

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

(21) **PI 0906455-9 A2**

(22) Data de Depósito: 04/12/2009
(43) Data da Publicação: 24/07/2012
(RPI 2168)



(51) Int.Cl.:

C12N 9/14
C12S 3/00
C12S 3/14
C12R 1/66
C12R 1/80
C12R 1/845
C12R 1/885

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

(73) Titular(es): Petroleo Brasileiro S.A. - Petrobras

(72) Inventor(es): Aline Machado de Castro, Denise Maria Guimarães Freire, Juliana Vaz Bevilaqua, Lídia Maria Melo Santa Anna, Mateus Gomes de Godoy, Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, Olga Lima Tavares Machado

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL. A presente invenção se refere à produção de lipases com diferentes atividades, produzida com baixo custo, a partir de resíduos industriais ou agroindustriais, em especial empregando substratos largamente disponibilizados no território nacional, tais como: torta de pinhão manso, torta de mamona, torta de soja, torta de babaçu, torta de macaúba dentre outras. O processo tem por objetivo a produção de lipases com características distintas, por fungos filamentosos naturalmente ocorrentes, dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Rhizopus*, por fermentação no estado sólido (FES). Adicionalmente, o processo permite ainda obter a redução da alergenicidade das tortas que apresentam caráter tóxico e alergênico e consequente valoração das biomassas.

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de um processo para a produção de lipases por fungos filamentosos por fermentação em estado sólido. Utilizam-se tortas residuais de diversas matérias-primas oleaginosas, com concomitante destoxificação e redução da alergenicidade das tortas que apresentam caráter tóxico e alergênico e consequente valoração das biomassas.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Apesar da rota química para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais estar bem estabelecida, a rota enzimática, todavia, ainda se encontra em desenvolvimento.

A reação catalisada por lipases se apresenta como alternativa promissora, tanto no que se refere à redução de custos associados à purificação da glicerina gerada quanto ao fato de representar forte redução do impacto ambiental para disposição deste resíduo.

Por outro lado, a aplicação na indústria de processos enzimáticos catalisados por lipases ainda apresenta o inconveniente do alto custo para a produção da enzima.

Lipases são enzimas que apresentam grande versatilidade de aplicação, podendo ser utilizadas em diferentes indústrias, como por exemplo, alimentos, farmacêutica, química, entre outras, visto que hidrolisam ligações éster-carboxílicas presentes em trigliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, e, também, atuam de modo reversível, nas reações de transesterificação para obtenção de biodiesel.

A fermentação em estado sólido (FES) reproduz processos microbiológicos naturais. Assim, vários produtos de valor agregado têm sido produzidos por esta técnica, fazendo uso de matérias-primas provenientes da natureza. A FES apresenta como vantagem a

possibilidade de uso de matérias-primas de baixo custo como meio de cultivo do microrganismo, simplicidade do meio de fermentação, menor probabilidade de contaminação e possibilidade de obtenção de enzima extracelular mais concentrada (Martins, 2001; Alonso, 2001).

5 TÉCNICA RELACIONADA

O processo seletivo dos substratos sólidos empregado para a produção de enzimas por meio de FES depende de vários fatores, dentre eles, custo e disponibilidade da matéria-prima, possibilitando o aproveitamento de grande variedade de resíduos industriais.

10 O documento de patente norte-americano **US 2004/0055953**, citado como referência apresenta um processo de preparação de uma composição enzimática utilizando efluentes domésticos e industriais ricos em gorduras e outros nutrientes, produzida pelo fungo *Penicillium restrictum*.

15 O documento de patente **EP 0384717**, citado como referência, descreve um processo para produção de lipases, de grau alimentício, empregando como substrato o óleo de milho e *Bacillus spp*.

No Brasil diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com base no aproveitamento de resíduos agroindustriais resultantes de processos de
20 obtenção de biodiesel. São descritos processos de obtenção de lipases com diferentes atividades, obtidas por FES com *Burkholderia cepacia* (Fernandes, 2007) em substratos como o farelo de casca de trigo, o farelo de sementes de girassol e a torta de milho.

O pedido de patente brasileiro **PI 0703290**, citado como referência,
25 apresenta um método de tratamento de rejeitos agroindustriais, em especial tortas de mamona, com o objetivo de destoxicação e redução da alergenicidade com a produção de enzimas lipásicas.

A torta de mamona é empregada como substrato para o crescimento de microrganismos, por FES com fungos filamentosos produtores de
30 lipases. O resíduo tratado, depois de esterilizado, poderá ser descartado

ou utilizado como ração animal ou como fertilizante.

