EXTRATOS DE LIPÍDIO AQUOSOS"**.

Campo da Invenção

Isso pertence ao uso de enzimas para auxiliar na extração de lipídios das plantas ou tecidos de planta. Mais particularmente, pertence a composições compreendendo enzimas para emulsões desemulsificantes obtidas a partir de extração aquosa de lipídios de plantas, e a métodos aperfeiçoados para se uso.

Antecedentes

Lipídios derivados de planta, particularmente óleos, são uma principal fonte de lipídios para o processamento de alimento, e para o material de alimentação industrial. Mais recentemente eles são de interesse e usam como alternativas a produtos petroquímicos para combustíveis. Lipídios de planta podem ser derivados de uma ou mais partes de uma planta, arbusto, ou árvore. Em várias plantas, a raiz, tronco, casca de árvore, folhas, flores, sementes, frutos, ou outras plantas podem servir como uma fonte de óleo. Tais lipídios podem ser extraídos mecanicamente, por exemplo, através da aplicação de pressão externa, ou quimicamente, por exemplo, através de processos de extração de solvente orgânico ou aquoso, ou processos de combinação.

Óleos de planta são frequentemente classificados ou como essenciais ou fixos. Óleos essenciais são óleos voláteis tipicamente derivados de tecidos outros que não a semente de uma planta. Óleos fixos, também chamados "óleos graxos" incluem óleos derivados de fontes de plantas, por exemplo, soja, milho, canola (semente de colza), girassol, açafrão, amendoim, coco, copra, palma, algodão em rama, oliva, gergelim, semente de linho, e outros.

Óleos obtidos a partir de plantas de semente oleosa são conhecidas para seus usos em alimento, e produtos alimentícios, bem como para sabões, detergentes, loções, lubrificantes, inseticidas, tintas, revestimentos, tintas para impressão, e outros produtos industriais ou de consumidor. Embora a vasta maioria de óleos de semente oleosa são extraídos com um processo

de extração de solvente orgânico, alguns são agora extraídos através de extração aquosa.

Extração com solventes orgânicos é mais rápida e mais eficaz, provisão de rendimentos mais altos de óleo. Isso é sem dúvida o processo comercial dominante para a extração de, por exemplo, óleo de soja, com mais do que 90% da totalidade de óleo de grão de soja extraído com hexano ou outros solventes orgânicos. No entanto, tais solventes possuem questões de segurança substanciais, incluindo o risco de fogo e explosões de solventes, bem como riscos de exposição a conjunto de pessoas. Processos de extração de solvente exigem plantas caras que são preparadas para manipular solventes, bem como a exigência de medidas de segurança. Além disso, o uso em grande escala de solventes orgânicos aumenta as preocupações de administração de resíduo. Além do mais, para as aplicações em processamento de alimento, as extrações à base de solvente podem resultar em proteínas desnaturadas, alteradas ou menos funcionais no restante, porção extraída da semente oleosa (por exemplo, o "alimento"), diminuição do valor ou do uso dessa porção potencialmente mais valiosa da semente oleosa.

Processos aquosos para a extração óleos de sementes oleosas foram desenvolvidos em anos recentes. Vide Freitas e outros, *Fett/Lipídio* 99: 333-337, 1997; e Caetano e outros, *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 79: 165-169, 2002. Both Freitas e outros, e Caetano e outros, proveem uma combinação de tratamento de protease e extrusão para extrair óleos nos processos aquosos. Etapas de processo aquoso são inerentemente mais seguros do que etapas de extração de solvente orgânico e correspondentemente, o investimento de partida inicial no equipamento de capital é substancialmente menor para os processos de extração aquosa. Processos de extração aquosa, no entanto, frequentemente resultam em rendimentos menos eficaz e diminuído de óleos quando comparados com extração de solvente orgânico.

Há uma necessidade, portanto, na técnica de etapas de processamento para aperfeiçoar métodos de extração aquosa para a obtenção óleos a partir de fontes de planta, especialmente sementes oleosas. Há tam-

bém uma necessidade de aumentar a eficácia ou rendimentos de tais processos.

Sumário

Em vários de seus aspectos, processos são providos por uso de emulsões de óleo em água desemulsificantes obtidas a partir de extração aquosa de tecidos de planta, particularmente sementes oleosas, por exemplo pelo uso de várias enzimas. Também providos são métodos para a obtenção óleo a partir de sementes oleosas em que o método inclui extração aquosa e desemulsificação enzimática de uma emulsão de óleo em água resultante. Óleo derivado pelos processos e métodos, bem como composições compreendendo o óleo tais como alimento, produtos de consumidor e materiais de alimentação industriais são também providos. Composições compreendendo enzimas capazes de desemulsificar uma emulsão de óleo em água e ulteriormente compreendendo uma emulsão de óleo em água são também providos aqui. Em um aspecto, providos são processos para a desestabilização de uma emulsão compreendendo uma fase oleosa e uma fase aquosa, onde a emulsão foi produzida em uma extração de solvente aquoso de um lipídio de uma semente oleosa. O processo compreende a etapa de contato da emulsão com pelo menos uma atividade de enzima incluindo pelo menos uma fosfolipase ou uma protease, ou uma sua combinação, sob condições que permitem atividade de pelo menos a fosfolipase ou a protease, ou a combinação, por um tempo suficiente para desestabilizar a emulsão. Em certas concretizações preferidas a fase aquosa é a fase contínua da emulsão e da fase oleosa é a fase descontínua da emulsão.

Em um outro aspecto, processos são providos para a obtenção de óleo a partir de uma semente oleosa. Os processos em geral compreendem as etapas de:

- (a) provisão de uma fração de semente oleosa contendo óleo;
- (b) contato da fração de semente oleosa contendo óleo com um agente de extração aquoso para formar uma fração de semente oleosa extraída;
- (c) separação da fração de semente oleosa extraída em uma fase aquosa, uma emulsão de óleo em água, e uma fase insolúvel;

(d) contato da emulsão de óleo em água com pelo menos uma atividade de enzima sob condições que permitem atividade de enzima por um tempo suficiente para desestabilizar a emulsão; e

5 (e) separação da emulsão desestabilizada em uma fase aquosa, uma fase oleosa, e uma fase insolúvel.

Os processos resultam na obtenção de óleo a partir da semente oleosa. Em uma concretização, a fração de semente oleosa contendo óleo compreende células e o processo ulteriormente compreende a etapa de rompimento das células antes do contato da fração de semente oleosa com
10 o agente de extração aquoso.

Também providos aqui são óleos derivados de planta preparados pelos processos revelados acima, bem como um hospedeiro de produtos alimentícios compreendendo o óleo assim obtido.

Em um outro aspecto da invenção, composições são providas
15 compreendendo pelo menos uma atividade de enzima capaz de desestabilizar uma emulsão de óleo em água; e uma emulsão de óleo em água obtida a partir de uma extração de solvente aquoso de uma fração de semente oleosa contendo óleo. Em uma concretização a atividade de enzima compreende pelo menos uma fosfolipase ou uma protease, ou qualquer combinação
20 de uma ou mais tais atividades. Também providos aqui são óleos derivados de planta isolados das composições ensinadas aqui. Um outro aspecto providos métodos para a obtenção de óleo de planta a partir de uma fração de semente oleosa. Os métodos compreendem as etapas de:

(a) provisão de uma composição compreendendo pelo menos
25 uma atividade de enzima capaz de desestabilizar uma emulsão de óleo em água, e uma emulsão de óleo em água obtida a partir de uma extração de solvente aquoso de uma fração de semente oleosa contendo óleo;

(b) provisão de condições sob as quais a atividade de enzima desestabiliza a emulsão de óleo em água; e

30 (c) separação de uma composição em pelo menos uma fase aquosa e uma fase de lipídio, onde a fase de lipídio compreende o óleo de planta.

Também providos aqui são óleo derivado de planta compreendendo óleo de planta preparado pelos métodos revelados, bem como produtos alimentícios, produtos de consumidor, e materiais de alimentação industriais compreendendo óleo de planta assim preparado ou obtido. Composições de proteína preparadas de acordo com os métodos providos aqui são também providos – essas são úteis como fontes de proteína de funcionalidade aperfeiçoada. Produtos alimentícios, produtos de consumidor, e materiais de alimentação industriais compreendendo proteína preparada pelos métodos ensinados aqui são também providos.

Biocombustíveis ou ecocombustíveis compreendendo os óleos de planta ou proteínas preparadas por qualquer um dos métodos revelados são também providos aqui.

Esses e outros aspectos serão ulteriormente ilustrados através da seguinte descrição detalhada, figuras e exemplo, que destinam-se a ilustrar as várias concretizações.

Breve Descrição dos Desenhos

As figuras anexas servem para ulteriormente explicar ou ilustrar vários aspectos das composições ou métodos descritos mais totalmente aqui e exemplificados abaixo.

Figura 1: Rendimento de óleo recuperado como uma função de concentração de enzima. Círculos cheios: Concentrado de protease fúngico; Quadrados abertos: enzima LisoMax^(R). Reações incubadas por 90 min a 50°C.

Figura 2: Rendimento de óleo recuperado, como uma função de pH. O pH do creme antes que o ajuste fosse 8,0.

Figura 3: Fluxograma que mostra um processo de extração aquosa exemplar para a obtenção de óleo a partir de semente oleosa.

Figura 4: Distribuição oleosa em frações especificadas depois da extração aquosa auxiliada por enzima, e o/w de rompimento de emulsão depois da extração aquosa mais e desemulsificação auxiliada por enzima com tratamentos como indicados. Símbolos são como se segue: quadrados com: marcas tracejadas = controle; tiras diagonais = fosfolipase C; diamantes =

coquetel de enzima da Genencor; tiras horizontais = congelamento-descongelamento; quadrados cheios = tratamento térmico a 95°C.

