



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

**Purificação e Caracterização de Lipase de *Rhizopus* sp.
e sua Aplicação na Síntese de Monoacilgliceróis**

Maria Gabriela Bello Koblitz, MSc.

Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos

Sob orientação da prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore

Campinas, setembro de 2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

K798p Koblitz, Maria Gabriela Bello
Purificação e caracterização de lípase de *Rhizopus* sp. E sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis / Maria Gabriela Bello Koblitz. – Campinas: [s.n.], 2003.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lípase. 2.Purificação. 3.Enzimas – Síntese. I.Pastore, Gláucia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora

Dr^a. Gláucia M. Pastore
Orientadora

Dr^a. Helena T. de Godoy
Examinadora

Dr^a. Gabriela A. Macedo
Examinadora

Dr^a. Margarida M. Yamaguchi
Examinadora

Dr. Renato Grimaldi
Examinador

Dr^a. Jane G. M. Snow
Examinadora

Dr. Yong K. Park
Examinador

Dedico este trabalho ao meu marido, Flávio.

Agradecimentos

A Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Pastore por tudo o que ela fez por mim.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Ciência de Alimentos pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas valiosas correções e sugestões.

Aos amigos, funcionários e aos professores dos laboratórios de Bioquímica de Alimentos e de Bioaromas pela ajuda e companheirismo.

Aos professores responsáveis, funcionários, alunos e estagiários dos laboratórios de Carotenóides (DCA), Química de Alimentos (DCA), Tecnologia de Óleos e Gorduras (DTA), Microbiologia de Alimentos (DCA), Frutas, Hortaliças e Produtos Açucarados (DTA) e de Controle de Qualidade (DEPAN), Análise de Alimentos (DCA), sem os quais este trabalho não teria sido possível.

A Prof^ª. Dr^ª. Carmem Veríssimo e aos professores, funcionários e alunos dos laboratórios de Bioquímica (IB) e Química de Proteínas (IB), pela orientação na purificação de enzimas.

Aos meus amigos queridos: Maria Eugênia, Denise, Mariana, Cristina, Márcia, Severino, Margarida, Luciana Liboni, Luciana Ferracini, Bia, Edinho, Ana Maria, Ezequias, Ana Paula, Antônio, Hermelinda, Mareci, Eliane, Cleber, Neiva, Rodrigo, Gisele, Carol, Quinho, Vítor, por tornarem estes últimos anos muito mais alegres.

Aos meus pais Arthur e Gilda e aos meus sogros Armando e Lucy, aos meus irmãos Ana e Pedro e ao meu avô Arnold por todo o carinho e apoio.

Ao meu marido Flávio, por tudo.

Índice Analítico

RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
LIPASE	7
<i>Resumo</i>	7
<i>Abstract</i>	7
<i>Introdução</i>	8
<i>Considerações gerais sobre lipases</i>	9
<i>Aplicações industriais de lipases</i>	12
<i>Purificação de lipases</i>	18
<i>Modificações de lipases</i>	21
<i>Conclusão</i>	24
<i>Referências Bibliográficas</i>	25
PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS POR VIA ENZIMÁTICA	33
<i>Resumo</i>	33
<i>Abstract</i>	33
<i>Introdução</i>	34
<i>Obtenção de monoacilgliceróis por via enzimática</i>	35
<i>Conclusão</i>	40
<i>Referências Bibliográficas</i>	41
PARTE II – ESTUDO PARA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	
BIOQUÍMICA DA LIPASE DE <i>RHIZOPUS</i> SP.	45
PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR LIPASE	
PRODUCED BY A NEW STRAIN OF <i>RHIZOPUS</i> SP.	47
<i>Abstract</i>	47
<i>Introduction</i>	48

<i>Material and Methods</i>	48
<i>Results and Discussion</i>	51
<i>Conclusion</i>	62
<i>References</i>	62
PURIFICAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE <i>RHIZOPUS</i> SP. POR DOIS DIFERENTES MÉTODOS	
CROMATOGRÁFICOS	65
<i>Resumo</i>	65
<i>Abstract</i>	65
<i>Introdução</i>	67
<i>Material e Métodos</i>	68
<i>Resultados e Discussão</i>	70
<i>Conclusão</i>	84
<i>Referências Bibliográficas</i>	85
PARTE III – ESTUDO DA APLICAÇÃO DA LIPASE DE <i>RHIZOPUS</i> SP. NA	
OBTENÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS	87
ESTUDO DA OBTENÇÃO MONOACILGLICERÓIS POR SÍNTESE E GLICERÓLISE UTILIZANDO	
LIPASE DE <i>RHIZOPUS</i> SP.	89
<i>Resumo</i>	89
<i>Abstract</i>	89
<i>Introdução</i>	90
<i>Material e Métodos</i>	90
<i>Resultados e Discussão</i>	93
<i>Conclusão</i>	97
<i>Referências Bibliográficas</i>	97
CONTRIBUIÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA	
SÍNTESE DE MONOACILGLICERÓIS CATALISADA POR LIPASE PARCIALMENTE PURIFICADA	
DE <i>RHIZOPUS</i> SP.	99
<i>Resumo</i>	99
<i>Abstract</i>	99
<i>Introdução</i>	100
<i>Material e Métodos</i>	101