Com os incentivos governamentais para a cultura de diversas oleaginosas, visando à obtenção de biodiesel, é esperado o aumento na formação de seus sub ou co-produtos, tais como as tortas residuais da
5 etapa de extração dos óleos. Certas tortas, tais como a de pinhão manso, apresentam caráter alergênico e tóxico, tendo restrita aplicação como fertilizantes ou ração animal, por exemplo.

Portanto um objetivo da presente invenção é a produção de lipases com diferentes atividades, produzidas com baixo custo, a partir de
10 resíduos industriais ou agroindustriais, em especial empregando substratos largamente disponibilizados no território nacional, como a torta de pinhão manso, a torta de mamona, a torta de soja, a torta de babaçu, dentre outras.

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à mesma família da
15 mamona e da mandioca. A semente é relativamente grande e, quando seca, apresenta fratura resinosa. O fruto está sendo considerado uma opção agrícola para a região nordeste, por ser uma espécie nativa, exigente em insolação e com forte resistência à seca e apresentar a possibilidade de uso para a produção de biodiesel. Após a extração do
20 óleo, a torta contém ainda aproximadamente 8% de óleo, o qual pode ser extraído com solventes orgânicos, e o farelo é rico em nitrogênio, fósforo e potássio.

Outro objetivo da presente invenção é disponibilizar um processo para a redução da toxicidade dessas tortas, de forma que as aplicações
25 citadas tornam-se possíveis. Dessa forma, além de agregar valor a um subproduto, também se obtém um insumo para o processo de obtenção de biodiesel.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um processo para produção de
30 lipases a partir de resíduos agroindustriais, em particular resíduos

oleaginosos, por fungos filamentosos nativos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Rhizopus*, por fermentação no estado sólido (FES). Os fungos filamentosos naturalmente ocorrentes foram cultivados em diferentes substratos sólidos, especialmente tortas residuais de processos de extração de óleos, tais como o rejeito de mamona, a torta de babaçu, a torta de pinhão manso, a torta de macaúba e a torta de soja.

Em outro aspecto a invenção trata de um processo para a redução da toxicidade dessas tortas, de forma que as aplicações como fertilizantes ou ração animal, por exemplo, passam a ser possíveis. Dessa forma, além de agregar valor a um subproduto, também se obtém um insumo para o processo de obtenção de biodiesel, sendo empregada como biocatalisador.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra um gráfico que representa produção de lipases por *P. simplicissimum* a partir de torta de pinhão manso.

A Figura 2 apresenta fotografias de um microscópio estereoscópico, mostrando que a linhagem *P. simplicissimum* foi capaz de crescer completamente na torta de pinhão manso.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objetivo a produção de lipases com características distintas, por fungos filamentosos naturalmente ocorrentes, dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Rhizopus*, por fermentação no estado sólido (FES). Os fungos filamentosos nativos foram cultivados em diferentes tortas de processos de extração de óleos, como por exemplo, rejeito de mamona, torta de babaçu, torta de pinhão manso, torta de macaúba e torta de soja.

O processo seletivo de substratos sólidos depende de vários fatores. No processo de fermentação no estado sólido, como mencionado anteriormente, os substratos fornecem não apenas nutrientes para a cultura dos microrganismos, mas igualmente servem como suporte para o

crescimento das células microbianas. A granulometria do material e o teor de umidade, assim como a temperatura e pH do meio, são fatores críticos para o crescimento das células e atividade no substrato.

As condições de FES utilizadas na presente invenção foram
5 semelhantes às reportadas no pedido de patente brasileiro PI0703290-0, de titularidade da requerente, porém desta feita foram empregados diferentes substratos e microrganismos, obtendo-se enzimas lipásicas com diferentes atividades enzimáticas.

Os esporos foram obtidos em meio de cultura contendo a seguinte
10 composição, tendo por base 100 mL de meio de cultura: amido solúvel – 2,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 g; KH_2PO_4 – 0,05 g; CaCO_3 – 0,5 g; extrato de levedura – 0,1 g; óleo de oliva – 1,0 g; goma guar – 1,0 g, e incubados a 30°C por 7 dias. Para aplicação de 10^6 a 10^8 esporos por grama de substrato, os esporos foram suspensos em solução tampão de fosfato de
15 sódio (100 mM, pH 7).