Descrição Detalhada de Concretizações Ilustrativas

Abreviações e Acronismos:

- 5 EC (ou E. C): Enzima número de acesso (número de EC);
 FPa: Protease fúngica 500.000 (Genencor- A Danisco Division);
 FPb (ou FPC): Concentrado de protease fúngico (Genencor- A Danisco Division);
 HCl: Ácido clorídrico;
- 10 IP3: Trifosfato de inositol;
 o/w: emulsão de óleo em água (também algumas vezes chamados de "creme");
 PIP2 : Fosfatidilinositol-bisfosfato;
 PLI: lisofosfolipase, (G-ZYME(R) G999);
- 15 PL2: fosfolipase A, (LisoMax(R))
 P6L: Protex [beta]L;
 pi: Ponto isoelétrico;
 w/w: peso por peso (usualmente expresso como uma percentagem, como em "% w/w" ou % (w/w)).

20 Definições:

Como usado aqui uma "emulsão" compreende um pelo menos sistema transitoriamente estável compreendendo uma mistura física de pelo menos dois materiais, não totalmente miscíveis com, ou solúveis em, entre si. Emulsões preferidas, como usado aqui, não prontamente separam quando são deixadas que se repouse não interrompidas, e podem permanecer misturadas por comprimentos de tempo consideráveis. Elas de preferência permanecerão estáveis por períodos de tempo prolongados tais como mais do que cerca de 1, 2, 4, 8, 12, ou 24 horas, ou ainda mais. Enquanto sistemas de emulsão podem compreender sólidos, líquidos, e gases, de preferência, as emulsões para o uso aqui compreendem pelo menos uma fase de lipídio e uma fase aquosa, ambas as quais estão no estado líquido. Uma fase em uma emulsão é contínua, enquanto a outra fase é dispersa em e

assim, descontínua com, a outra. Por exemplo, uma emulsão de "óleo em água" tem uma fase oleosa descontínua dispersa em uma fase aquosa contínua, enquanto que uma emulsão de "água em óleo" tem uma fase aquosa descontínua dispersa em uma fase oleosa ou de lipídio contínua. Em um sentido prático, a fase descontínua consiste em gotículas pequenas dispersas e contidas dentro da outra fase. A fase descontínua é assim também algumas vezes chamadas a fase "internal", e por analogia, a fase contínua é algumas vezes chamadas a fase "externa". Sob certas circunstâncias uma emulsão pode inverter, isto é, as fases contínua e descontínua podem mudar as regras, por exemplo, uma emulsão de óleo em água se torna uma emulsão de água em óleo ou vice-versa.

Deve ser entendido que o uso dos termos "óleo em água" e "água em óleo" aqui são meramente descritivos para auxiliar no entendimento de leitura que das fases são contínuas e que são dispersas em um dado sistema de emulsão; elas não limitam a emulsão literalmente a óleo e água. A fase de "água" ou aquosa pode conter um ou mais solutos, tais como sais, e qualquer número de outros compostos solúveis, ou parcialmente solúveis. Similarmente, a fase "oleosa" ou lipídica pode conter uma ampla variedade de compostos solúveis de lipídios ou lipídios.

Alguns compostos têm a capacidade de estabilizar emulsões, por exemplo, por alteração da tensão superficial e/ou tensão interfacial entre as fases contínuas e descontínuas, por prevenção das "gotículas" de fase descontínua dispersa de agregação ou coalescência, ou mesmo por aumento da viscosidade da fase contínua. Moléculas que têm tanto porções carregadas (por exemplo, iônicas) quanto não carregadas (não iônicas) frequentemente servem como estabilizadores. Uma vez que elas são moléculas anfífilas, que possuem tanto propriedades lipofílicas quanto hidrofílicas, elas tendem a concentrar nas interfaces entre as duas fases e controlar tensão superficial. Exemplos de estabilizadores incluem muitas proteínas, tensoativos, glicerol, monoglicerídeos, diglicerídeos, e fosfolipídios. Um grupo de fosfolipídios é conhecido como lecitinas. Amplamente usados como emulsificadores naturais, lecitinas incluem vários componentes, incluindo fosfatidil-

colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, e/ou ácido fosfatídico. Muitos tais estabilizadores estão naturalmente presentes em plantas e mais especificamente em tecidos contendo lipídio e de armazenagem de lipídio de plantas, tais como sementes oleosas e suas frações. Em concretizações particularmente preferidas exemplificadas aqui, a semente oleosa é soja. Sojas são conhecidas como contendo quantidades significativas de fosfolipídios (por exemplo, lecitinas) e proteínas que sejam capazes de estabilizar emulsões.

Como usado aqui "óleo" significa qualquer um grupo de gorduras (ou lipídios) que permanecem líquido à temperatura ambiente. "Óleo de planta" como usado aqui significa quaisquer tais óleos que são obtidos a partir de qualquer tecido de uma planta. Óleos de planta são também chamados aqui alternativamente de "óleos derivados de planta". Em certas concretizações óleos de planta são cosmetíveis, enquanto em outras concretizações eles não são necessariamente comestíveis. Alguns óleos podem ser apropriadamente e seguramente usados para a aplicação externa a um animal tal como um ser humano, enquanto outros óleos podem ser totalmente não comestíveis, e também não seguros para o uso externo em um animal. Tais óleos podem apesar disso ser valiosos para o uso de processo industrial, como lubrificantes, produtos de limpeza ou de polimento, ou simplesmente como material de alimentação para a produção de outras composições ou produtos que exigem um lipídio como uma matéria-prima. Por exemplo, alguns lipídios são úteis como combustíveis ou suplementos de combustível. É presentemente de interesse significativo em fontes biológicas ou renováveis de combustíveis, tais como combustíveis combustíveis, por exemplo, lipídios para o uso em biodiesel.

"Semente oleosa" como usada aqui refere-se a qualquer semente contendo óleo, noz, semente, ou semelhantes produzida por uma planta. Todas as tais plantas, bem como suas sementes, nozes, ou sementes são contemplados para o uso aqui. Por exemplo, o National Sustainable Agriculture Information Service lista as seguintes como fontes de óleo para o alimento, especialmente, ou usos industriais: amêndoas, sementes de damasco, abacate, noz de faia, mirtílio, groselha negra, borragem, castanha-do-

pará, calêndula, semente de alcoravia, noz de caju, semente de rícino, semente cítrica, cravo, coco, café, copra (coco seco), coentro, semente de milho, semente de algodão, baga de sabugueiro, prímula da noite, semente de uva, amendoim, avelã, semente de cânhamo, jojoba, linhaça, noz de macadamia, flor da noz-moscada, semente de melão, semente de mostarda, semente de "neem", semente "niger", noz-mocada, semente de palma, fruto da paixão, pecã, pistache, semente de papoula, semente de abóbora, semente de colza, semente de framboesa, pimenta vermelha, fruto da roseira brava, semente de borracha, semente de açafraão, espinheiro cerval do mar, semente de gergelim, soja, eufórbio, urtiga, semente de girassol, planta de tropho, semente de tomate, ou noz. Também úteis são várias plantas relacionadas e semente oleosa cujo teor de óleo é de interesse para o uso como combustível, tais como "ecocombustível", biodiesel ou semelhantes. Tais plantas incluem, mas não são limitadas a *Jatropha* (por exemplo, *Jatropha curcas*, *J. mahafalensis*, e seus cultivares); *Elaeis guineensis* (por exemplo, óleo de palma), *Aleurites fordii* (árvore de óleo de tungue ou árvore de óleo de madeira), *Ricinus communis* (árvores de semente de rícino), *Copaifera langsdorfii* (árvore de diesel), e *Pongammia pinnata* (árvore de óleo de "honge", ou árvore de "pongam", e seus cultivares).

Uma "fração contendo óleo" ou "fração contendo lipídio" como usado aqui refere-se à semente oleosa ou alguma sua porção ou parte, no entanto, obtida. Em concretizações preferidas, a fração contendo óleo compreenderá a totalidade, ou pelo menos a maior parte do óleo (ou teor de gordura ou de lipídio) da semente oleosa. Em outras concretizações, uma etapa de processamento anterior pode remover pelo menos algum, ou ainda a maior parte do óleo a partir da semente oleosa antes da obtenção da fração. Assim, por exemplo, em certas concretizações usando-se soja como fonte de semente oleosa, a "fração" compreende farinha de soja ou flocos de soja. De preferência, a farinha ou flocos obtidos são "de gordura completa" como aquele termo é entendido na técnica. No entanto, que não preclui o uso dos processos providos aqui com, por exemplo, frações parcialmente desengorduradas, tais como farinha de soja ou flocos de soja. Fatores econô-

micos podem prover motivação para usar frações contendo pelo menos uma maior parte de gordura, no entanto não há nenhuma barreira técnica conhecida para o uso das frações de processos reveladas compreendendo menos do que uma maior parte de gordura da semente oleosa inteira.

5 Para certas concretizações, a fração contendo óleo é oriunda de uma fonte principal de óleo industrial ou alimento. Presentemente, soja, semente de milho, semente de algodão, e semente de colza, bem como semente de girassol, açafraão, semente de linho, e amendoim são preferidos como fontes de óleo de alimento.

10 Como usado aqui, um "solvente aquoso" compreende pelo menos água. Solventes aquosos tipicamente compreendem outros componentes tais como sais, compostos de tamponamento, moléculas pequenas, e mais. Qualquer número e concentração de componentes adicionais podem estar presentes proveram o solvente aquoso que é substancialmente uma
15 suspensão ou solução homogênea em água. Esse solvente aquoso, com os componentes adicionais como uma solução ou suspensão substancialmente homogênea, é algumas vezes chamado aqui de um "agente de extração aquosa" para conveniência e para distingui-lo do solvente per se, por exemplo, água. Os dois termos são sinônimos como definidos aqui. De preferência todos os componentes presentes estão em solução verdadeira no agente
20 de extração aquoso ou solvente aquoso. Um solvente aquoso é distinguido de um solvente orgânico pelo fato de que ao invés de água como o solvente, o termo "solvente orgânico" refere-se a maioria dos outros solventes que são compostos orgânicos e contêm átomos de carbono. Solventes orgânicos são
25 mais voláteis e potencialmente explosivos do que solvente aquosos. Tipicamente, extração de solvente orgânico de óleos refere-se a qualquer processo usado para remover um óleo a partir de sementes oleosas através de contato direto com um solvente orgânico tais como n-hexano ou outros hexanos.

