



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0615897-8 B1



* B R P I 0 6 1 5 8 9 7 B 1 *

(22) Data do Depósito: 11/09/2006

(45) Data de Concessão: 31/05/2022

(54) Título: PROCESSO PARA INTERESTERIFICAR ÓLEO CONTENDO UM OU MAIS AGENTES QUELANTES DE METAL

(51) Int.Cl.: C12P 7/64; C12N 11/02; C12N 9/20.

(30) Prioridade Unionista: 12/09/2005 US 60/716231.

(73) Titular(es): NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.; NOVOZYMES A / S.

(72) Inventor(es): STEVE WHITE PEARCE; LARS SAABY PEDERSEN; TOMMY LYKKE HUSUM; HANS CHRISTIAN HOLM; PER MUNK NIELSEN.

(86) Pedido PCT: PCT US2006035043 de 11/09/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/033013 de 22/03/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/03/2008

(57) Resumo: PROCESSO PARA INTERESTEMFICAR ÓLEO CONTENDO UM OU MAIS AGENTES QUELANTES DE METAL, COMPOSIÇÃO DEENZIMA, E, USO DE UMA BASE A presente invenção diz respeito a um processo para interesterificação enzimática de lipase de óleos contendo um agente quelante por tratamento seqüencial ou simultâneo com uma base.

“PROCESSO PARA INTERESTERIFICAR ÓLEO CONTENDO UM OU MAIS AGENTES QUELANTES DE METAL”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um processo melhorado para interesterificação enzimática de óleo contendo um ou mais agentes quelantes de metal. A invenção também diz respeito a uma composição de enzima adequada para processos de interesterificação de lipase.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Sabe-se que a presença de metais em óleos de origem animal ou vegetal tem efeito de deterioração na estabilidade destes óleos. Desta forma, óleos são freqüentemente tratados com um agente quelante de metal, tais como ácido cítrico ou ácido fosfórico, de maneira a remover tais metais.

Freqüentemente óleos e gorduras vegetais ou animais são usados como misturas de maneira a apresentar as propriedades físicas e químicas corretas para uma dada aplicação. Além disso, os óleos ou mistura de óleos têm que ser adicionalmente processados de maneira a se obterem as propriedades adequadas (por exemplo, perfil de fusão, sensação na boca etc.). O perfil de fusão é freqüentemente ajustado rearranjando ou redistribuindo os ácidos graxos na espinha dorsal do glicerol, tanto química quanto enzimaticamente. Este processo é freqüentemente referido como “interesterificação”. Interesterificação enzimática é realizada usando uma lipase.

Uma desvantagem de adicionar um agente quelante de metal ao óleo é que ele tem um efeito negativo no desempenho de interesterificação da lipase.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é fornecer melhores processos para interesterificação enzimática de óleo contendo um ou mais agentes

quelantes de metal.

De acordo com a invenção a interesterificação de óleo contendo um ou mais agentes quelantes de metal é feita i) colocando o óleo em contato com uma base e ii) reagindo o óleo com uma lipase.

A invenção também diz respeito a uma composição de enzima compreendendo uma lipase e uma base. Finalmente, a invenção diz respeito ao uso de base para interesterificação de óleo contendo um ou mais agentes quelantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra o Teor de Gordura Sólida (SFC) a 40°C da mistura de óleo de soja contendo ácido cítrico, antes e depois da interesterificação, com e sem adição de base.

A figura 2 mostra a taxa constante (1/h) versus a quantidade de óleo produzida por Lipase A immobilizada (batelada LA350005). Pré-tratamento: Dados do processo onde o óleo é pré-tratado com carbonato de sódio. Simultâneo: Dados do processo onde o óleo é carbonato de sódio tratado e interesterificado simultaneamente. Referência (Controle): Dados da interesterificação de óleo sem pré-tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O componente principal em óleos e gorduras vegetais e animais são triacilgliceróis, também denominados triglycerídeos. Um triglycerídeo consiste em três resíduos de ácido graxo esterificados a uma espinha dorsal do glicerol. Glycerídeos parciais também podem estar presentes como constituintes naturais. Eles podem ser formados por hidrólise de um ou dois resíduos de ácido graxo na espinha dorsal do glicerol. Óleos e gorduras vegetais e animais freqüentemente precisam de alguma modificação para torná-los adequados como ingredientes alimentícios.

O perfil de fusão freqüentemente precisa ser ajustado de maneira a dar as propriedades físicas adequadas à gordura para uma dada

aplicação. O perfil de fusão desejado depende da aplicação desejada. O correto perfil de fusão é freqüentemente obtido por uma combinação de diferentes matérias-primas e modificações. Óleos vegetais tipicamente têm um teor de gordura sólida (SFC) em torno de 10-30 % a 40°C. "SFC" é definido como a porcentagem de uma gordura ou óleo que existe na forma cristalina em uma dada temperatura. Para ser adequado como ingrediente alimentício, em geral, deseja-se modificar óleos para que tenham um SFC a 40°C na faixa de 1 a 10 %. Para produto, tais como margarinas, o SFC desejado fica em torno de 2-4 %. Entretanto, para outros produtos alimentícios, por exemplo, certos chocolates, um perfil SFC diferente é preferido.

Processos de modificação compreendem mistura com outros óleos, hidrogenação, fracionamento e interesterificação. Interesterificação rearranja os resíduos de ácido graxo na espinha dorsal do glicerol de maneira tal que a composição de triglicerídeo seja alterada. Glicerídeos parciais também devem ser formados durante a interesterificação, mas isto não é normalmente desejado. Normalmente, as quantidades de glicerídeos parciais formados são pequenas.