Os esporos foram aplicados diretamente no substrato para se conduzir a fermentação, ou aplicados primeiramente em uma pequena quantidade de substrato (entre 5% e 15% da massa utilizada na fermentação), com o objetivo de se fazer um pré-inóculo, e em seguida
20 esse pré-inóculo com as células crescidas foi inoculado em uma quantidade maior de substrato para a fermentação.

A umidade foi ajustada entre 30% e 80% m/m e a temperatura mantida entre 25°C e 35°C.

Em alguns casos, visando aumentar a produção de lipases, as
25 tortas foram suplementadas com outros rejeitos agroindustriais, como melaço (rejeito da produção de açúcar de cana) e glicerina (rejeito da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e sebo animal), em concentrações entre 0% e 10%.

A Tabela 1 apresenta alguns resultados comparativos de produção
30 de lipases por FES, empregando torta de mamona (PI 0703290) e utilizan-

do torta de babaçu como matéria-prima.

<u>TABELA 1</u>		
Microrganismo	Atividade enzimática (U/g)	
	torta de mamona	torta de babaçu
P. simplicissimum	87	
P. restrictum	16	
A. parasiticus	21	
A. sulphureus	15	
Rhizopus sp.		150
A. wentii		12
P. verrucosum		20
P. brevicompactum		60

A utilização de rejeitos agroindustriais como suplemento durante a fermentação é exemplificado pelo cultivo de *Rhizopus* sp. em torta de babaçu. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

<u>TABELA 2</u>	
Concentração de melaço (%)	Atividade lipásica (U/g)
0	88
2	150
6,25	85

5 As enzimas também foram produzidas utilizando-se torta de pinhão manso como matéria-prima, como ilustra o gráfico da Figura 1.

10 Observa-se que a torta de pinhão manso foi uma excelente matéria-prima para a produção de lipases, visto que foram obtidos valores superiores de produção (139 U/g) em relação aos relatados na PI0703290 (87 U/g), utilizando-se o mesmo microrganismo.

A produção de proteases, indesejadas por reduzirem a estabilidade das lipases, foi bem inferior à das enzimas de interesse, e a concentração de N-acetilglicosamina retrata uma medida indireta do crescimento do fungo filamentoso no sistema, mostrando que ele é associado à produção das enzimas.

As fotografias de um microscópio estereoscópico, apresentadas na Figura 2, comprovam que a linhagem *P. simplicissimum* foi capaz de crescer completamente na torta, com conseqüente produção das enzimas e destoxificação da mesma torta. O aspecto microscópico mostra o desenvolvimento de *P. simplicissimum* sobre a torta de pinhão manso após 24 h (a) e 96 h (b) de fermentação.

O processo proposto também promove a redução da alergenicidade das tortas que apresentam caráter alergênico, de forma que estas passam a ter potencial para aplicação como fertilizantes e ração animal. Como exemplo, a Tabela 3 apresenta as concentrações de ésteres de forbol, uma classe de composto tóxica presente na torta de pinhão manso, ao longo da fermentação.

<u>TABELA 3</u>	
Amostra	Concentração de Ésteres de Forbol (µg/g)
Torta in natura	4,11
Torta autoclavada	3,76
Torta fermentada 24h	1,83
Torta fermentada 48h	1,12
Torta fermentada 72h	1,04
Torta fermentada 96h	0,88
Torta fermentada 120h	0,57

A descrição que se fez até aqui do processo para a produção de lipases por microrganismos nativos por fermentação em estado sólido,

- objeto da presente invenção, deve ser considerada apenas como uma possível ou possíveis concretizações, e quaisquer características particulares nelas introduzidas devem ser entendidas como ilustrativa, visando apenas facilitar a compreensão. Desta forma, não podem de
- 5 forma alguma ser consideradas como limitantes da invenção, a qual está limitada ao escopo das reivindicações que seguem.

REIVINDICAÇÕES

1- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, caracterizado por empregar como substrato resíduos industriais selecionados entre torta de pinhão manso, torta de mamona, torta de babaçu, torta de soja, torta de macaúba em presença de fungos filamentosos selecionados entre os gêneros Aspergillus, Penicillium, Trichoderma e Rhizopus, por fermentação no estado sólido.

2- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se suplementar a torta com outros rejeitos industriais, preferencialmente melaço e glicerina da produção de biodiesel a partir de diversos óleos vegetais e sebo animal, e estes promoverem o aumento da produção enzimática.

3- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por produzir lipases com diferentes atividades enzimáticas.

4- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o substrato empregado preferencialmente ser a torta de pinhão manso.

5- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o fungo filamentoso preferencialmente empregado ser o Penicillium simplicissimum.

6- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por reduzir a toxicidade das tortas de pinhão manso, de mamona e de soja, de forma que possam ser aplicadas como fertilizantes ou ração animal.

7- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO

AGROINDUSTRIAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a lipase obtida ser empregada como biocatalisador para processo de obtenção de biodiesel.

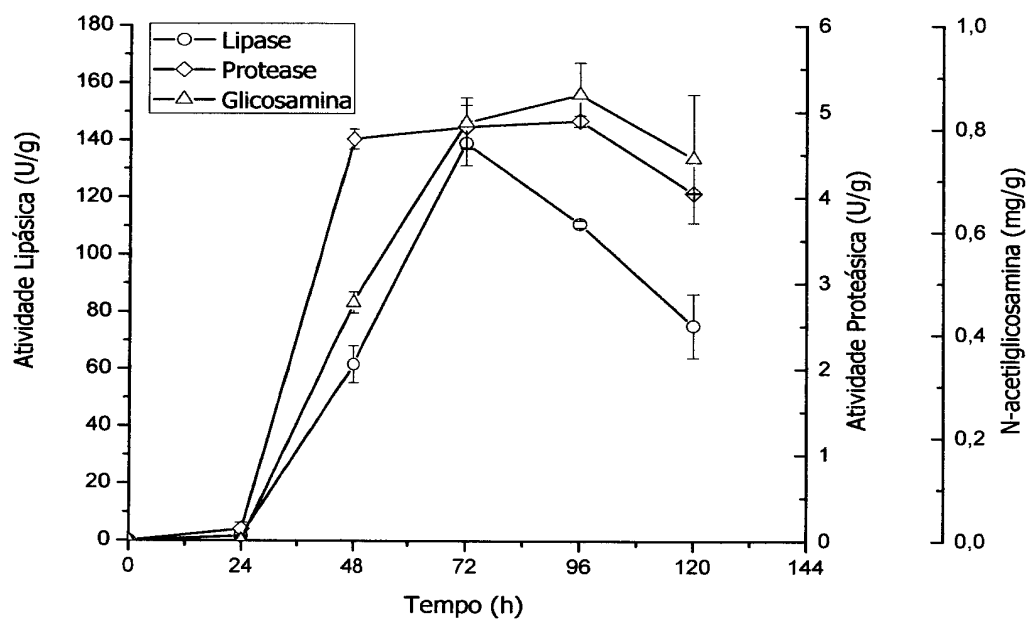


FIG. 1

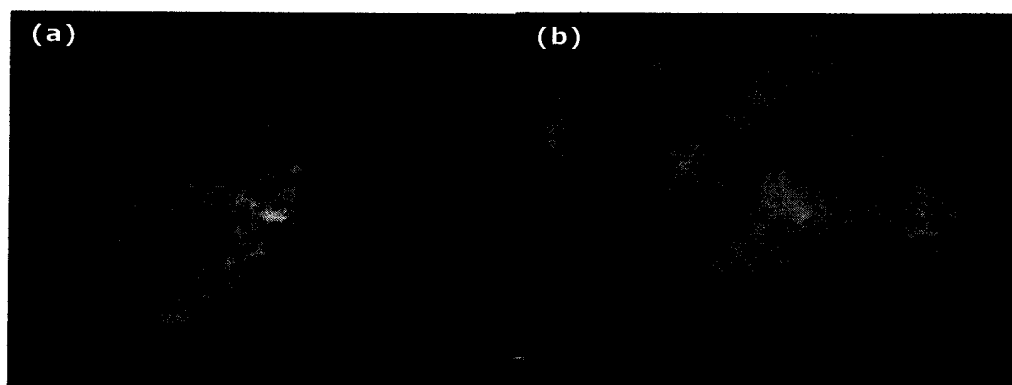


FIG. 2

RESUMO**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL**

A presente invenção se refere à produção de lipases com
5 diferentes atividades, produzida com baixo custo, a partir de resíduos
industriais ou agroindustriais, em especial empregando substratos
largamente disponibilizados no território nacional, tais como: torta de
pinhão manso, torta de mamona, torta de soja, torta de babaçu, torta de
macaúba dentre outras. O processo tem por objetivo a produção de
10 lipases com características distintas, por fungos filamentosos naturalmente
ocorrentes, dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Rhizopus*,
por fermentação no estado sólido (FES). Adicionalmente, o processo
permite ainda obter a redução da alergenicidade das tortas que
apresentam caráter tóxico e alergênico e consequente valoração das
15 biomassas.