30 "Microbiano" como usado aqui refere-se a uma fonte de atividades de enzima, por exemplo, inclui todas as formas de vida e transformadas em células simples, incluindo mas não limitadas à bacteriana, fúngica, de

alga (micro e macro), levedura, protozoário e semelhantes. Fontes preferidas são frequentemente bacterianos ou fúngicos, especialmente aqueles organismos que historicamente ou frequentemente foram a fonte de enzimas para o processamento de alimento que são em geral reconhecidas como seguras ou semelhantes.

"Atividade de enzima" como usado aqui refere-se a uma reação química catalisada por uma ou mais proteínas catalíticas (enzimas). Uma enzima particular, ou preparação de enzima pode prover uma ou mais atividades de enzima. Por exemplo, uma enzima pura pode ser capaz de catalisar mais do que uma reação enzimática (isto é, conversão de um substrato em produto(s)) e assim, pode ser dito ter mais do que uma "atividade de enzima". A capacidade de converter um substrato particular em um produto ou produtos correspondentes é, para finalidades aqui, uma "atividade de enzima" sem relação ao número de proteínas ou sua pureza. Em muitos casos, preparações de enzima comerciais não são enzima(s) bioquimicamente "pura(s)". Tais preparações podem prover uma variedade de atividades de enzima em uma ou mais enzimas físicas. Algumas preparações de enzima comerciais são projetadas para prover mais do que uma atividade de enzima, para permitir uma faixa mais ampla de aplicações para a preparação de enzima. Uma enzima pura tendo uma atividade de enzima simples não pode prover funcionalidade o suficiente a ser útil sob condições de processamento, ou em um sistema complexo, tal como uma matriz de alimento. Correspondentemente, para as finalidades aqui, uma "atividade de enzima" não é necessariamente sinônimo com uma enzima. Cada atividade de enzima pode ser catalisada por uma ou mais enzimas, e uma dada enzima ou preparação de enzima pode ter uma ou mais tais atividades.

"Diulente de combustível de diesel" como usado aqui compreende qualquer composição que pode ser usada como uma substituição ou usar como substituto de, ou em vez de diesel ou qualquer combustível derivado de produto petroquímico, ou para prolongar, diluir, ou aperfeiçoar a eficácia do uso de tal combustível derivado de diesel ou outro combustível derivado de produto petroquímico. Como usado aqui "diulente de combustível de die-

sel" pode ser substituto de diesel parcial ou completo, uma fonte de combustível alternativa ou aditivo de combustível. "Biodiesel" e "ecocombustível" são termos usados na técnica para significar um exemplo de tais combustíveis que oferecem vantagens incluindo derivação de recursos renováveis, ou ainda óleo à base de planta residual. Como usado aqui, "diulentes de combustível de diesel" podem ser compatíveis com o uso em sistemas de queima de combustível padrão, por exemplo, motores de diesel padrão (tais como caminhões, ônibus, ou automóveis a diesel), ou podem apenas ser adequados para o uso em sistemas de queima de combustível padrão que são adaptados para sistemas de queima de combustível. Tal combustível pode ser usado para qualquer finalidade normalmente usada para combustíveis à base de produto petroquímico, por exemplo, geração de potência, produção de calor, combustível de motor, e semelhantes. Um óleo de planta obtido ou preparado de acordo com o métodos ou processos providos pode ter um uso inicial, por exemplo, na indústria de alimento, e um uso secundário como um combustível de acordo com o exposto acima. Assim, é contemplado que certos óleos de planta preparados por ou recuperados usando-se a presente revelação será útil para uma, duas ou ainda mais finalidades antes do uso final como um combustível.

Em um primeiro dos vários aspectos, métodos ou processos são providos para a desestabilização de uma emulsão compreendendo uma fase oleosa e uma fase aquosa. A emulsão é derivada de, ou produzida em, uma extração de solvente aquoso de um lipídio de uma semente oleosa. A emulsão é posta em contato com pelo menos uma atividade de enzima incluindo pelo menos uma fosfolipase ou uma protease, sob condições permitindo atividade de enzima, por um tempo suficiente para desestabilizar a emulsão.

Em concretizações preferidas, a fase aquosa é uma fase contínua e a fase oleosa é uma fase descontínua, isto é, a emulsão é uma emulsão de óleo em água.

Em certas concretizações, os processos ulteriormente incluem uma etapa de separação para separar a fase oleosa da fase aquosa. Processos para separação de óleo da fase aquosas são conhecidos na técnica.

Frequentemente, eles envolvem a gravidade ou mais de preferência forças em excesso de gravidade, por exemplo, forças aplicadas através de meios físicos tal como centrifugação. Em uma concretização, as emulsões são centrifugadas em um processo por batelada. Em várias concretizações, as condições para a separação podem incluir o ajuste da emulsão depois do tratamento com enzima para uma temperatura preferida, por exemplo, por aquecimento. Em uma outra concretização, centrifugação contínua é preferida para a separação do óleo da fase aquosa. Processos contínuos podem ser preferidos para operações em grande escala e são bem adequados para manipulação de material pelo recipiente cheio, por exemplo, de silos, tanques, toneis, ou semelhantes, ou ainda em séries ligadas de tais recipientes.

De preferência, os processos providos aqui aperfeiçoam o rendimento de óleo a partir da emulsão. O especialista versado apreciará como monitorar o rendimento em uma variedade de bases. Em geral, as comparações de rendimento são produzidas por comparação, por exemplo, do rendimento de óleo (por exemplo, com uma base em % de rendimento máximo teórico do teor de óleo da emulsão não tratada) usando-se os processos revelados aqui para o rendimento de uma extração aquosa que não usa a etapa de contato da emulsão com a atividade de enzima. Outras bases de rendimento podem ser usadas, por exemplo, um aperfeiçoamento de recuperação de óleo usando-se os processos revelados aqui versus um processo de "controle".

Em concretizações preferidas, a emulsão é posta em contato com pelo menos uma atividade de enzima compreendendo pelo menos uma atividade de fosfolipase ou uma atividade de protease. Misturas e combinações de enzimas que incluem um ou mais de qualquer ou ambos os tipos expostos acima de atividades são também adequadas. Enquanto tais atividades de enzima oriundas de qualquer fonte tal como animal, planta, ou microbiano, são contempladas para o uso aqui, a atividade de enzima de preferência compreende uma atividade de fosfolipase oriunda de um pâncreas de mamífero, *Streptomyces violaceoruber*, *Aspergillus oryzae*, ou *Aspergillus niger*. Em uma concretização, a atividade de fosfolipase é oriunda de pân-

creas de porco.

Várias atividades de fosfolipase provadas úteis para a desestabilização da emulsão de acordo com os processos revelados aqui. Fosfolipases para as finalidades aqui incluem, mas não são limitadas a, fosfolipases A (incluindo A1 e A2), B (também algumas vezes chamada de lisofosfolipase), C, e D. Fosfolipases são uma classe de enzimas que hidrolisam fosfolipídios, tal como fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina. Dentro de uma classe de fosfolipase de enzimas tem cinco principais subclasses, fosfolipases A1, A2, B, C, e D.

Fosfolipases A1 (E. C. 3.1.1.32) de preferência hidrolisam as ligações de éster de sn1 de fosfolipídios, tal como fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, para dar rendimento de 1-lisofosfolipídios mais ácidos carboxílicos. Tipicamente, fosfolipases A1 exigem cálcio como um cofator. Fosfolipases A1 em geral exibem especificidade mais ampla do que fosfolipase A2.

Fosfolipase A2 (E. C. 3.1.1.4) de preferência hidrolisam as ligações de éster de sn2 de fosfolipídios, tal como fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, para fornecer 2-lisofosfolipídios mais ácidos carboxílicos. Além de fosfolipídios, fosfolipases A2 mostram alguma especificidade para hidrólise de derivados de colina e fosfatídeos. Tipicamente, fosfolipases A2 exigem cálcio como um cofator.

Fosfolipases B (E. C. 3.1.1.5) são também conhecidas como lisofosfolipases. Elas de preferência hidrolisam as ligações de éster de sn1 de 2-lisofosfolipídios para fornecer glicerofosfatídeos mais ácidos carboxílicos. Fosfolipases B também hidrolisam as ligações de éster de sn2 de 1-lisofosfolipídios.

Fosfolipases C (E. C. 3.1.4.3) de preferência hidrolisam as ligações de fosfato de fosfolipídios, tal como fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, para fornecer os correspondentes diacilgliceróis e fosfatos de colina correspondentes. Além de hidrólise de fosfolipídios, fosfolipases C também agem nos lisofosfolipídios.

Fosfolipases D (E. C. 3.1.4.4) de preferência hidrolisam a ligação de fosfato de fosfolipídios tal como fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina

para fornecer os ácidos fosfatídicos e colina correspondentes. Além de hidrólise de fosfolipídios, fosfolipases D também agirão no lisofosfolipídios.

