

# COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICAS DE LIPASES EMPREGANDO COMO SUBSTRATO DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS

<sup>1</sup>Tânia Bueno; Flavia C. V. Vieira; <sup>1</sup>Camilla T. Pierre; <sup>1</sup>Larissa de Freitas;  
<sup>1</sup>Heizir F. de Castro\*

<sup>1</sup>Faculdade de Engenharia Química de Lorena/ Departamento de Engenharia Química,  
CP 116, 12606-970 Lorena-SP-e-mail: tania@dequi.fauenquil.br

**Palavras-chave:** Hidrólise enzimática, lipases, óleo de oliva, óleo de soja

**Área do Conhecimento:** III - Engenharias

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo efetuar um estudo comparativo das propriedades bioquímicas e cinéticas de preparações comerciais de lipases de fontes animal (pancreática) e microbiana (*Candida rugosa*) empregando emulsões preparadas com óleo de soja e azeite de oliva (controle). Foi determinada a influência de diversos parâmetros na atividade lipolítica (pH, temperatura e concentração do substrato), bem como verificada a estabilidade térmica dessas preparações enzimáticas. Os resultados obtidos indicam um deslocamento dos valores de pH ótimos de atuação das lipases na hidrólise do óleo de soja, quando comparado aos valores ótimos alcançados com o substrato controle. No efeito da temperatura foi observado um deslocamento no perfil de atuação das enzimas, neste caso para valores inferiores. Os perfis das curvas de estabilidade térmica sugerem que todas as enzimas testadas foram instáveis para temperaturas superiores a 40°C. A menor velocidade de desnaturação e conseqüentemente um maior tempo de meia-vida foi obtido para a lipase microbiana ambos os substratos. Os parâmetros cinéticos obtidos sugerem que as atividades das lipases em função da concentração de ácidos graxos seguem uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

## Introdução

A produção mundial de óleos e gorduras, estimada em cerca de 90 milhões de toneladas torna essa classe de material importantíssima no contexto econômico internacional [1]. A maior aplicação destina-se ao setor alimentício, no entanto é crescente o interesse de obter-se produtos químicos de maior valor agregado como os ácidos graxos poliinsaturados ( $\omega$  3 e  $\omega$  6) a partir dessas matérias químicas [2]. Esses ácidos graxos poliinsaturados podem influenciar em uma ampla variedade de funções biológicas porque eles são incorporados às membranas celulares, sendo fundamentais na formação de novos tecidos e na prevenção ou tratamento das doenças cardiovasculares além de outras atuações importantes na hipertensão arterial, diabetes, artrites e doenças autoimunes [3].

Um dos primeiros passos para a obtenção de derivados de óleos vegetais é a hidrólise, que conduz a glicerol, mono e diglicerídeos e ácidos graxos. A hidrólise das gorduras é uma reação de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual na velocidade de reação devido a um aumento da solubilidade da água nos glicerídeos. Os quatro principais fatores que afetam esta reação são temperatura, tipo de catalisador, teor de água na fase glicerídeo e a concentração de glicerol na fase aquosa [4]. Esta reação pode ser catalisada por agentes ácidos, básicos ou

enzimas lipolíticas. Os catalisadores ácidos geralmente beneficiam as reações de esterificação, os alcalinos formam sabões que se dissolvem rapidamente na fase glicerídeo incrementando a velocidade de reação, especialmente em altas temperaturas [4] e os enzimáticos promovem a hidrólise de óleos vegetais constituindo uma alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos físico-químicos.

Utilizando as lipases é possível promover esta reação em condições brandas de temperatura e pressão, obtendo-se produtos com baixo custo energético [5]. Devido a sua natureza protéica, as lipases são altamente sensíveis as variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima e do substrato, entre outros. Portanto o maior conhecimento desses parâmetros sobre a reação enzimática permite o melhor emprego das propriedades catalíticas das enzimas nas reações de hidrólise.

O presente trabalho determina as propriedades bioquímicas e cinéticas de três preparações comerciais de lipase, uma de fonte microbiana e duas de origem animal empregando como substrato emulsão de óleo de soja ou azeite de oliva (controle).

## Materiais e Métodos

**Enzima:** Foram testadas três preparações de lipases comerciais, duas de origem de células animais (pancreatina) adquiridas de empresas nacionais Kin Master e Nuclear e uma microbiana *Candida rugosa* (Tipo VII, Sigma).

