

# HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE GIRASSOL COM LIPASES COMERCIAIS IMOBILIZADAS

Filipe C.A. Sousa<sup>1</sup>, Erika F. Souza<sup>2</sup>, Selma C. Terzi<sup>2</sup>, Ana Iraidy S. Brigida<sup>2</sup>, Edmar M. Penha<sup>2</sup> e Leda M.F. Gottschalk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. Av. Manuel Caldeira de Alvarenga 1203, 23.070-200, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas 29501, 23.020-470, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail para contato: leda.fortes@embrapa.br

## RESUMO

*Diversas pesquisas estudaram a tecnologia de modificação dos óleos e gorduras e a obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados que beneficiam a saúde humana. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise parcial ou total destes triacilgliceróis (TAGs) produzindo ácidos graxos livres (AGLs), diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG) e glicerol. Neste trabalho, enzimas comerciais imobilizadas foram utilizadas para a hidrólise do óleo de girassol. As lipases foram caracterizadas quanto à sua especificidade em relação a diferentes p-nitrofenil ésteres. As condições da hidrólise enzimática do óleo de girassol foram: proporção molar de água:óleo (6:1); carga da lipase de 1% (p/p) em relação ao óleo; temperatura de 50°C e agitação de 150 rpm. Monitorou-se a hidrólise durante 4,5 horas através da retirada de alíquotas de 1% do volume reacional. Os ácidos graxos livres foram quantificados em titulador automático com NaOH 0,05 N. Os melhores resultados do rendimento da hidrólise foram obtidos com a enzima imobilizada comercial de *Thermomyces lanuginosus* e nas misturas enzimáticas em que essa enzima estava presente.*

## 1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) são essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano devendo ser fornecidos através da dieta (Feltus et al., 2013). A hidrólise enzimática de óleos vegetais pode fornecer um concentrado de AGPIs. A hidrólise completa dos triglicerídeos irá produzir ácidos graxos e glicerol. Estes ácidos graxos encontram várias aplicações, tais como fabricação de sabões, agentes tensoativos e detergentes, e na indústria alimentar. Como

os óleos são substratos muito heterogêneos, a alta especificidade e seletividade das lipases que serão utilizadas na reação de hidrólise vai resultar em produtos de melhor qualidade (Gutiérrez-Ayesta et al., 2007).

As lipases são enzimas hidrolíticas, que em ambientes aquo-restritos são capazes de catalisar diversas reações como esterificação, transesterificação e interesterificação (Sharma et al., 2001). Para decidir sua aplicação final, primeiramente é necessário conhecer a especificidade das lipases. As lipases microbianas podem ser classificadas em três grupos: específica em relação à posição 1,3 do ácido graxo no triglicérido, não-específica ou específica em relação ao tamanho da cadeia do ácido graxo. As lipases ácido graxo específicas são aquelas que catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG.

As lipases de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML) têm sido amplamente pesquisadas em biocatálise e elas são atualmente comercializadas na sua forma solúvel e imobilizada em suportes hidrofílicos. Recentemente, o uso destas duas lipases foi revisto para as suas principais características e aplicações e, ao mesmo tempo, reconhecidas como lipases 1,3-específicas (Fernandez-Lafuente, 2010; Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010). Já a lipase Novozym-435, uma das mais utilizadas industrialmente, é uma lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em resina acrílica macroporosa. Ela é conhecida por ser uma lipase não específica em relação à posição do ácido graxo (Poojari et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a especificidade de enzimas comerciais imobilizadas e o efeito das suas combinações na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados por hidrólise enzimática do óleo de girassol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Enzimas Comerciais

As enzimas imobilizadas comerciais de *Thermomyces lanuginosus* (TL), de *Candida antarctica* (435) e de *Rhizomucor miehei* (RML) foram gentilmente cedidas pela empresa Novozymes.