Fosfolipases podem ser individualmente ou em combinação ou misturas de uma ou mais atividades das classificações de E. C iguais ou diferentes, e de fontes iguais ou diferentes. Preparações de enzima bruta ou parcialmente purificadas contendo uma ou mais atividades de fosfolipase são adequadas para o uso em algumas concretizações aqui. Fontes comerciais de fosfolipases são também adequadas para o uso aqui. Por exemplo, Genencor- A Danisco Division (Rochester, NY) oferece fosfolipases Liso-
5 Max[®] e G-ZYME[®] G999, de fontes bacteriana e fúngica, respectivamente. Fosfolipase C está comercialmente disponível, por exemplo, da Sigma (St. Louis, MO).

Em outras concretizações, a atividade de enzima compreende uma atividade de protease, tal como uma atividade de protease dos *Bacillus amyloliquifaciens*. Em ainda outras concretizações a atividade de enzima
15 compreende uma ou mais atividades de protease oriunda de uma fonte de planta, animal ou microbiana. Atividades presentemente preferidas derivam de fontes microbianas incluindo *B. subtilis*, *B. lichenformis*, *A. niger* ou *A. oryzae*, além de *B. amyloliquifaciens* descritas acima. Como com fosfolipases, combinações ou misturas, se purificadas, parcialmente purificadas ou
20 brutas, compreendendo uma ou mais atividades de protease de qualquer classificação de E. C. e de quaisquer fontes são adequadas para o uso aqui. Em uma concretização, a atividade de protease compreende uma endopeptidase. Metaloproteases, se exo- ou endoproteases, forem adequadas para o
25 uso com os processos e composições revelados. Metalo-endoproteases são preferidos em algumas concretizações. Proteases fúngicas são também adequadas para o uso em certas concretizações. Muitas fontes comerciais de proteases são apropriadas. Genencor- A Danisco Division (Rochester, NY) oferece Protease fúngica 500.000 e proteases de concentrado de protease
30 fúngico, cada uma das quais compreende atividade de protease neutra a ácida estável, e cada uma das quais é exemplificada aqui. Elas também oferecem protease de Protex 6L, também exemplificadas aqui, que compreende

atividade de protease bacteriana e prefere condições neutras a levemente alcalinas.

Em um outro aspecto, processos são providos para a obtenção de óleo a partir de uma semente oleosa compreendendo as etapas de:

- 5 (a) provisão de uma fração de semente oleosa contendo óleo;
- (b) contato da fração de semente oleosa contendo óleo com um agente de extração aquoso para formar uma fração de semente oleosa extraída;
- (c) separação da fração de semente oleosa extraída em uma
10 fase aquosa, uma emulsão de óleo em água, e uma fase insolúvel;
- (d) contato da emulsão de óleo em água com pelo menos uma atividade de enzima capaz de estabilizar a emulsão sob condições que permitem atividade de enzima por um tempo suficiente para desestabilizar a emulsão; e
- 15 (e) separação da emulsão desestabilizada em uma fase aquosa, uma fase oleosa, e uma fase insolúvel; desse modo obtendo-se óleo a partir da semente oleosa.

Em uma concretização, a fração de semente oleosa contendo óleo compreende células e o processo ulteriormente compreende a etapa de
20 rompimento das células antes do contato da fração de semente oleosa com o agente de extração aquoso. Presentemente métodos preferidos de rompimento de células incluem aplicação de uma fonte mecânica. Extrusão é um método conveniente de rompimento de células em sementes contendo óleo. Tal uso de extrusores é conhecido na técnica, por exemplo, extrusores de
25 parafuso único ou de parafuso duplo são, portanto, úteis. O especialista versado pode prontamente determinar os parâmetros para o rompimento de células em sementes oleosas por medição da recuperação ou rendimento de óleo, enquanto a variação dos parâmetros de extrusão tais como tempo, tempo de trânsito, pressão, temperatura, pH, e semelhantes. Outros métodos de rompimento de células incluem tratamento químico e ou enzimático,
30 além de métodos mecânicos adicionais tais como pressão, rolamento, abrasão, sonicação, e outros.

Em algumas concretizações presentemente preferidas, a emulsão de óleo em água é posto em contato com atividade de enzima compreendendo pelo menos uma atividade de fosfolipase ou uma atividade de protease, por exemplo de uma fonte de animal, planta, ou microbiana. Combinações ou misturas de uma ou mais tais atividades de enzimas são também expressamente incluídas para o uso aqui. Em uma concretização, a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase de um pâncreas de mamífero (por exemplo, suíno, bovino, equino, ovino, ou outro), ou de uma fonte microbiana se bacteriana, fúngica, de alga ou semelhantes, por exemplo, de *Streptomyces violaceoruber*, *Aspergillus oryzae*, ou *Aspergillus niger*. Em uma concretização preferida a enzima está disponível de um organismo que é em geral reconhecida como segura ou útil com consumíveis tal como alimento de ser humano e alimento de animal, e outros produtos de consumidor tais como cosméticos e produtos de cuidado de pele.

Em uma outra concretização, a atividade de enzima compreende uma atividade de protease, por exemplo, de uma fonte bacteriana, fúngica, ou de alga. Uma fonte bacteriana presentemente preferida de atividade de protease é *Bacillus amyloliquifaciens*. Outras fontes presentemente preferidas para o uso aqui são de fontes microbianas incluindo por exemplo, *B. subtilis*, *B. lichenformis*, *A. niger*, e *A. oryzae*. Em certas concretizações, a atividade de protease compreende uma endopeptidase, que pode ser uma metaloprotease em várias concretizações.

O processo pode incluir uma etapa de centrifugação para cada ou ambas as etapas de separação. O especialista versado apreciará o uso de centrifugação para separação de fases de diferentes densidades, tais como as fases aquosas e oleosas presentes na emulsão do processo provido.

Em algumas concretizações, o pH é ajustado para entre cerca de 3,5 a cerca de 5 antes da etapa de separação. Tal ajuste pode auxiliar a desestabilizar a emulsão em uma variedade de modos. Sem limitar o processo a qualquer uma teoria de operação, um ajuste de pH pode auxiliar a precipitar uma ou mais proteínas, as ditas proteínas talvez envolvidas na

estabilização da emulsão. Alternativamente, elas podem minimizar diferença de carga nos grupos que diminuem ou previnem a fase descontínua de coalescência ou agregação. Os ajustes de pH podem também trabalhar por permitir que as enzimas funcionem melhor no processo de estabilização -
5 por exemplo, permitir que a enzima e o substrato mais rapidamente se associem, aumento de catálise real, ou por auxílio que o produtos mais rapidamente difusem ou saem do sítio ativo, assim direção do conversão de substrato em produto.

Em uma concretização, o próprio agente de extração aquoso
10 compreende uma ou mais enzimas. De preferência as enzimas incluem uma ou mais de uma protease, uma celulase, uma hemicelulase, uma pectinase, uma glucanase, uma fosfolipase, uma lipase, uma lecithinase, ou uma amilase. Tais atividades podem auxiliar na recuperação de óleo e a base de material celular que retém o dito óleo. Em alguns casos, pelo menos uma atividade
15 de fosfolipase ou uma atividade de protease no agente de extração aquoso separa com a emulsão de óleo em água na primeira etapa de separação. A enzima sobrevivente ou de cosseparação (fosfolipase ou protease) é algumas vezes chamada aqui de atividade de transferência. A atividade de transferência está presente com a emulsão de óleo em água e desestabiliza
20 aquela emulsão quando provida com condições adequadas para a atividade, por um tempo adequado. Tal processo de provisão de enzima suficiente inicialmente, então o emprego de condições de processo adequadas para prover atividade de transferência na etapa tardia pode facilitar recuperação de óleo por permissão que a adição de uma etapa ser suficiente para o processo total. O especialista versado pode prontamente determinar se atividade
25 de enzima suficiente transportasse para dentro da emulsão de óleo em água.

Em concretizações particulares desse aspecto, a fração de semente oleosa é oriunda de soja, semente de milho, semente de colza, semente de palma, semente de girassol, semente de açafreão, coco, amendoim,
30 semente de algodão, semente de gergelim, semente de linho, semente de papoula, amêndoa, avelã, noz, semente de primula da noite, semente de

uva, semente de cânhamo, semente de groselha negra, semente de framboesa vermelha, semente de cenoura, semente de cominho, semente de mertílio, semente de oxicoco, semente de salsa, semente de ceboula, semente de abóbora, semente de damasco, semente de mostarda, linhaça, ou semente de rícino. Como discutido acima, várias espécies consideradas serem úteis ou potencialmente úteis para usos relacionados com biodiesel e com combustível similar incluindo, por exemplo, jatropha, óleo de palma, árvore de óleo de madeira ou óleo de tungue, árvores de semente de rícino, árvore de diesel, e árvore de óleo de honge e quaisquer cultivares de qualquer um dos expostos acima são também contemplados para o uso aqui.

Em certas concretizações preferidas, a fração de semente oleosa compreende uma fração de proteína que é útil como um alimento, um ingrediente de alimento, um aditivo alimentar, ou um suplemento alimentar. É algumas vezes ou ainda frequentemente o caso que a fração de proteína da semente oleosa é mais valiosa do que a fração oleosa. Um benefício antecipado dos processos de extração aquosa é que eles deixam o resíduo extraído em um estado nativo ou mais funcional, por exemplo, as proteínas não são desnaturadas ou retêm maior funcionalidade através do contato com o solvente aquoso; isto é valioso ao processador de alimento. Se para o uso como alimento ou refeição ou outro uso, os processos providos aqui recuperação de uma fração de proteína que não foi exposta a solventes orgânicos potencialmente perigosos ou nocivos. Como tais as proteínas são menos prováveis de serem desnaturadas e podem ainda ter melhor aceitação pelo consumidor entre certos grupos de consumidores.