Íons metálicos devem ser removidos cuidadosamente do óleo, uma vez que eles afetam negativamente a qualidade. Mesmo traços de Fe, Cu e Mn são pré-oxidativos. De maneira a seqüestrar íons metálicos de óleos, um ou mais agentes quelantes de metal são adicionados. Agentes quelantes de metal, tais como preferivelmente ácido cítrico e/ou ácido fosfórico, são adicionados ao óleo. Depois do seqüestro, o agente quelante permanece dissolvido no óleo em concentrações entre 1-100 ppm, tipicamente entre 10-90 ppm, tal como em torno de 50 ppm. Óleos comestíveis são tratados com agentes quelantes de metal que são aceitáveis para o consumo do produto final. Em uma modalidade preferida, o agente quelante de metal é um ácido, preferivelmente ácido cítrico e/ou ácido fosfórico. De acordo com a presente

invenção, interesterificação é realizada enzimaticamente usando uma lipase em óleo que é submetida a um agente quelante de maneira a remover íons metálicos.

Uma desvantagem principal de submeter óleo a um agente quelante é que mesmo menores quantidades de agente quelante que permanecem no óleo têm um impacto negativo no desempenho da interesterificação da lipase. Por exemplo, os inventores observaram que o desempenho de interesterificação de lipase de *Thermomyces lanuginosa* imobilizada em óleo de soja contendo 50 ppm ácido cítrico foi até 65 % menor que em óleo sem ácido cítrico.

Assim, um problema a ser resolvido é fornecer melhores processos para interesterificação enzimática de lipase de óleo compreendendo um ou mais agentes quelantes de metal. A melhoria inclui maior produtividade e/ou maior rendimento de espaço e tempo médio da composição de enzima.

Os inventores observaram que a adição de uma base ao óleo tem um significativo impacto positivo no desempenho da lipase. Isto é ilustrado no exemplo 1 a seguir. Um processo da invenção pode ser realizado como um processo de interesterificação da lipase tradicional, exceto que uma quantidade efetiva de base é introduzida. Por exemplo, um processo de interesterificação da invenção pode ser realizado a uma temperatura entre 50°C e 100°C, preferivelmente entre 60°C e 90°C, especialmente de 5°C a 80°C.

Assim, um primeiro aspecto a invenção diz respeito a um processo de interesterificar óleo contendo um ou mais agentes quelantes de metal, compreendendo as etapas de:

- i) colocar o dito óleo em contato com uma base,
- ii) reagir o óleo com uma lipase.

De acordo com a invenção, as etapas i) e ii) podem ser

realizadas seqüencial ou simultaneamente. Tratamento seqüencial significa que óleo é pré-tratado com base antes de a lipase ser adicionada. Também, contempla-se, de acordo com o invenção, adicionar base e uma porção, por exemplo, 10-90 %, tal como 30-70 %, da lipase inicialmente ao óleo e então 5 depois de um período de tempo adicionar o resto da lipase, por exemplo, 90-10 %, tal como 70-30 %.

Tratamento simultâneo significa que óleo é tratado com base e lipase ao mesmo tempo. Se as etapas 1) e 2) forem realizadas simultaneamente, ela pode ser realizada adicionando uma composição da 10 invenção compreendendo uma base e uma lipase, preferivelmente lipase imobilizada, ao óleo. Processos simultâneos e seqüenciais são ilustrados no exemplo 2.

Em uma modalidade preferida, a base é adicionada ao óleo antes da lipase e desta forma antes da interesterificação. A base pode ser 15 adicionada ao óleo usando qualquer um dos meios. Em uma modalidade, a base é incorporada no óleo usando um misturador de alto a baixo cisalhamento. Entretanto, outros meios de mistura também são contemplados. Depois que a base é incorporada no óleo, lipase pode ser introduzida.

Em uma outra modalidade preferida, base é adicionada ao óleo 20 simultaneamente com a lipase. Base e lipase podem ser incorporadas no óleo de qualquer maneira adequada, tal como usando um misturador da forma descrita anteriormente. Conforme será adicionalmente descrito a seguir, a base também pode ser vantajosamente incorporada em uma composição de enzima, por exemplo, na forma de mistura física de lipase, preferivelmente 25 lipase imobilizada, e base, ou como uma lipase imobilizada com a base incorporada.

Em uma terceira modalidade preferida, óleo é tratado com base em uma etapa de processo separada, e a base é removida do óleo antes que o óleo e a enzima entrem em contato.

Em uma quarta modalidade preferida, a base é empacotada em uma coluna. O óleo é colocado em contato com a base passando-o através de leito empacotado de base dentro da coluna. Desta maneira, o tratamento com base pode ser facilmente implementado, por exemplo, em uma fábrica de interesterificação enzimática contínua típica que opera com um ou mais reatores de leito empacotado em lipases suportadas em série.

Sem se limitar a qualquer teoria, acredita-se que o motivo para perda de desempenho da lipase durante a interesterificação de óleo contendo um agente quelante de metal pode ser que o agente quelante de metal, por exemplo, ácido cítrico, no ambiente local em torno do sítio ativo da enzima deve afetar as alterações de uma maneira desfavorável para lipase, por exemplo, lipase de *Thermomyces lanuginose*. Assim, ter base presente no óleo altera a carga de ácido, por exemplo, o ácido cítrico, e assim não afetará adversamente a lipase, melhorando assim o desempenho da lipase.

15 Óleos comestíveis:

Qualquer óleo comestível pode ser usado em um processo da invenção. O óleo pode ser de qualquer qualidade, tais como bruto, refinado, branqueado e desodorizado, ou combinações destes.