### 2.2. Hidrólise Enzimática do Óleo de Girassol

A hidrólise enzimática do óleo de girassol foi realizada com as enzimas 435, TL e RM separadamente e com as diferentes misturas (m/m): TL+435 (50:50), RM+435 (50:50), TL+RM (50:50) e 435+RM+TL (35:35:35). A reação ocorreu em frascos do tipo Erlenmeyer, sem a adição de qualquer emulsificante, contendo apenas 100 g de óleo e 12,4 g de H<sub>2</sub>O cada, formando uma razão molar de 1:6. A quantidade de enzima utilizada foi de 1% em relação ao peso do óleo de girassol. A reação ocorreu em triplicata, contra um branco com água. Os frascos Erlenmeyer foram incubados com uma agitação de 150 rpm e temperatura de 50°C. Amostras de 1 mL foram coletadas em tempos pré-definidos e a reação foi interrompida com a adição de 1 mL do reagente de parada

(Água: Acetona: Etanol, 1:1:1), sendo, posteriormente, adicionado 28 mL de água destilada para equilibrar o volume e então as amostras foram analisadas quanto a hidrólise no titulador automático. Na metodologia de hidrólise utilizada, observou-se a formação de ácidos graxos livres através de titulação com NaOH 0,05 N.

### 2.3. Avaliação da Especificidade da Lipase com Diferentes Substratos

Avaliação das especificidades das lipases comerciais foi realizada através da hidrólise de p-nitrofenil ésteres com cadeias de tamanho curto (acetato, C2; butirato, C4), médio (octanoato, C8; laurato, C12) e longo (palmitato, 16). Todos os substratos e o padrão de p-nitrofenol utilizados para este teste foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Os diferentes substratos foram solubilizados em álcool isopropílico e/ou DMSO e depois homogeneizados em tampão fosfato 50 mM pH 7,0, de forma que a concentração dos substratos foi de 560  $\mu$ M. A reação foi acompanhada pela liberação de p-nitrofenol no meio reacional, o qual foi detectado por leitura espectrofotométrica a 410 nm (Stoytcheva et al., 2012). Em um Becker, uma massa definida de enzima imobilizada foi adicionada a 20 mL do substrato em temperatura ambiente. Durante 10 min a reação foi monitorada com relação à concentração de p-nitrofenol em espectrofotômetro a 410 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 1 e graficamente expressa em percentual relativo a atividade mais alta de cada enzima para cada substrato.

$$A = [(\Delta Abs/\Delta t) \cdot f \cdot Vr]/Ma \quad (1)$$

Onde:

A - atividade da enzima (U/g), onde uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio;

$\Delta Abs$  - variação de absorvância no intervalo de tempo ( $\Delta t$ , em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

$\Delta t$  - o tempo decorrido de análise, em minutos;

$Vr$  - volume reacional total (L);

$Ma$  - Massa da amostra (g);

$f$  - fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol (109,3  $\mu$ mol/L).

### 3. RESULTADOS

As especificidades das enzimas testadas neste trabalho foram avaliadas e os resultados obtidos são apresentados na Figura 1. Em relação à especificidade da enzima de *Candida antarctica* (435), pode-se perceber que esta enzima é mais específica para ésteres de cadeias carboxílica curtas (C2 e C4), apresentando atividade percentual menor que 40% para cadeias média e longa. As enzimas de *Thermomyces lanuginosus* (TL) e de *Rhizomucor miehei* (RM) apresentaram alta especificidade para hidrólise de *p*-nitrofenil ésteres de cadeias carboxílica com 8 átomos de carbono, contudo, apresentaram perfil de especificidade diferente para os outros ésteres testados.