Em uma concretização, a fração de semente oleosa compreende flocos de soja ou farinha de soja. É preferido que a fração de semente oleosa é flocos "de gordura total" ou "farinha de gordura total". O especialista versado entenderá que "gordura total" é um termo na técnica que trabalha com frações de semente oleosa tais como de soja e milho. Gordura total é em um sentido o oposto de desengordurado - em que essencialmente todos os lipídios são removidos a partir de, por exemplo, flocos de soja, farinha de soja, ou germe de trigo. O especialista versado apreciará que o processo provido

aqui é compatível com não apenas frações de gordura total, mas também com frações parcialmente desengorduradas de semente oleosa - se flocos, farinha grossa, germe, farinha, ou semelhantes.

Em certas concretizações, as condições incluem o ajuste do pH da emulsão de óleo em água a entre cerca de 3,5 e cerca de 5. Há uma ampla variedade de métodos para afetar o ajuste de pH - incluindo, mas não limitado à adição de HCl, ou outros ácidos, incluindo ácidos orgânicos ou seus sais. Para usos como alimento, tais ácidos são de preferência ingredientes de alimento, ou em geral reconhecidos como seguros para o uso em alimentos pelos corpos reguladores apropriados.

Em uma concretização preferida, os processos providos aqui aperfeiçoam o rendimento de óleo a partir da semente oleosa quando comparados com aquele de uma extração de solvente aquoso que não usa a etapa de contato da emulsão com a atividade de enzima. Em uma concretização mais preferida, as abordagens de recuperação de óleo que obtidas com uma extração de solvente orgânico.

Em ainda um outro aspecto óleos derivados de planta são providos, os ditos óleos preparados por qualquer um dos processos descritos aqui. Em uma concretização, o óleo está substancialmente livre de proteínas, fosfolípidios, ou impurezas aquosas. Também providos são produtos alimentícios compreendendo o óleo.

Em um outro aspecto aqui, composições são providas que compreendem pelo menos uma atividade de enzima capaz de desestabilizar uma emulsão de óleo em água; e ulteriormente compreendem uma emulsão de óleo em água obtida a partir de uma extração de solvente aquoso de uma fração de semente oleosa contendo óleo. Tais composições são intermediários nos processos providos. Elas são úteis como material de partida na extração de óleo de uma emulsão de óleo em água obtida a partir da extração de solvente aquoso de uma semente oleosa. Elas podem também ser úteis como um ingrediente funcional para a adição diretamente a um alimento. Essas composições podem auxiliar a prover um componente de lipídio de alta qualidade, enquanto provisão simultânea de proteína funcional de alta

qualidade e teor de fosfolipídio. Uma vez que a adição da enzima tenderá a desestabilizar a emulsão, processadores podem encontrar que essa composição tem utilidade para adição direta a um processo. Em outras concretizações, de preferência depois da desestabilização da emulsão, a composição é separada em pelo menos uma fase lipídica e uma fase aquosa, em que as atividades de enzima separam com a fase aquosa. As fases lipídicas e aquosas assim separadas são cada uma úteis como um componente ou um ingrediente em um processo de alimento.

Em uma concretização preferida, a atividade de enzima compreende pelo menos uma fosfolipase ou uma protease. A atividade de enzima como provida aqui e acima pode compreender uma atividade de fosfolipase de uma fonte de animal, planta, ou microbiana, por exemplo, pâncreas de mamífero, *Streptomyces violaceoruber*, *Aspergillus oryzae*, ou *Aspergillus niger*. Atividade de fosfolipase oriunda de pâncreas de suíno, equino, bovino, ou ovino são concorrentemente preferidas como fontes de animal. A atividade de enzima pode também ou alternativamente compreender uma atividade de protease oriunda de uma fonte de animal, planta ou microbiana. Por exemplo, uma protease é oriunda de uma fonte bacteriana tais como *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, ou uma fonte fúngica tal como um *Aspergillus niger*, ou *Aspergillus oryzae*. Em certas concretizações a protease é uma endopeptidase, tal como uma metaloprotease.

Também providos aqui são óleos derivados de planta isolados das composições expostas acima.

Em um outro desses aspectos, métodos são providos para a obtenção óleo de planta de uma fração de semente oleosa. Os métodos compreendem as etapas de:

(a) provisão de uma composição compreendendo pelo menos uma atividade de enzima capaz de desestabilizar uma emulsão de óleo em água, e uma emulsão de óleo em água obtida a partir de uma extração de solvente aquoso de uma fração de semente oleosa contendo óleo;

(b) provisão de condições sob as quais a atividade de enzima desestabiliza a emulsão de óleo em água; e

(c) separação de uma composição em pelo menos uma fase aquosa e uma fase de lipídio, a dita fase de lipídio compreendendo o óleo de planta.

Em certas concretizações, as condições na etapa (b) incluem um pH que está cerca do ponto isoelétrico de uma proteína presente na emulsão de óleo em água. Um pH presentemente preferido é um que está entre cerca de 3,5 a cerca de 5.

Em várias concretizações, a etapa de separação ulteriormente produz uma porção insolúvel, de preferência que compreende uma proteína. Como discutidos acima, processos de extração de solvente aquoso podem prover proteínas que retêm funcionalidade maior do que aquelas produzidas por extração de solvente orgânico de plantas de semente oleosa. Essas proteínas tendo a maior funcionalidade têm valor aumentado, e frequentemente são mais valiosas do que os derivados de óleo da semente oleosa.

Também providos aqui são óleos derivados de planta compreendendo óleo de planta preparado pelo método exposto acima, ou qualquer outro revelado aqui. Produtos alimentícios compreendendo um óleo de planta preparado por esses métodos são também providos, como são materiais de alimentação industriais e produtos de consumidor compreendendo o óleo de planta assim preparado.

Composições de proteína preparadas pelos métodos descritos aqui são também providos, como são produtos alimentícios, produtos de consumidor, e material de alimento industrial compreendendo uma proteína preparada pelos métodos ou processos revelados aqui.

Exemplos

Exemplo 1

Desemulsificação de uma emulsão de óleo em água obtida a partir de extrudado e enzima tratada com flocos de soja de gordura total Triagem de Enzimas: Protease e Fosfolipase

Tabela 1-1 sumariza as enzimas que foram testadas em uma emulsão de óleo em água a uma concentração de 500 mg (2% w/w de óleo em água emulsão). Cerca de 1,2 kg de flocos de soja de gordura total extru-

5 dado foi usado como o material de partida. Depois do ajuste da temperatura até 50°C com um banho-maria de temperatura controlada equipado com um Lab-Stirrer LR 400C (Fisher Scientific) a um tempo de 150 rpm, e ajuste do pH para 7,0 usando-se NaOH a 2 N, Multifect Neutral(R) (Genencor- A Danisco Division) foi adicionado a 0,5% (w/w) (com base em peso de floco de soja). A temperatura e pH da reação foram mantidos por 1 h nos valores afirmados. Depois da incubação por 1 hora, o pH foi aumentado para 8,0 por 15 min. Resíduo insolúvel foi removido por centrifugação em um rotor de ângulo fixo SLA-3000 (Sorvall RC5BPlus, Newtown, CT) a 3,000 g por 15 min. Depois da centrifugação, a emulsão de óleo em água (incluindo qualquer óleo separado) e frações aquosas foram coletadas em um funil e foram armazenadas a 4°C de um dia para o outro. A emulsão de óleo em água e fração livre de óleo (separado) foram coletadas depois da separação de camada e usadas para a desemulsificação enzimática. As reações de enzima para desemulsificar a emulsão de óleo em água foram incubadas por 90 min em um ótima temperatura e pH para cada enzima. As enzimas foram adicionadas ou independentemente, em combinação, ou em sequência, de acordo com o projeto experimental (vide descrição na nota de rodapé da Tabela 1-2).

Tabela 1-1: Sumário e identificação de enzimas testadas.

Atividade de Enzima	Fonte de Atividade	Abreviação Usada	Tempo de incubação (°C)	pH
Fosfolipase	Enzima LisoMax ^(R)	PL2	40	8
	liso-fosfolipase G-ZYME ^(R) G999 PLI	PL1	50	4,5
Protease	Protex 6L	P6L	50	8
	protease fúngica 500.000	FPa	50	4,5
	concentrado de protease fúngico	FPb	50	8

Resultados:

Os resultados são mostrados na Tabela 1-2. A concentração de enzima nesse primeiro conjunto de experiências era relativamente alto (500 mg, isto é, 2% de peso por peso). Duas enzimas foram selecionadas para determinar o impacto de concentração de enzima na desestabilização da emulsão de óleo em água. Concentrado de protease fúngico (FPC) e enzima LisoMax[®], ambas trabalhando a pH 8, foram selecionadas.

Quando uma enzima foi adicionada independentemente, substancialmente a totalidade do óleo foi liberada (Rendimento de óleo recuperado é igual a -100%) independentemente da natureza da enzima. Uma vez que o tratamento com protease individual ou fosfolipases resultou em quase 100% de liberação de óleo, nenhuma conclusão pode ser nas vantagens de uma combinação de enzimas. Surpreendentemente, no entanto, a lisofosfolipase (PLI) trabalhou bem como a fosfolipase A2 (PL2). Isso não era esperado uma vez que ela foi considerada que a atividade de PLI que converte os substratos de PLI nos produtos correspondentes não poderiam desestabilizar a emulsão tanto quanto a conversão de substrato correspondente no produto por PL2. Por um outro ponto de vista, os potenciais substratos para PLI não foram considerados serem como responsáveis pela estabilidade da emulsão como eram os substratos para PL2.

Tabela 1-2. Efeitos de enzima na desemulsificação de emulsão de óleo em água.