Por exemplo, óleo refinado pode ser preparado tratando com 20 0,05 - 0,1 % de ácido fosfórico para remover gomas a uma temperatura de 60-90°C por 10-30 minutos. Óleo descolorido pode ser preparado por desgomação com 0,05-0,1 % ácido fosfórico, depois de branqueamento com 1 % de terra de branqueamento a 105-110°C por 15-30 minutos, e filtração para remover a terra de branqueamento. Terra de branqueamento ativada pode ser processada com ácido sulfúrico ou clorídrico. Em uma outra modalidade preferida, a mistura de óleo é, por exemplo, 27 % de óleo de soja completamente hidrogenado ("Soy Flakes") misturado em óleo de soja.

Em uma modalidade preferida, o óleo é óleo vegetal. Exemplos de óleos vegetais incluem óleos selecionados do grupo que consiste

em óleo de canola (colza), óleo de soja, óleo de semente de algodão, óleo de palmeira, estearina de palmeira, oleína de palmeira, óleo de semente de palmeira, óleo de coco, óleo de milho e óleo de girassol.

Também, misturas de óleos são contempladas de acordo com a invenção. Por exemplo, misturas de óleo podem conter um ou mais óleos completa bem como parcialmente endurecidos.

Em uma modalidade, a mistura é de óleo de soja e/ou semente de algodão completa ou parcialmente endurecidos em óleo de soja em uma razão da mistura com base no peso de 10:90 a 50:50, preferivelmente 25:75 a 10 30:70. Em uma modalidade preferida da invenção, a mistura de óleo é uma mistura de estearina de palmeira e óleo de coco onde o óleo de coco é tanto refinado quanto refinado e branqueado.

Em uma modalidade, o óleo a ser interesterificado é oleína de palmeira comum, que se torna dura (em vez de macia) quando 15 interesterificada.

Lipases

Uma lipase, usada em um processo e/ou contida em uma composição da invenção, pode ser obtida de um microorganismo, preferivelmente um fungo filamentoso, levedura, ou uma bactéria. Em uma 20 modalidade, a lipase pode ser formulada como um produto imobilizado, conforme será descrito adicionalmente a seguir.

Com o propósito da presente invenção, o termo "obtido de", na forma aqui usada com relação a uma fonte microbiana específica, significa que a enzima e, conseqüentemente, a seqüência de DNA que codifica a dita enzima são produzidas pela fonte específica. A enzima é então obtida da dita fonte específica por métodos padrões conhecidos que possibilitam aos versados na técnica obter uma amostra compreendendo a enzima e que pode ser usada em um processo da invenção. Os ditos métodos padrões podem ser de purificação direta da dita fonte específica ou de clonagem de uma

seqüência de DNA que codifica a enzima seguida por expressão recombinante, tanto na mesma fonte (expressão recombinante homóloga) quanto em uma fonte diferente (expressão recombinante heteróloga).

A lipase pode ser uma lipase não específica capaz de liberar ou 5 se ligar a qualquer grupo de ácido graxo ou a qualquer posição de glicerídeo. Tais lipases foram obtidas de *Candida cylindracae*, *Corynebacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* (Macrae, J. A.O. C.S., 1983, 60:243A-246A; Patente U.S. 5.128.251). A lipase também pode ser do tipo que somente adiciona ou remove grupos de ácido graxo específicos ou de glicerídeos específicos. Tais 10 lipases são usadas na produção ou modificação de glicerídeos específicos. Tais lipases foram obtidas de *Geotrichum candidum* e gênero *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor* (Macrae, 1983; Patente U.S. 5.128.251). A lipase também pode ser uma lipase 1,3 específica. Tais lipases foram obtidas de *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, e *Rhizopus arrhizus* (Macrae, 1983).

Lipases preferidas usadas em um processo da invenção são obtidas de uma espécie de fungo filamentoso no gênero *Thermomyces*, tal como uma cepa da espécie *Thermomyces lanuginosa*, preferivelmente descrita na patente EP No. 305.216-B1, ou o gênero *Fusarium*, tal como uma cepa das 20 espécies *Fusarium culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, ou *F. oxysporum*. Em uma outra modalidade preferida a lipase é obtida de levedura, tal como *Candida*, preferivelmente a espécie *Candida antactica*. A é lipase B (CaIB) de *Candida antactica* é especificamente contemplada.

Lipases imobilizadas

25 Lipases na forma sólida, tais como lipases imobilizadas, podem ser usadas em um processo da invenção. Várias maneiras de imobilizar lipases são bem conhecidas na tecnologia. Uma revisão de imobilização de lipase é encontrada em “Journal of American Oil Chemist's Society”, Vol: 67, pp. 890-910 (1990), onde exemplos de veículos que imobilizam lipase

representativos são ilustrados, incluindo veículos inorgânicos, tais como terra diatomácea, sílica, vidro poroso, etc.; várias resinas sintéticas e trocadores iônicos de resina sintética; e veículos de polissacarídeo natural, tais como celulose e dextrina reticulada introduzida com grupos de troca iônica.

5 Substâncias veículo adequadas incluem polipropileno, por exemplo, ACCURELTM (Accordis Membranes GmbH) e sílica ou misturas destes. Técnicas de imobilização adequadas são descritas em EP 140.542, Patente U.S. 4.818.695, Patente U.S. 5.128.251, Patente U.S. 5.508.185 e Patente U.S. 6.156.548 (cujas referências estão todas incorporadas pela 10 referência).

Uma lipase de *Humicola lanuginose* imobilizada preferida (mesma que lipase de *Thermomyces lanuginosa*) é descrita na Patente U.S. 5.776.741 (que está aqui incorporada pela referência). Uma outra lipase preferida é lipase B de *Candida antactica* (CaLB) (ver, por exemplo, 15 Uppeberg et al., 1994, *Structure* 2:293-308) imobilizada usando o processo de imobilização descrito na Patente U.S. 5.776.741.