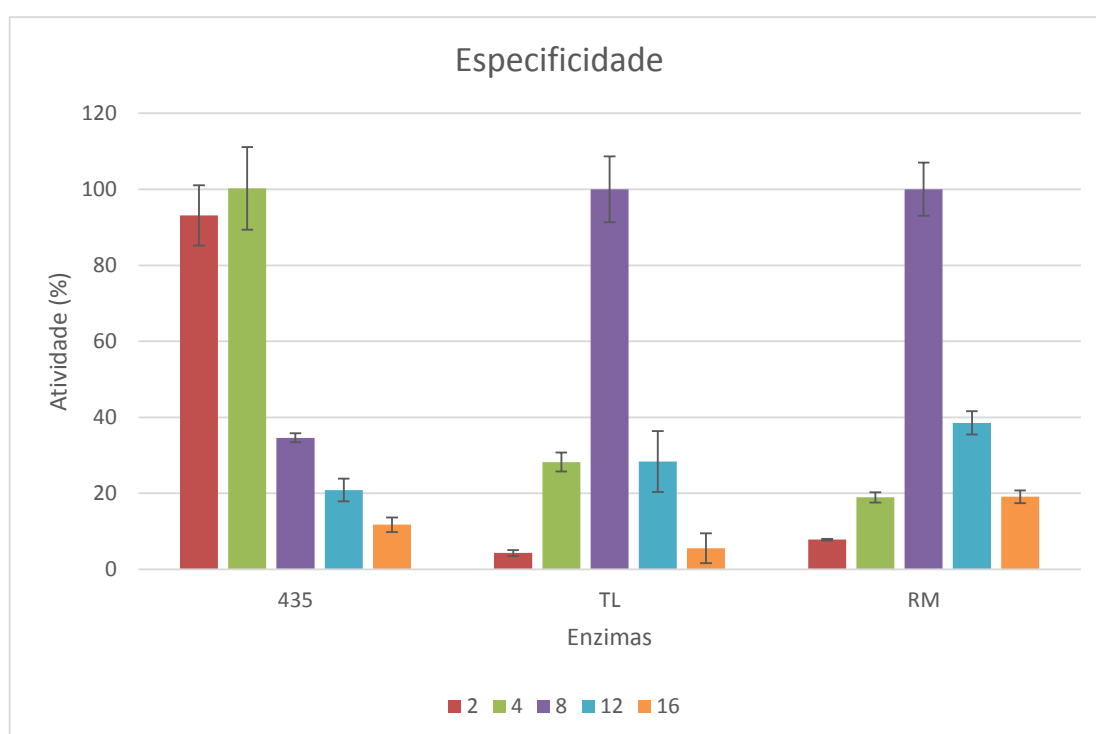


Figura 1. Comparação da especificidade de lipases imobilizadas frente a diferentes *p*-nitrofenil ésteres com cadeia carboxílica de 2, 4, 8, 12 e 16 carbonos.

O óleo de girassol foi escolhido para a hidrólise enzimática por conter cerca de 60% de ácido linoleico, considerado essencial ao organismo humano. A hidrólise deste óleo com lipases imobilizadas foi inicialmente testada com apenas um tipo de lipase (Figura 2). Maior concentração de ácidos graxos livre (944 mM) foi observada para TL após 3,5 horas de reação, sendo a hidrólise observada desde a primeira meia hora de reação. Para as lipases 435 e RM, a hidrólise foi bem menor, só sendo possível de ser observada a partir de 3,5 horas de reação. Desta forma, avaliou-se o desempenho dessas enzimas quando aplicadas de forma simultânea no sistema reacional. Os melhores resultados foram obtidos com a combinação de enzimas TL + 435, na mesma proporção de peso, formando 1% de peso em relação ao óleo de girassol (100 g). Já a combinação de enzimas RM+435 foi a que promoveu menor hidrólise, sendo a concentração de ácido graxos livre menor até que os valores obtidos para o uso das enzimas da forma individualizada. Em todas as

combinações de enzimas utilizadas na hidrólise (TL+435; RM+435; TL+RM; 435+RM+TL), não foi percebido grande incremento no resultado final se comparado à hidrólise na qual apenas a lipase TL foi utilizada como biocatalisador (Figura 2). Resultados da literatura mostram que combinações de enzimas com especificidade diferentes podem melhorar a ação da lipase nos diferentes ácidos graxos presentes em óleo vegetais (Rodrigues e Ayub, 2011).