Enzima(s)	Rendimento de óleo recuperado (%)	Porcentagem de óleo em emulsão residual depois da recuperação de óleo (%)
Enzima Simples		
PL2	100,7	3,0
PL1	97,7	4,8
P6L	104,2	7,7
FPa	87,7	4,8
FPb	95,6	7,2

Tabela 1-2. -continuação-

Enzima(s)	Rendimento de óleo recuperado (%)	percentagem de óleo em emulsão residual depois da recuperação de óleo (%)
Combinação de Enzimas		
Enzimas adicionadas juntas		
PL2+PL1*	102,5	3,1
PL2+PFb*	105,0	2,5
PL2+P6L*		
Enzimas sequencialmente adicionadas	96,5	6,2
PL2 - PL1	106,1	3,7

Observação: Cerca de 20 g da emulsão de óleo em água foram usados para cada teste. Quinhentos (500) mg de enzima foram adicionados. * a temperatura de reação era de 40°C. Para abreviações, vide a Tabela 1-1.

5 Observação para os resultados: (A) Rendimento de óleo recuperado (%) é calculado como a razão de óleo (g) recuperado depois da incubação enzimática para o óleo (g) na emulsão de óleo em água original, expressa como uma percentagem (B) Óleo na emulsão residual depois da recuperação de óleo (%) é calculado como a razão de óleo deixada na emulsão residual para o óleo na emulsão de óleo em água original, expressa como uma percentagem.

Exemplo 2: Efeito de concentração de enzima no rendimento livre de óleo

15 Enzima de (0,5, 5, 50, ou 500 mg cada) foi adicionada a 20 g de amostras da emulsão de óleo em água. A quantidade de enzima corresponde a uma percentagem de 0,002, 0,02, 0,2 e 2 % (w/w), respectivamente. Os resultados são mostrados graficamente na Figura 1. Figura 1 mostra as curvas de rendimento como uma função de concentração para cada uma das enzimas, Concentrado de proteína fúngica e LisoMax[®], respectivamente.

20 Cada ponto de dados provido é a média de duas experiências independentes. Um rendimento de óleo recuperado de 44% foi obtido para o controle, isto é, emulsão de óleo em água sem atividade de enzima adicionada. A

0,2% de FPC adicionado, 88% do óleo foram recuperados. Em contraste com isso, apenas 48% do óleo foram recuperados com a mesma concentração de enzima LisoMax[®]. Assim, embora as atividades de protease ou de fosfolipase sejam capazes de aperfeiçoar o rendimento quando a concentração da enzima foi aumentada, em concentrações mais baixas, o concentrado de protease fúngico era mais eficaz na maximização de recuperação de óleo do que a enzima LisoMax[®].

Exemplo 3: Efeito de pH sobre a desmulsificação de emulsão de óleo em água emulsão de soja.

O pH da emulsão foi ajustado para o ponto desejado com ácido clorídrico. A emulsão foi agitada por 10 min a 50°C antes da centrifugação, para separar e recuperar o óleo. Como pode ser visto a partir do gráfico provido na Figura 2, houve uma relação direta entre o valor de pH e o rendimento de óleo recuperado. Os rendimentos mais altos foram obtidos entre cerca de pH 4 e cerca de 4,5, uma faixa que corresponde ao pI de proteínas de soja. Um pH de cerca de 4,2-4,3 pareceu ser uma ótima condição para a recuperação de óleo a partir da emulsão. Recuperações de óleo a pH's acima de cerca de 6 eram substancialmente menores (cerca de 40% ou menos) do que aquelas obtidas nos pH's abaixo de cerca de 5,5 (cerca de 50% ou mais). Foi observado que a curva de resposta era remanescente daquelas obtidas para a solubilidade de proteína de soja como uma função de pH.

Exemplo 4:

Extração de flocos de soja de gordura total com a extrusão e extração aquosa

Condições para a extrusão de flocos de soja de gordura total foram otimizadas usando-se um extrusor de parafuso duplo (American Leistritz). Foi determinado que a extrusão a 100°C, a um tempo de parafuso de 100 rpm e o teor de umidade a cerca de 14-15% proveram resultados preferidos.

Flocos de soja de gordura total foram extrudados diretamente em água. A mistura de floco de soja aquosa foi tratada com uma etapa enzimática por adição de enzima (Multifect Neutral, Genencor- A Danisco Division) a 0,5% w/w com uma base de sólidos de peso seco. A mistura foi incu-

bada a 50°C por 1 h com agitação. Depois da incubação a mistura foi separada por centrifugação a cerca de 3000 x g para fornecer uma fração insolúvel e um sobrenadante aquoso. O sobrenadante aquoso continha óleo ("óleo livre"), uma emulsão de óleo em água, e uma fração aquosa. Assim a totalidade do óleo era ou livre ou na emulsão. O óleo livre e a fração aquosa foram separadas pelo assentamento de gravidade de um dia para o outro no frio (menos do que cerca de 10°C). A fração aquosa mais pesada foi primeiramente removida, e então o óleo e emulsão foram coletados juntos. Figura 3 é um fluxograma que mostra o processo como usado. O especialista versado apreciará que o processo pode ser variado em certas etapas na manutenção com o espírito dos métodos e composições providos.

A emulsão foi então submetida a um processo enzimático desmulsificante. As enzimas selecionada para essa etapa eram fosfolipases. Amostras de emulsão foram tratadas ou com as duas atividades de fosfolipase sob as condições providas abaixo:

Tratamento de enzima 1: Fosfolipase C: Enzima foi obtida a partir de Sigma (Número de produto P-7633-500UN, 10-50 unidades/mg, Sigma, St. Louis, MO). Cerca de 15 mg de enzima foram adicionados a cerca de 18-20 g de óleo mais mistura de emulsão como descritos acima. Agitação foi provida durante a incubação por 90 min a 37°C e pH 7.

Tratamento de enzima 2: Fosfolipases: Enzimas LisoMax(R) e G-ZYME G999 (Genencor- A Danisco Division) foram usadas em uma razão de 1:1. Cerca de 500 mg de cada uma das enzimas foram adicionados a cerca de 18-20 g da mistura de óleo e emulsão. Amostras foram agitadas durante a incubação por 90 min a 50°C e a um pH de cerca de 5.

Depois da incubação, o óleo desestabilizado mais misturas de emulsão de óleo em água foram separados por centrifugação a cerca de 1000 x g. O óleo foi coletado. Os resultados foram expressos como óleo recuperado, que era a percentagem do óleo total nos flocos extrudados. O óleo total nos flocos extrudados foi medido com base no procedimento de hidrólise de ácido de Mojonnier (AOAC Method 922.06, cuja totalidade que é incorporada aqui por referência). Vide AOAC, Official Methods of Analysis,

15th edição, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Resultados: A recuperação média de óleo depois da extrusão mais extração aquosa seguida pela desemulsificação era 73% para o tratamento de enzima 1 versus 68% para o tratamento de enzima 2. Esses não foram estatisticamente diferentes no nível de $p < 0,05$. Cálculos estatísticos foram determinados usando-se the General Linear Model, PROC GLM, SAS statistical software (versão 8.2, SAS Institute, Inc., Cary, N.C.). Recuperações de óleo típicas aproximam-se cerca de 97% do óleo total quando do uso de métodos de extração orgânica, tal como com hexano. Procedimentos de extração aquosa tipicamente extraem óleo em forma emulsificada. Quando da extrusão ou outro pré-tratamento é usado antes da extração aquosa, cerca de 10-15% do óleo total são recuperados como óleo livre não na forma emulsificada.

Uma comparação foi também produzida da etapa enzimática desemulsificante com outros métodos físicos ou mecânicos conhecidos como rompimento de emulsões, por exemplo, aquecimento, e ciclos de congelamento e descongelamento repetidos. Esses processos, uma vez que o especialista versado apreciará não pode apenas ser mais difícil de implementar do que uma etapa enzimática, mas eles podem ter energia intensa. Os tratamentos realmente testados eram como se segue:

Tratamento de controle: um extrato aquoso oriundo dos flocos de soja extrudados foi centrifugado e o sobrenadante de centrífuga foi ulteriormente fracionado usando-se um funil separador para fornecer a emulsão residual o/w (fração de "creme"), a fração solúvel (fração de "escumação"), e óleo livre.

Tratamento de Fosfolipase C: um extrato aquoso oriundo de flocos de soja foi centrifugado. A fração de sobrenadante foi então tratada com 0,075% (w/w) de fosfolipase C a 37°C e pH 7 por 90 minutos. Um sobrenadante tratado com fosfolipase C foi ulteriormente fracionado via um funil separador para fornecer as frações de óleo livre, escumação, e creme residual (como descrito acima).

Tratamento de coquetel de enzima Genencor: um extrato aquo-

so oriundo de flocos de soja foi centrifugado. O sobrenadante foi tratado com 2,5% (w/w) de LisoMax[®] mais 2,5% (w/w) de G-ZYME G999 a 50°C e pH 5 por 90 minutos. Um sobrenadante tratado com enzima foi posteriormente fracionado via funil separador para fornecer as frações de óleo livre, escumação, e creme residual.

Tratamento de congelamento-descongelamento: um extrato aquoso oriundo de extrudado flocos de soja foi centrifugado e o sobrenadante de centrifuga foi submetido a 3 ciclos de congelamento-descongelamento. Então o sobrenadante tratado foi posteriormente fracionado via um funil separador para fornecer as frações de óleo livre, escumação, e creme residual.

Tratamento térmico a 95°C: um extrato aquoso oriundo de extrudado flocos de soja foi centrifugado. O sobrenadante de centrifuga foi aquecido até 95°C e foi mantido nessa temperatura por 30 minutos, e então foi resfriado para 25°C. O sobrenadante tratado foi posteriormente fracionado via um funil separador para fornecer as frações de óleo livre, escumação, e creme residual.

Os resultados da experiência de comparação exposta acima são mostrados na Figura 4.