Finalmente, exemplos de lipase imobilizada comercialmente disponível adequada inclui as vendidas com os nomes comerciais LIPOZYME TL IMTM, LIPOZYME RM IMTM (disponível pela Novozymes, 20 Dinamarca).

Bases

Qualquer base pode ser usada em um processo da invenção. Em uma modalidade preferida a base é uma “base fraca”. Uma “base fraca” é no contexto da invenção definida como uma base que dá um pH entre 8 e 13 25 se dissolvida/dispersa em água em um nível de 1 molar, preferivelmente uma base que dá um pH de cerca de 11, tal como entre pH 10 e 12, ou correspondente a uma faixa de pH de +/- 1 em torno do pH ideal da lipase em questão.

A base pode ser uma base forte incluindo hidróxido de lítio

(LiOH), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de rubídio (RbOH), hidróxido de césio (CsOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), hidróxido de estrôncio (Sr(OH)_2), hidróxido de bário (Ba(OH)_2).

- A base é preferivelmente uma base, tais como uma amina ou um carbonato. Exemplos de bases fracas podem ser selecionados do grupo que consiste em: amônia (NH_3), alanina ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{NH}_2$), dimetilamina ($(\text{CH}_3)_2\text{NH}$), etilamina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2$), glicina ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NH}_2$), hidrazina (N_2H_4), metilamina (CH_3NH_2), trimetilamina ($(\text{CH}_3)_3\text{N}$) e carbonato de sódio (Na_2CO_3), Hidrogeno carbonato de sódio, (NaHCO_3), Nitrito de sódio (NaNO_2), acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COO Na}$).

Em uma modalidade preferida a base é carbonato de sódio (Na_2CO_3). Em uma modalidade preferida a base é usada em uma quantidade de 0,01 a 100 milimoles por grama de enzima, mais especialmente, entre 0,1 e 60 milimoles de base por grama de enzima.

- Em uma modalidade a base é usada em uma quantidade de 0,001 a 100 milimoles por quilograma de óleo, preferivelmente entre 0,01 e 10 milimoles de base por quilograma de óleo, especialmente 0,1-1 milimoles por quilograma de óleo.

Composição de enzima

- Neste aspecto a invenção diz respeito a uma composição de enzima compreendendo lipase e base. A base pode ser qualquer das listadas e/ou definidas na seção “Bases” anterior. A composição de enzima pode ser adicionada diretamente ao óleo contendo um agente quelante. Uma composição de enzima da invenção fornece condições mais ideais para a lipase durante a interesterificação de óleo compreendendo um agente quelante que uma composição de enzima compreendendo somente uma lipase.

A composição da invenção pode ser formulada de qualquer maneira adequada para uso em processo de interesterificação de óleo. A composição pode ser formulada como um produto imobilizado. Em uma

modalidade preferida a composição é um granulado, compreendendo uma lipase e uma base. A composição de enzima da invenção pode ser uma mistura de lipase imobilizada e base ou uma lipase imobilizada com a base incorporada.

5 A lipase pode ser qualquer lipase, tais como as descritas na seção "Lipases" anterior. Em uma modalidade preferida a lipase é derivada de *Thermomyces lanuginose* ou pode ser lipase B (CaIB) derivada de *Candida antactica*. Em uma modalidade preferida a composição de enzima é um granulado compreendendo lipase de *Thermomyces lanuginose* imobilizada ou 10 lipase B de *Candida antactica* e uma base, preferivelmente uma base fraca, especialmente carbonato de sódio.

Uso de bases

A invenção também diz respeito ao uso de base em um processo de interesterificação de lipase de óleo compreendendo um ou mais agentes quelantes. Quando base é usada em tal processo de interesterificação 15 a produtividade é maior, conforme ilustrado no exemplo 3. A base e lipase, respectivamente, podem ser qualquer uma das mencionadas anteriormente nas seções "Bases" e "Lipases".

MATERIAIS E MÉTODOS

20 Materiais:

Enzima:

Lipase imobilizada A: Lipase imobilizada derivada de *Humicola lanuginosa/Thermomyces lanuginose* descrita e produzida recombinantemente em *Aspergillus oryzae* descrita na patente EP No. 25 305.216-B1. O método de imobilização é descrito na Patente U.S. 5.776.741. Na_2CO_3 : Sigma chemical Company, grau analítico (Exemplo 2) Na_2CO_3 : Carbonato de sódio anidro, NF/EP granular fino da Jost Chemical (Exemplo 3)

Óleos:

- óleo de soja completamente hidrogenado: ("Soy Flakes")

Bunge Foods lote 345M4-T106R3) (Exemplo 1)

- Óleo de soja: "Master Chef Salad Oil" C&T Refinery,

Charlotte, NC Lot L3C27 1337 (Exemplo 1) – Mistura de óleo de soja

completamente hidrogenado e óleo de soja (razão de mistura 27:73 (p/p)). O óleo de soja líquido é "raffinert soyaolje" da Denofa, Norway. Este óleo é óleo RBD, que sabe-se que contém ácido cítrico. Os flocos de soja completamente hidrogenados são de Loders Croklaan, USA. Nenhuma informação do teor de ácido cítrico dos flocos está disponível. (Exemplo 2)

10 - Estearina de palmeira e óleo de coco misturados refinados
(Exemplo 3)

- Estearina de palmeira e óleo de coco misturados clareados

(Exemplo 3)

Métodos:

15 Determinação do teor de gordura sólida (SFC)

O método é usado para determinação do teor de gordura sólida é baseado no método oficial Cd 16b-93 de AOCS "Solid fat content (SFC) by Low-Resolution Nuclear Magnetic Resonance".