**Substrato:** Emulsões preparadas com azeite de oliva (controle) ou óleo de soja foram utilizadas como substratos.

**Método de dosagem da atividade enzimática:** A atividade hidrolítica das preparações enzimáticas foi determinada conforme metodologia descrita anteriormente por Soares et al [6]. O substrato foi preparado pela emulsão de 50% do óleo vegetal e 50% de água com a adição de 7% de goma arábica. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M e pH = 7,0 para a lipase microbiana e pH = 8,0 para as lipases pancreáticas) e 1 mL da solução enzimática numa concentração de 5 mg/L. Os frascos foram incubados a 37°C por 5 min, em banho termostaticado com agitação. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos da atividade enzimática foram efetuados pela equação 1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação.

$$U \left( \text{umoles} / \text{mg} \cdot \text{min} \right) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times D}{t \times m} \quad (1)$$

Em que: M = Concentração molar da solução de KOH; m = Massa de enzima (miligramas); t = Tempo de reação (min); V<sub>a</sub> = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V<sub>b</sub> = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL).

**Estudo bioquímico e cinético:** A influência do pH foi verificada em emulsões numa faixa de pH entre 5,0 a 9,0 com incremento de 0,5 e numa temperatura variando de 30 a 60°C. A estabilidade térmica foi determinada por meio da incubação de 1 mL de solução de lipase com concentração de 5 mg/mL numa faixa de temperatura de 37 a 60°C em meio aquoso durante 60 min. Para interromper a reação de inativação, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e em seguida, a atividade residual determinada a 37°C, pela adição de 5 mL de substrato. O efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica

das lipases LCR, LKM e LNU, foi determinada em emulsões preparadas em porcentagens dos óleos (oliva e soja) variando na faixa de 10% a 50% (v/v). Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo para cada preparação de lipase e na temperatura de 37°C.

## Resultados

Os resultados obtidos quanto à influência do pH e temperatura para os dois substratos são sumarizados na Tabela 1. O perfil da estabilidade térmica das preparações enzimáticas é mostrado na Figura 1 (a, b) e as constantes de inativação calculadas são indicadas na Tabela 2. As constantes cinéticas foram calculadas (Tabela 3) a partir dos resultados mostrados na Figura 2 (a,b), empregando o programa computacional EnzymeFitter.

Tabela 1: Influência o pH e da temperatura na atividade enzimática das lipases nos substratos preparados com azeite de oliva e óleo de soja.

	Lipase	Azeite de oliva	Óleo de soja
pH	LCR	7,0	7 – 8,5
	LKM	8,0	8,5
	LNU	8,0	6,5 – 8,5
Temperatura	LCR	37 – 40°C	40°C
	LKM	37 – 45°C	37°C
	LNU	37°C	30°C

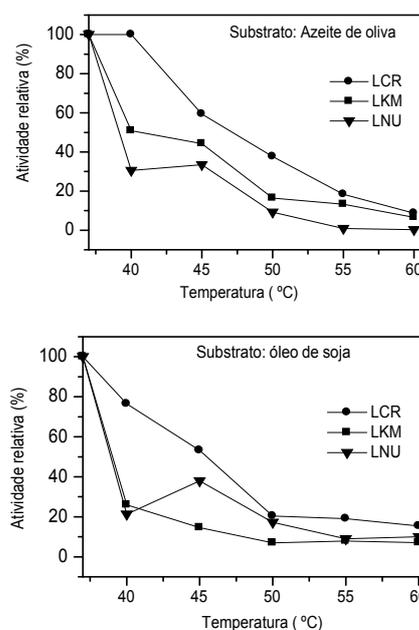


Figura 1: Perfil da estabilidade térmica das enzimas em emulsões preparadas com azeite de oliva ou óleo de soja.

Tabela 2: Constantes de inativação térmica das preparações enzimáticas em emulsão azeite de oliva ou óleo de soja, após incubação por 1h.