Várias publicações, incluindo patentes, pedidos publicados, artigos técnicos e artigos escolares são citados através do relatório. Cada uma dessas publicações citadas é incorporada por referência aqui, em sua totalidade para todas as finalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a desestabilização de uma emulsão compreendendo uma fase oleosa e uma fase aquosa, a dita emulsão produzida em uma extração de solvente aquoso de um lipídio de uma semente oleosa, o processo compreendendo a etapa de contato da emulsão com pelo menos uma atividade de enzima incluindo pelo menos uma fosfolipase ou uma protease, sob condições que permitem atividade de pelo menos a fosfolipase ou a protease por um tempo suficiente para desestabilizar a dita emulsão.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a fase aquosa é uma fase contínua e a fase oleosa é uma fase descontínua.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, ulteriormente compreendendo a separação da fase oleosa da fase aquosa.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que a etapa de separação compreende centrifugação.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, que aperfeiçoa o rendimento de óleo da semente oleosa quando comparado com aquele de uma extração aquosa que não usa a etapa de contato da emulsão com a atividade de enzima.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a emulsão é posto em contato com pelo menos uma atividade de enzima compreendendo pelo menos uma atividade de fosfolipase ou uma atividade de protease, ou uma sua combinação.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase oriunda de um pâncreas de mamífero, *Streptomyces violaceoruber*, *Aspergillus oryzae*, ou *Aspergillus niger*.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase oriunda de pâncreas de suíno.

9. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de protease oriunda de *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, ou

Aspergillus oryzae.

10. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que a atividade de protease compreende uma endopeptidase.

5 11. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que a endopeptidase é uma metaloprotease.

12. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que o pH é ajustado para entre cerca de 3,5 a cerca de 5 antes da etapa de separação.

13. Processo para a obtenção de óleo a partir de uma semente oleosa compreendendo as etapas de:

10 (a) provisão de uma fração de semente oleosa contendo óleo;
(b) contato da fração de semente oleosa contendo óleo com um agente de extração aquoso para formar uma fração de semente oleosa extraída;

(c) separação da fração de semente oleosa extraída em uma fase aquosa, uma emulsão de óleo em água, e uma fase insolúvel;

15 (d) contato da emulsão de óleo em água com pelo menos uma atividade de enzima sob condições que permitem atividade de enzima por um tempo suficiente para desestabilizar a emulsão; e

(e) separação da emulsão desestabilizada em uma fase aquosa, uma fase oleosa, e uma fase insolúvel; desse modo obtendo-se óleo a partir da semente oleosa.

20 14. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que a fração de semente oleosa contendo óleo compreende células e o processo ulteriormente compreende a etapa de rompimento das células antes do contato da fração de semente oleosa com o agente de extração aquoso.

25 15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que a etapa de rompimento compreende aplicação de uma fonte mecânica.

16. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que a etapa de rompimento compreende extrusão.

30 17. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que a emulsão de óleo em água é posto em contato com atividade de enzima compreendendo pelo menos uma atividade de fosfolipase ou uma atividade de protease, ou uma sua combinação.

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase oriundo de pâncreas de mamífero, *Streptomyces violaceoruber*, *Aspergillus oryzae*, ou *Aspergillus niger*.

5 19. Processo de acordo com a reivindicação 18, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase oriundo de pâncreas de suíno.

20. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de protease oriundo de *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus lichenformis*, *Aspergillus niger*, ou *Aspergillus oryzae*.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, em que a atividade de protease compreende a endopeptidase.

15 22. Processo de acordo com a reivindicação 21, em que a endopeptidase é uma metaloprotease.

23. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que cada ou ambas as etapas de separação compreendem centrifugação.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, em que o pH é ajustado para entre cerca de 3,5 a cerca de 5 antes da etapa de separação.

20 25. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que o agente de extração aquoso compreende uma ou mais enzimas.

26. Processo de acordo com a reivindicação 25, em que as enzimas incluem uma ou mais de uma protease, uma celulase, uma hemicelulase, uma pectinase, uma glucanase, uma fosfolipase, uma lipase, uma lecitinase, ou uma amilase.

27. Processo de acordo com a reivindicação 26, em que as enzimas compreendem pelo menos uma atividade de fosfolipase ou uma atividade de protease, e pelo menos uma porção da dita atividade de enzima no agente de extração aquoso separa na emulsão de óleo em água e desestabiliza a emulsão de óleo em água.

28. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que a fração de semente oleosa é de grão de soja, semente de milho, semente de colza,

semente de palma, semente de girassol, semente de açafraão, coco, amendoim, semente de algodão, semente de gergelim, semente de linho, semente de papoula, amêndoa, avelã, noz, semente prímlula da noite, semente de uva, semente de cânhamo, semente de groselha negra, semente de framboesa vermelha, semente de cenoura, semente de cominho, semente de mertílio, semente de oxicoco, semente de salsa, semente de ceboula, semente de abóbora, semente de damasco, semente de mostarda, linhaça, semente de ricino, ou jatropha.

29. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que a fração de semente oleosa compreende uma fração de proteína que é útil como um alimento, um ingrediente de alimento, um aditivo alimentar, ou um suplemento alimentar.

30. Processo de acordo com a reivindicação 28, em que a fração de semente oleosa compreende flocos de soja ou farinha de soja.

31. Processo de acordo com a reivindicação 30, em que fração de semente oleosa é flocos de gordura total ou farinha de gordura total.

32. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que as condições incluem o ajuste do pH da emulsão a entre cerca de 3,5 e cerca de 5.

33. Processo de acordo com a reivindicação 13, que aperfeiçoa o rendimento de óleo da semente oleosa quando comparado com aquela de uma extração de solvente aquoso que não usa a etapa de contato da emulsão com a atividade de enzima.

34. Óleo derivado de planta preparado pelo processo como definido na reivindicação 1.

35. Produto de alimento compreendendo o óleo como definido na reivindicação 34.

36. Óleo de acordo com a reivindicação 34, que está substancialmente livre de proteínas, fosfolipídios, ou impurezas aquosas.

37. Composição compreendendo: pelo menos uma atividade de enzima capaz de desestabilizar uma emulsão de óleo em água; e uma emulsão de óleo em água obtida a partir de uma extração de solvente aquoso de uma fração de semente oleosa contendo óleo.

38. Composição de acordo com a reivindicação 37, em que a atividade de enzima compreende pelo menos uma fosfolipase ou uma protease, ou uma sua combinação.

39. Composição de acordo com a reivindicação 38, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase oriundo de um pâncreas de mamífero, *Streptomyces violaceoruber*, *Aspergillus oryzae*, ou *Aspergillus niger*.

40. Composição de acordo com a reivindicação 39, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de fosfolipase oriundo de pâncreas de suíno.

41. Composição de acordo com a reivindicação 38, em que a atividade de enzima compreende uma atividade de protease oriundo de *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, ou *Aspergillus oryzae*.

42. Composição de acordo com reivindicação 41, em que a atividade de protease compreende uma endopeptidase.

43. Composição de acordo com reivindicação 42, em que a endopeptidase é uma metaloprotease.

44. Óleo derivado de planta isolado da composição como definido na reivindicação 37.

45. Método para a obtenção óleo de planta a partir de uma fração de semente oleosa compreendendo as etapas de:

(a) provisão de uma composição compreendendo pelo menos uma atividade de enzima capaz de estabilizar uma emulsão de óleo em água, e uma emulsão de óleo em água obtida a partir de uma extração de solvente aquoso de uma fração de semente oleosa contendo óleo;

(b) provisão de condições sob as quais a atividade de enzima desestabiliza a emulsão de óleo em água; e

(c) separação de uma composição em pelo menos uma fase aquosa e uma fase de lipídio, a dita fase de lipídio compreendendo o óleo de planta.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, em que as condi-

ções na etapa (b) incluem um pH que é cerca do ponto isoelétrico de uma proteína presente na emulsão de óleo em água.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o pH está entre cerca de 3,5 a cerca de 5.

5 48. Método de acordo com a reivindicação 46, em que a etapa de separação ulteriormente produz uma porção insolúvel.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que a porção insolúvel compreende uma proteína.

10 50. Óleo derivado de planta compreendendo óleo de planta preparado pelo método de acordo com a reivindicação 45.

51. Produto de alimento compreendendo óleo de planta preparado pelo método de acordo com a reivindicação 45.

52. Um material de alimento industrial compreendendo óleo de planta preparado pelo método de acordo com a reivindicação 45.

15 53. Produto de consumidor compreendendo óleo de planta preparado pelo método de acordo com a reivindicação 45.

54. Composição de proteína preparado pelo método como definido na reivindicação 49.

20 55. Produto de alimento compreendendo proteína preparada pelo método como definido na reivindicação 49.

56. Produto de consumidor compreendendo proteína preparada pelo método como definido na reivindicação 49.

57. Material de alimento industrial compreendendo proteína preparada pelo método como definido na reivindicação 49.

25 58. Diluente de combustível de diesel compreendendo um óleo de planta preparado pelo método como definido na reivindicação 1 ou como definido reivindicação 45.