Definição de unidade: o teor de gordura sólida é definido

20 como %

Equipamento: Forno – mantido a 100°C

Banho de resfriamento ajustado em 0°C

Banhos de água de temperatura constante (10°C a 60°C +1-
0,1°C)

25 Blocos de metal (alumínio) com furos para tubos SFC

Tubos SFC

Espectrômetro de RMN, Minispec mq-series 2001, Bruker
Optics Inc, TX, USA.

Cronômetro

O procedimento SFC é como se segue:

Etapa	Ação
1	A mistura de gordura é fundida a 100°C por 30 minutos (ou microondas)
2	Mistura de gordura (- 3 mL) é transferida para tubos de RMN (tubos em duplicata)
3	Colocar os tubos em 100°C -5 minutos (se houver sólidos aparentes em um tubo)
4	Os tubos de RMN são transferidos para banho de água a 60°C por 5 a 15 minutos.
5	Os tubos de RMN são transferidos para banho de resfriamento a 0°C por 60 +/- 1 minuto
6	Os tubos de RMN são subseqüentemente colocados em banhos de água por 30 minutos na temperatura escolhida, por exemplo, tipicamente temperaturas de corrida são 0°C, 21,1°C, 33,3°C, e 40°C.
7	Os tubos de RMN são transferidos para a cavidade do espectrômetro de RMN um a um e são medidos o mais rapidamente possível. O ímã no espectrômetro de RMN é termoajustado a 40°C.

Amostras de óleo mineral para calibração do instrumento de RMN são fornecidas por BrukerOptics Inc, TX, USA

Cálculo: o resultado será dado como uma porcentagem, por exemplo, “23,24 % SFC”

Referência: Método oficial Cd 16b-93 de AOCS “Solid Fat Content (SFC) by Low-Resolution Nuclear Magnetic Resonance” QMS 2003-22839

Ensaio de Múltiplas bateladas

O método é usado para determinar o desempenho de lipases imobilizadas para interesterificação em reações de múltiplas bateladas.

Princípio: Uma mistura de óleo é interesterificada em uma reação em batelada usando uma lipase imobilizada como catalisador. Ao final de cada reação em batelada o óleo é decantado do catalisador que permanece no reator. Então o óleo fresco é adicionado ao catalisador e uma outra reação em batelada é realizada. A taxa de reação média da enzima é determinada a partir de cada reação em batelada.

Com base na taxa de reação média da enzima em inúmeras reações em batelada consecutivas com reuso da enzima, é possível estimar a

taxa de desativação da enzima como uma função do volume de óleo que foi colocado em contato com a enzima.

Teor de gordura sólida (SFC) é usado para quantificar a alteração das propriedades da gordura em virtude da interesterificação.

5 Os resultados: Tipicamente os experimentos são usados para:

* Fazer comparação direta lado-a-lado do desempenho de dois ou mais produtos de enzima imobilizada olhando para gráficos tanto do teor de gordura sólida quanto da constante da taxa de reação média em função do número de batelada ou quantidade produzida de óleo por massa de enzima imobilizada.

* Estimar a taxa de produção média para uma dada produtividade em conversão constante, de acordo com o modelo descrito a seguir. A unidade do resultado é massa de óleo interesterificado por massa de enzima imobilizada por tempo.

Reator de batelada	Garrafas Duran Square com anel para verter e tampa de parafuso. Capacidade 250 mL.
Forno com agitador de orbital	Um forno que pode manter a temperatura constante a 70°C +/- 2°C e que pode ser equipado com um agitador orbital. Diâmetro de agitação: 25 mm Velocidade de agitação: 300 rpm

15 Para detalhes adicionais, favor ver Novozymes' Standard Method (346- SM- 0010.01) que está disponível mediante solicitação da Novozymes NS, Dinamarca.

EXEMPLOS

Exemplo 1

20 Impacto da base no desempenho de interesterificação da lipase em óleo contendo agente quelante

Este experimento foi realizado para investigar o efeito da adição de uma base (Na_2CO_3) ao óleo contendo ácido cítrico.

Preparo de mistura de óleo com ácido cítrico

25 O experimento foi realizado usando 27 % de óleo de soja

completamente hidrogenado (“Soy Flakes” Bunge Foods lote 345M4-T106R3) misturado em óleo de soja comercial (“Master Chef Salad Oil” C&T Refinery, Charlotte, NC Lote L3C27 1337).

Preparo de mistura de óleo: Aquecer 73 gramas de óleo de soja completamente hidrogenado a 70-80°C e adicionar 27 gramas de flocos de soja. Misturar e aquecer até que todos os sólidos sejam fundidos. Adicionar ácido cítrico (10-30 ppm) e agitar por cerca de 30 minutos. Preencher em garrafas plásticas e armazenar em congelador até o uso.

Interesterificação de mistura de óleo

0,5 grama de carbonato de sódio (“carbonato de sódio, anidro, reagente analítico, granular” Mallinckrodt catálogo número 7525) foi vertido em 110 gramas de mistura de óleo juntamente com 0,5 grama de lipase imobilizada A. Base e enzima decantaram naturalmente por gravidade. A mistura de óleo foi agitada em um incubador orbital a 200 rpm (25 mm de órbita) por cerca de 22 a 23 horas. A interesterificação foi corrida a 70°C e repetida na mistura de óleo preparada sem adição de base.