Substrato	Temperatura (°C)	Constante de inativação ( $k_d$ , $h^{-1}$ )		
		LCR	LKM	LNU
Azeite de oliva	40	-	0,67	1,18
	45	0,52	0,83	1,10
	50	0,98	1,81	2,38
	55	1,69	2,02	4,07
	60	2,45	2,79	5,16
Óleo de soja	40	-	1,35	-
	45	0,63	1,93	0,97
	50	1,59	2,66	1,75
	55	1,66	2,54	2,41
	60	1,87	2,64	2,30

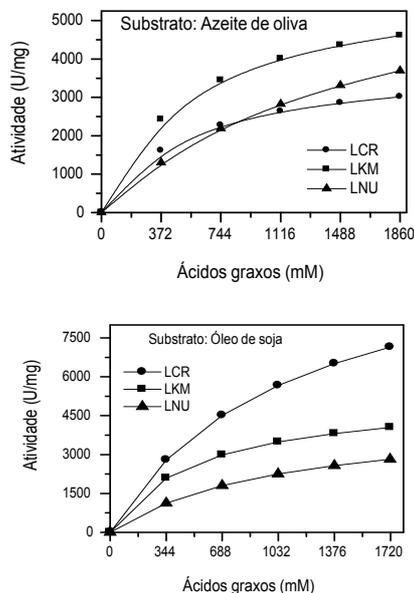


Figura 2: Perfil da atividade hidrolítica das lipases LCR, LKM e LNU em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões azeite de oliva ou óleo de soja.

Tabela 3: Valores das constantes cinéticas para as preparações de lipase em emulsões preparadas com azeite de oliva ou óleo de soja.

Substrato	Lipase	Constantes Cinéticas	
		$k_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)
Azeite de oliva	LCR	518,32	3854
	LKM	538,53	5939
	LNU	1574,69	6817
Óleo de soja	LCR	1101,00	11728
	LKM	520,57	5255
	LNU	1035,24	4513

## Discussão

A caracterização das propriedades catalíticas das preparações de lipases foi uma etapa preliminar importante, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos diversos fabricantes são determinados por diferentes metodologias, sendo, portanto, necessário estabelecer as faixas ótimas de utilização de cada preparação nos dois substratos.

Os valores de pH ótimo de atuação das lipases empregando o óleo de soja foram deslocados para valores de pH mais alcalino quando comparado ao perfil obtido com o azeite de oliva (controle). O mesmo comportamento não foi verificado com relação a influência da temperatura. Para a lipase LNU foi observado um decréscimo de 7°C na temperatura ótima para o substrato óleo de soja e para as lipases LCR e LKM foram obtidos valores similares de atividade enzimática em função da temperatura.

As atividades residuais das enzimas LCR, LKM e LNU, após tratamento térmico por 1h indicam que todas as preparações de lipases testadas são termicamente instáveis acima de 40°C. O comportamento da lipase LCR e LNU foi muito similar nos dois substratos analisados. No perfil da lipase LKM foi observado uma velocidade de desnaturação mais acentuada para o substrato óleo de soja.

Os valores das constantes cinéticas para cada preparação de enzima nos dois substratos testados mostram que a lipase LCR é a preparação enzimática que apresenta maior afinidade pelo substrato azeite de oliva, enquanto a lipase LKM apresenta maior afinidade pelo óleo de soja. A LNU foi a preparação de lipase que apresentou menor afinidade por ambos substratos. O valor de  $k_m$  determinado para a LNU foi da ordem 3,0 vezes menor que a LCR e LKM nos substratos azeite de oliva e óleo de soja, respectivamente.

A partir desses resultados selecionou-se a enzima LKM para efetuar a hidrólise enzimática do óleo de soja visando a obtenção de ácidos graxos poliinsaturados.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro recebido da CAPES e CNPq.

## Referências

[1] GUNSTONE, F. D.; Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* . v. 79, p. 1535 – 1549, 1999.

[2] CASEY, J.; MACRAE, A.; Biotechnology and the oleochemical industry. *Inform*, 3 (2): p. 203-207, 1992.

[3] SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances* . v. 19, p. 627-662, 2001.

[4] DIECKELMANN, G.; HEINZ, H.J.; The basics of oleochemistry. *A comprehensive survey of selected technologies based on natural oils and fats*, p.13-37, 177 -180, 1988.

[5] GANDHI, N.N.; Application of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* , v. 74, p. 621, 1997.

[6] SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica, *Applied Biochemistry and Biotechnology* . v.77-79, p. 745-757, 1999.