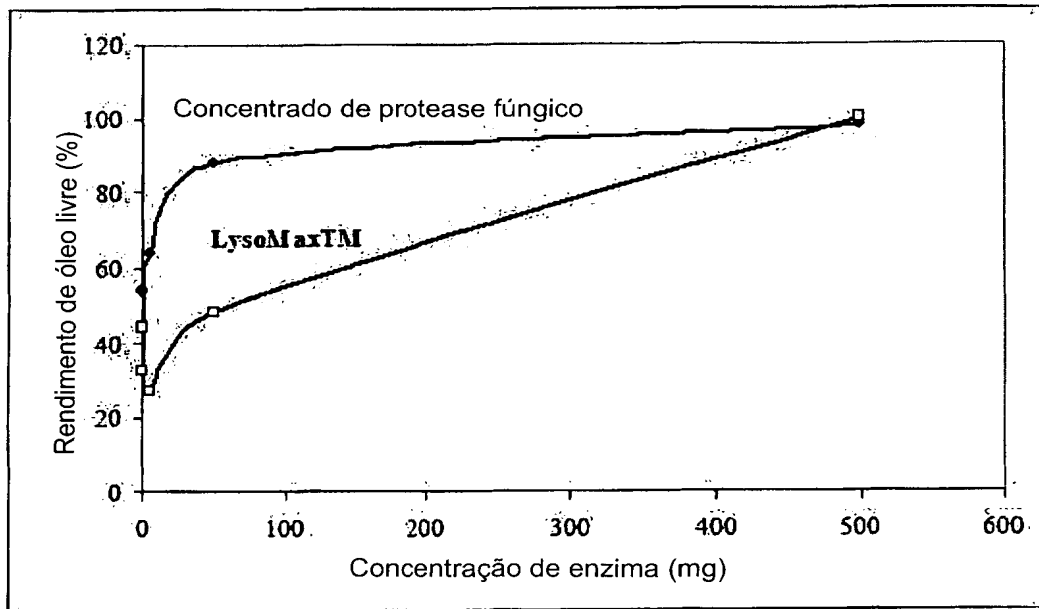


FIG. 1

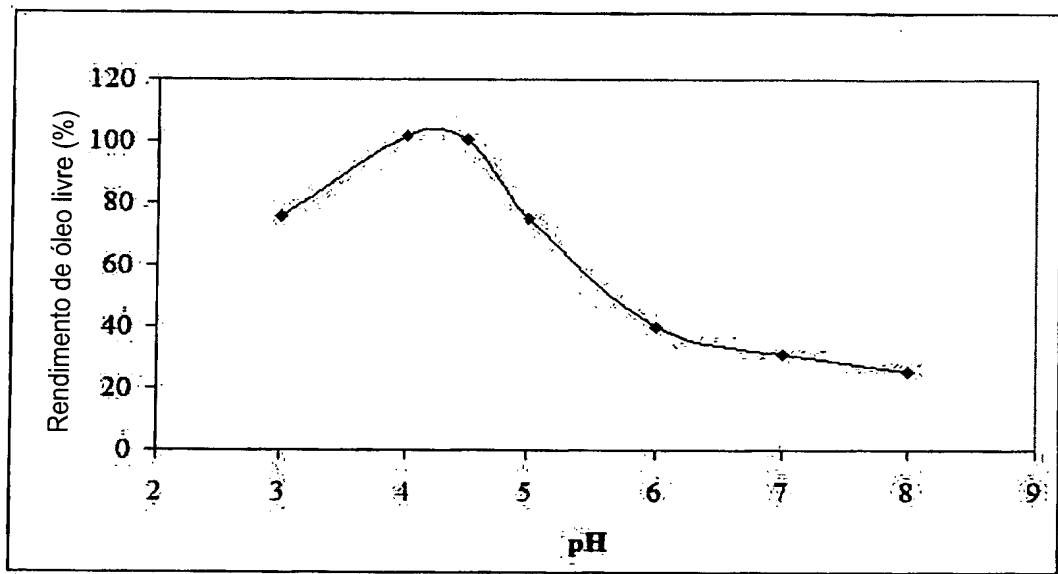


FIG. 2

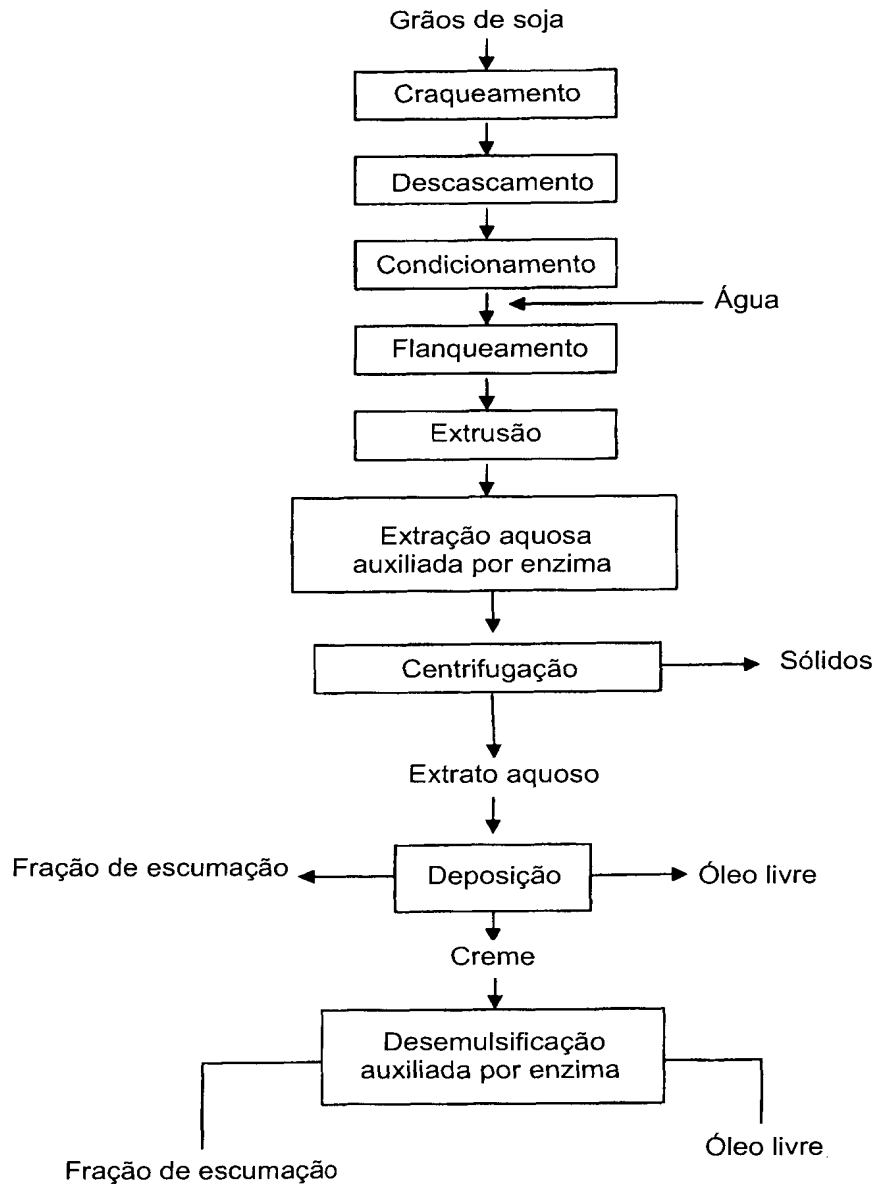


FIG. 3

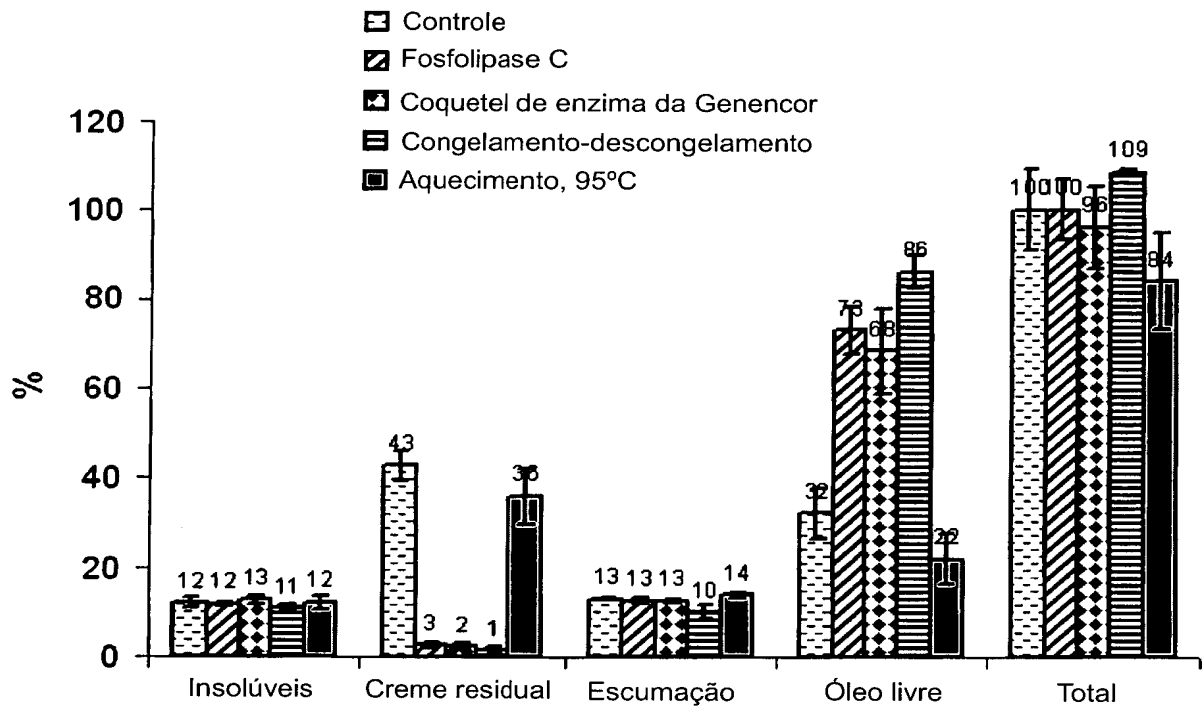


FIG. 4

RESUMO

Patente de Invenção: **"DESEMULSIFICAÇÃO AUXILIADA POR ENZIMA DE EXTRATOS DE LIPÍDIO AQUOSOS"**.

5 A presente invenção refere-se a composições e processos para desestabilizar uma emulsão óleo-em-água resultante da extração de solvente aquoso de óleos de plantas. Os processos compreendem o uso de uma ou mais atividades de enzima incluindo atividade fosfolipase e protease. Os processos são úteis para melhorar a extração de óleo das sementes oleosas, bem como para obtenção de proteínas mais desejáveis daquelas se-
10 mentes oleosas.