Determinação de SFC de mistura interesterificada de óleo com e sem base

100 g de mistura de óleo foram decantados da garrafa tomando o cuidado para que toda enzima e base fossem retidas na garrafa. O SFC do óleo foi determinado usando o método SFC descrito anteriormente. O SFC foi medido a 40°C. 100 g de mistura de óleo recém preparada foi adicionada à garrafa contendo a enzima e a base e o procedimento de interesterificação foi repetido. No total a interesterificação foi repetida nove vezes durante um período de 2 semanas, usando a mesma enzima e base substituindo ao mesmo tempo o óleo a cada 22-23 horas. Todas as massas de óleo adicionado e decantado foram registradas.

Os dados experimentais estão apresentados na figura 1. O teor de gordura sólida do óleo depois de cada reação em batelada é colocado em gráfico em função da quantidade de óleo que entrou em contato com a

enzima. O teor de gordura sólida do óleo é diminuído em virtude da reação de interesterificação. Desta forma, quanto menor o SFC obtido em condições de reação iguais, maior a atividade da enzima. Pode-se ver a partir da figura 1 que a presença de base (carbonato de sódio) melhora o desempenho de 5 interesterificação da lipase significativamente.

Exemplo 2

Melhor desempenho da lipase imobilizada por pré-tratamento de óleo com carbonato de sódio

O desempenho a lipase imobilizada A foi testado por 10 interesterificação em experimentos de múltiplas bateladas. Uma mistura de óleo de soja completamente hidrogenado e óleo de soja (razão da mistura 27:73 (p/p)) foi usada.

Em reações de múltiplas bateladas, a enzima é reusada em uma 15 série de reações em batelada. A única reação em batelada é realizada com razão de óleo para enzima essencialmente constante, tempo de reação constante e uma temperatura constante de 70°C. O nível de interesterificação é quantificado medindo o teor de gordura sólida (SFC) da gordura a 40°C.

O reator de batelada é uma garrafa de forma quadrada de 250 mL. Durante a reação a garrafa é continuamente agitada em um agitador 20 orbital. O diâmetro orbital é 1 polegada o agitador gira em 200 rpm.

Uma batelada de lipase imobilizada A (batelada LA350005) e 25 carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram testados 1) pré-tratando com Na_2CO_3 o óleo antes da interesterificação, isto é, tratamento seqüencial, e 2) tratando com Na_2CO_3 o óleo durante a interesterificação, isto é, tratamento simultâneo. Experimentos de interesterificação referência com a lipase imobilizada A foram realizados usando a mesma mistura de óleo, mas sem pré-tratamento do óleo. Três combinações de pré-tratamento e enzima foram testadas.

Pré-tratamento

Pré-tratamento de óleo foi realizado de acordo com o seguinte

procedimento. Um recipiente selado com óleo não tratado foi colocado durante toda a noite em um gabinete de aquecimento a 70°C.

O óleo foi então vertido em garrafas de 1 litro e 1 % (p/p) de carbonato de sódio foi adicionado. A garrafa foi lavada com nitrogênio e firmemente fechada. A garrafa com óleo e carbonato de sódio foi colocada em um banho de água durante toda a noite. O óleo e carbonato de sódio foram constantemente misturados usando uma barra de agitação magnética. No dia seguinte a agitação foi interrompida de maneira a sedimentar o carbonato de sódio. Para os experimentos de múltiplas bateladas o óleo foi decantado diretamente deste frasco tomando o cuidado para que a substância química do pré-tratamento permanecesse na garrafa.

Simultâneo

Para o tratamento simultâneo, a enzima e o carbonato de sódio foram pesados diretamente na garrafa de reação. 1 grama de carbonato de sódio e 0,5 grama de lipase imobilizada A foram adicionados à garrafa. O componente de pré-tratamento sólido permanecer na garrafa durante todo o experimento.

100 gramas de óleo foram colocados em contato com 0,5 grama de lipase A.

Cálculo da atividade

A cinética para a reação de interesterificação da lipase A é modelada usando um modelo de reação reversível de primeira ordem com teor de gordura sólida como o parâmetro de concentração.

$$(1) \quad k = \frac{Mb}{w \times tb} \times \ln \left[\frac{SFC_{in} - SFC_{eq}}{SFC_{out} - SFC_{eq}} \right]$$

onde

25 k é a taxa constante,

SFC_{in} é o teor de gordura sólida do óleo que entra no reator,

SFC_{out} é o teor de gordura sólida do óleo que sai do reator,

SFC_{eq} é o teor de gordura sólida do óleo no equilíbrio de

reação,

w é a massa do catalisador - lipase immobilizada A,

M_b é a massa de óleo no reator, e

t_b é o tempo de reação no reator de batelada.

5 Um modelo exponencial pode ser usado para descrever a taxa constante como uma função da produtividade

$$(2) \quad k_{\text{model}} = k_0 \times \exp\left(\frac{-\ln(2)}{V_{1/2}} \times V\right)$$

onde

k_{model} é o modelo da taxa constante

k_0 é a taxa constante para a enzima recém preparada

10 $V_{1/2}$ é o volume com base na meia-vida da enzima – a quantidade de óleo por quantidade de enzima que é necessário para reduzir k_{model} em 50 %.

V é a quantidade de óleo por quantidade de enzima que passou no reator.

15 Na figura 2 a taxa constante é colocada em gráfico em função da quantidade de óleo interesterificado por quantidade de lipase immobilizada A para cada um dos tratamentos.

20 A partir da figura 2 pode-se ver que a enzima mantém atividade significativamente maior no óleo que foi tanto pré-tratado quanto tratado com carbonato de sódio durante a interesterificação.