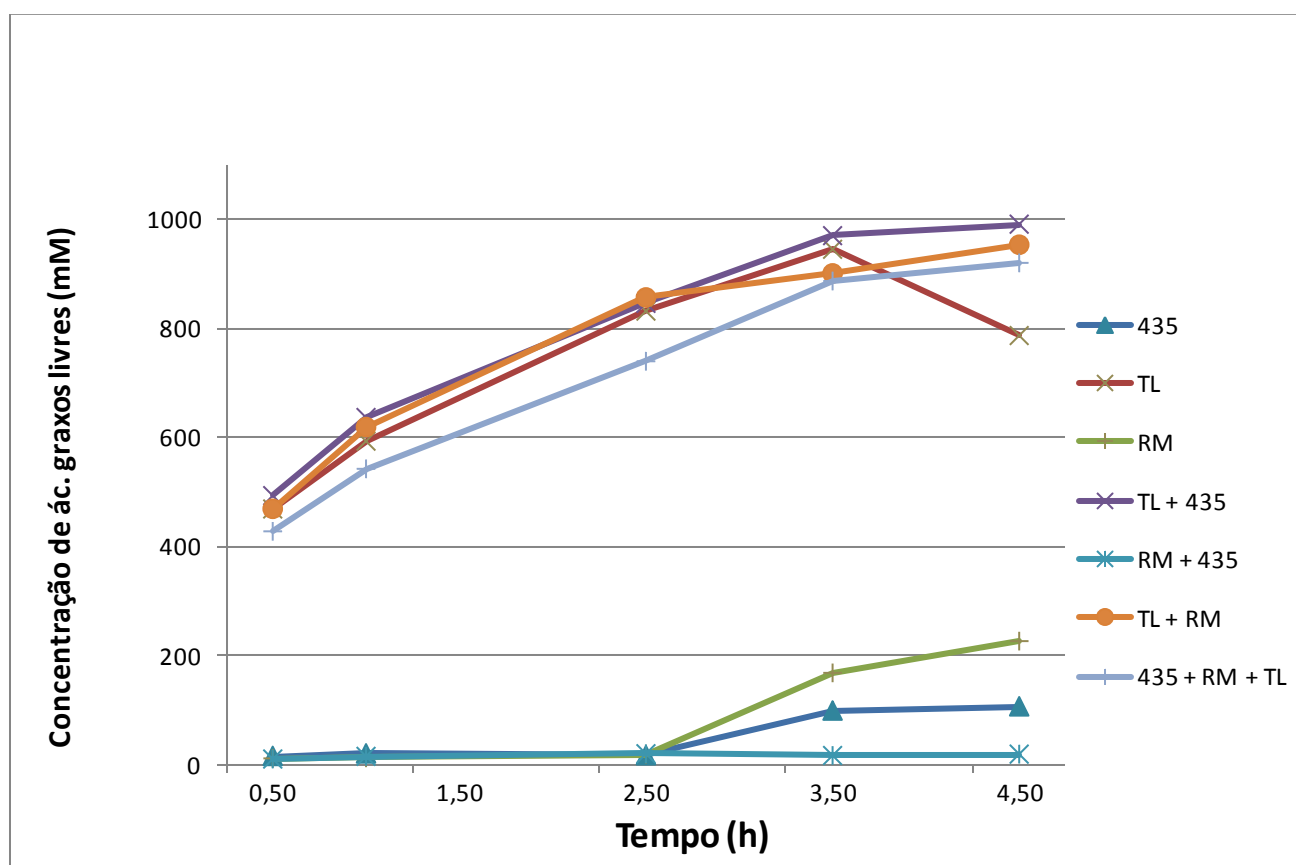


Figura 2. Concentração de ácido graxos livres obtidos durante a hidrólise de óleo de girassol pelas lipases imobilizadas 435, TL e RM e pelas misturas TL+435, RM+435, TL+RM e 435+RM+TL.

#### 4. CONCLUSÕES

Esperava-se que as combinações de enzimas com especificidade diferentes poderiam melhorar a ação da lipase, porém os melhores rendimentos foram obtidos nas hidrólises em que a enzima TL estava presente em combinações enzimáticas ou sozinha. A mistura enzimática composta pelas enzimas 435 + RM, utilizada apresentou rendimento cerca de 40 vezes menor que enzima TL e cerca de 12 vezes menor que enzima RM atuando sozinha na hidrólise, concluindo que não houve sinergismo das enzimas na hidrólise do óleo de girassol.

## 5. REFERÊNCIAS

- Feltes, M.M.C., Oliveira, D., Block, J.M., Ninow, J.N., 2013. The production, benefits and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest. *Food Bioprocess Technol.* 6, 17-35.
- Fernandez-Lafuente, R., 2010. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym.* 62, 197–212.
- Gutiérrez-Ayesta, C., Carelli, A.A., Ferreira, M.L. 2007. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 35–43.
- Poojari, Y., Beemat, J. S., Clarson, S. J., 2013. Enzymatic synthesis of poly( $\epsilon$ -caprolactone): thermal properties, recovery, and reuse of lipase B from *Candida antarctica* immobilized on macroporous acrylic resin particles. *Polym Bull.* 70, 1543–1552.
- Rodrigues, R.C.; Ayub, M.A.Z., 2011. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochem.* 46, 682-688.
- Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente R., 2010. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J Mol Catal B Enzym.* 64, 1–22.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 19, 627-662.
- Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., Leon, J.A., Gochev, V., 2012. Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. *Curr Anal Chem.* 8, 400-407.