Ajustando o modelo de inativação dado em (2) anterior aos dados apresentados na figura 2, a taxa constante para enzima recém preparada e o volume com base na meia-vida é determinada. Estes números estão listados na tabela 1 a seguir.

Amostra Id		$V_{1/2}$ [kg/kg]	k_0 [min ⁻¹]
Composto	Seqüência		
Na ₂ CO ₃	Pré-tratado	596	0,293
Na ₂ CO ₃	Pré-tratado	594	0,301
Na ₂ CO ₃	Pré-tratado	626	0,289

Na_2CO_3	Simultâneo	722	0,247
Na_2CO_3	Simultâneo	788	0,235
Nenhum	Referência	504	0,215
Nenhum	Referência	418	0,237
Nenhum	Referência	414	0,250

Tabela 1: Parâmetros do modelo – Lipozima IM, batelada LA350005.

k_o é a taxa constante para enzima recém preparada e $V_{1/2}$ o volume com base na meia-vida.

Os parâmetros determinados para o modelo de inativação indicam que ele é principalmente a estabilidade da enzima no óleo, representada pelo volume com base na meia-vida que aumenta pelo tratamento com carbonato de sódio. O volume com base na meia-vida é aumentado em 30-70 % por tratamento com carbonato de sódio.

Exemplo 3

A produtividade atingível com lipase A, medida por MBA (Ensaio de Múltiplas bateladas) da combinação de óleo enzima

Neste experimento a produtividade de interesterificação foi testada usando o MBA (ensaio de múltiplas bateladas) descrito na seção “Materiais & Métodos” anterior.

Misturas de óleos foram misturas de estearina de palmeira e óleo de coco onde o óleo de coco foi tanto refinado quanto refinado e clareado. Estas misturas foram pré-tratadas com Na_2CO_3 e interesterificadas com lipase imobilizada A e a produtividade da enzima no óleo foi comparada às referências que não foram pré-tratadas com Na_2CO_3 .

20 Tabela – Sumário dos Resultados de Produtividade

Amostra			Produtividade kg de óleo/kg de enzima 10 % de atividade de lipase relativa deixada quando testada a produtividade
Oleo refinado	Nenhum	Referência	1.650
	Na_2CO_3	Pré-tratado	3.620
Óleo branqueado	Nenhum	Referência	210
	Na_2CO_3	Pré-tratado	3.250

Observou-se que a produtividade da amostra de óleo refinado foi 1.650 kg de óleo/kg de enzima. Quando pré-tratado com Na_2CO_3 a

produtividade aumentou para 3.620 kg de óleo/kg de enzima.

O óleo branqueado deu um valor de produtividade de 210 kg de óleo/kg de enzima. Quando o óleo branqueado foi pré-tratado com Na_2CO_3 a produtividade aumentou para 3.250 kg de óleo/kg de enzima enquanto que a produtividade do óleo refinado aumentou de 1.650 para 3.620 kg de óleo/kg de enzima.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para interesterificar óleo contendo um ou mais agentes quelantes de metal de ácido cítrico e/ou ácido fosfórico, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 a) colocar o óleo em contato com uma base, e
 b) reagir o dito óleo com uma lipase,
 em que as etapas a) e b) são realizadas sequencial ou simultaneamente.

10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o óleo é uma mistura de dois ou mais óleos.

 3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o óleo é óleo comestível, preferivelmente óleo vegetal.

15 4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o(s) óleo(s) vegetal(is) é(são) selecionado do grupo que consiste em estearina de palmeira, oleína de palmeira, óleo de semente de palmeira, óleo de milho, óleo de canola (colza), óleo de soja, óleo de semente de algodão, óleo de palmeira, óleo de coco, ou óleo de girassol, ou uma mistura destes.

20 5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o(s) óleo(s) é(são) bruto, refinado, clareado, desodorizado ou qualquer combinação destes.

25 6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o agente quelante de metal está presente no óleo em uma concentração entre 1 a 100 ppm, preferivelmente 10 a 90 ppm, especialmente 50 ppm.

 7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a base é uma base forte selecionada de hidróxido de lítio (LiOH), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio

(KOH), hidróxido de rubídio (RbOH), hidróxido de césio (CsOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), hidróxido de estrôncio (Sr(OH)₂), hidróxido de bário (Ba(OH)₂).

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
5 a 7, caracterizado pelo fato de que a base é hidróxido de sódio (NaOH).

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 7, caracterizado pelo fato de que a base é uma base fraca.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 9, caracterizado pelo fato de que a base é uma base fraca selecionada do
grupo que consiste em: amônia (NH₃), alanina (C₃H₅O₂NH₂), dimetilamina
(CH₃)₂NH, etilamina (C₂H₅NH₂), glicina (C₂H₃O₂NH₂), hidrazina (N₂H₄),
metilamina (CH₃NH₂), trimetilamina ((CH₃)₃N) e carbonato de sódio
(Na₂CO₃), hidrogeno carbonato de sódio, (NaHCO₃), nitrito de sódio
(NaNO₂) e acetato de sódio (CH₃COO Na).

15 11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 10, caracterizado pelo fato de que a base é carbonato de sódio (Na₂CO₃).

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 11, caracterizado pelo fato de que a lipase é uma lipase 1,3-específica.

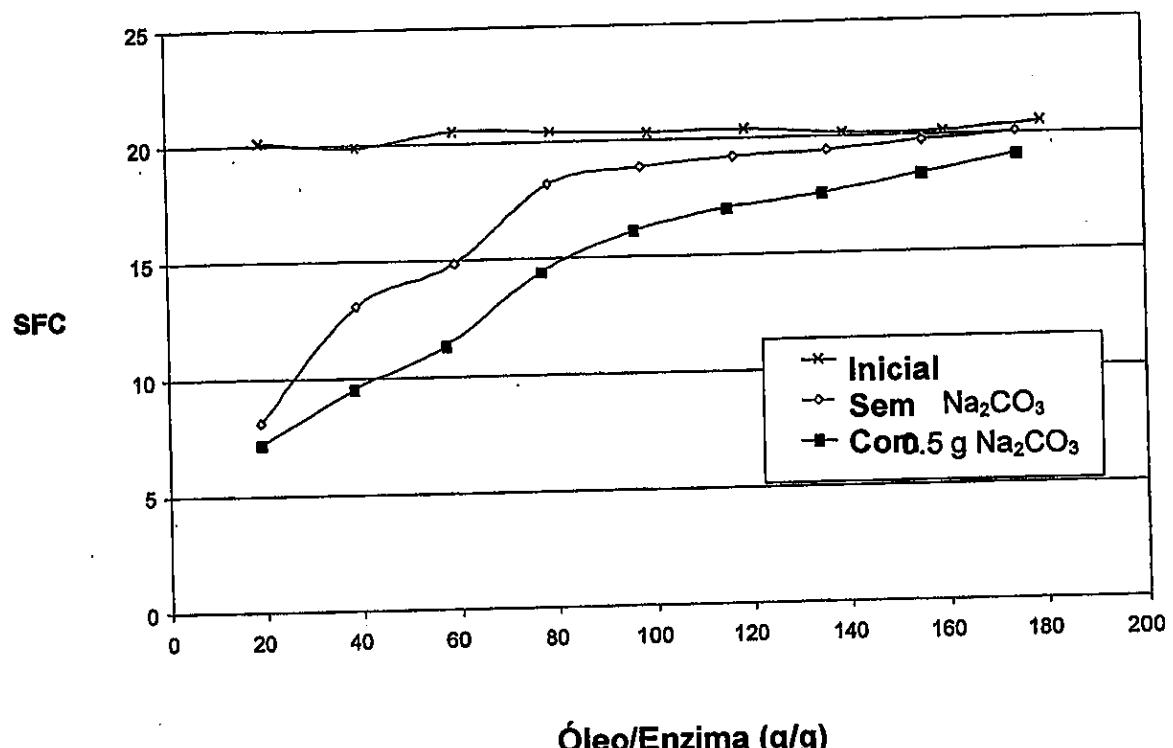
20 13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 12, caracterizado pelo fato de que a lipase é uma lipase de fungo
preferivelmente do gênero *Thermomyces*, preferivelmente uma cepa da
espécie *T. lanuginosus* ou Lipase B derivada de levedura da espécie *Candida
antactica*.

25 14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 13, caracterizado pelo fato de que a lipase é imobilizada.

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
a 14, caracterizado pelo fato de que a base é usada em uma quantidade de
0,001 a 100 milimoles por quilograma de óleo, preferivelmente entre 0,01 e
10 milimoles de base por quilograma de óleo, especialmente 0,1-1 milimoles

por quilograma de óleo.

16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a temperatura durante a interesterificação é entre 50°C e 100°C, preferivelmente 60°C e 90°C, especialmente de 65°C a 5 80°C.

Efeitos de base no ácido em óleo**Figura 1**

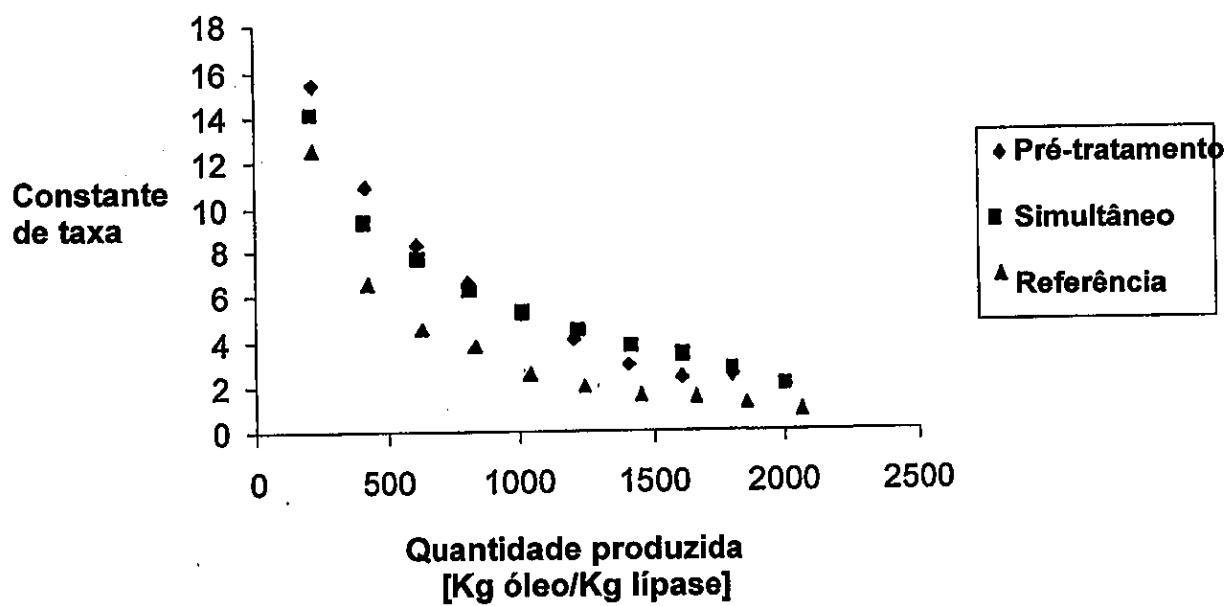


Figura 2