<i>Conclusão</i>	110
<i>Referências Bibliográficas</i>	110
CONCLUSÃO	112
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	114
ANEXO	115
CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	115
<i>Monoacilglicerol</i>	115
<i>Diacilglicerol</i>	115

Índice de Tabelas

Parte I

Capítulo 1 - Lipases

Tabela 1: Seletividade de lipases de diferentes fontes segundo Xu	12
Tabela 2: Efeito das formas enantioméricas das drogas	16
Tabela 3: Aplicações industriais de lipases	17
Tabela 4: Pré-purificação de lipases segundo Palekar <i>et al.</i>	18
Tabela 5: Etapas cromatográficas utilizadas para purificação de lipases de diferentes fontes	20

Parte II

Capítulo 3 - Purification and Biochemical Characterization of Extracellular Lipase Produced by a New Strain of *Rhizopus* sp.

Table 1: Summary of the purification of lipase from <i>Rhizopus</i> sp.	53
Table 2: Specificity of lipase from <i>Rhizopus</i> sp in respect of various lipids.	60
Table 3: Effect of different compounds on the activity of the purified lipase	61
Table 4: Stability of the purified lipase in different organic solvents	62

Capítulo 4 - Purificação Parcial da Lipase de *Rhizopus* sp. por Dois Diferentes Métodos Cromatográficos

Tabela 1 Planilha de ensaios69
Tabela 2: Resumo da purificação por DEAE *Sepharose*73
Tabela 3: Resumo da purificação por FENIL *Sepharose*73

Parte III

Capítulo 5 - Estudo da Obtenção Monoacilgliceróis por Síntese e Glicerólise Utilizando Lipase de *Rhizopus* sp.

Tabela 1: Resultados obtidos para produção de monoacilgliceróis por diferentes métodos 96

Capítulo 6 - Contribuição do Planejamento Experimental de Superfície de Resposta para Síntese de Monoacilgliceróis Catalisada por Lipase Parcialmente Purificada de *Rhizopus* sp.

Tabela 1: Planilha de ensaios101
Tabela 2: Conversão para monoacilgliceróis e para diacilgliceróis após 12 horas de reação107
Tabela 3: Conversão para monoacilgliceróis e para diacilgliceróis após 36 horas de reação107
Tabela 4: conversão para monoacilgliceróis ao longo do tempo e na presença de hexano109

Índice de Figuras

Parte I

Capítulo 1 - Lipases

Figura 1: Reações catalisadas por lipases segundo Villeneuve *et al.* (2000) e Gatfield (1997).....10

Capítulo 2 - Produção de Monoacilgliceróis por Via Enzimática

Figura 1. Desenho esquemático das reações catalisadas por lipase para obtenção de monoacilgliceróis: (I) Hidrólise; (II) Esterificação com ácido graxo ou (III) éster e (IV) Glicerólise. Segundo Bornscheuer35

Figura 2. Desenho esquemático da síntese de monoacilgliceróis a partir de glicerol protegido e éster do ácido graxo. Segundo Bornscheuer39

Parte II

Capítulo 3 - Purification and Biochemical Characterization of Extracellular Lipase Produced by a New Strain of *Rhizopus* sp.

Figure 1: Chromatography of lipase from *Rhizopus* sp on Q *Sepharose*52

Figure 2: Chromatography of lipase from *Rhizopus* sp on *Sephacryl* S20052

Figure 3: SDS-PAGE of *Rhizopus* sp lipase at various stages of purification. Lane A: molecular weight markers; lane B: crude extract; lane C: Q *Sepharose*; lane D: *Sephacryl* S200.....53

Figure 4: Molecular mass regression curve for *Sephacryl* S200 column. Black spot corresponds to *Rhizopus* sp. lipase. Other spots correspond to standards.55

Figure 5: Isoelectric point of both isoenzymes from *Rhizopus* sp. lipolytic fraction.55

Figure 6: HPLC chromatogram for the purified lipolytic fraction produced by *Rhizopus* sp.....57

Figure 7: Effect of pH on the activity and stability of lipase from *Rhizopus* sp.58

Figure 8: Effect of temperature on the activity and stability of lipase from *Rhizopus* sp. ...58

Figure 9: Graphic method of Michaelis & Menten for the calculation of V_{max} and K_m59

Figure 10: Graphic method of Lineweaver & Burk for the calculation of V_{max} and K_m59

Figure 11: Activity of *Rhizopus* sp. lipase against different synthetic triacylglycerols.60

Capítulo 4 - Purificação Parcial da Lipase de *Rhizopus* sp. por Dois Diferentes Métodos Cromatográficos

Figura 1: Cromatograma obtido para purificação por DEAE *Sepharose*70

Figura 2: Cromatograma obtido para purificação por e FENIL *Sepharose*70

Figura 3: Eletroforese em gel de SDS-PAGE – amostras: enzima bruta (linha A); DEAE *Sepharose* (linha B); FENIL *Sepharose* (linha C)71

Figura 4: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em coluna de DEAE *Sepharose* – pH e temperatura ótimos75

Figura 5: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em coluna de FENIL *Sepharose* - pH e temperatura ótimos77

Figura 6: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em colunas de FENIL <i>Sepharose</i> – pH e temperatura de estabilidade	79
Figura 7: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em coluna de DEAE <i>Sepharose</i> – pH e temperatura de estabilidade	81
Figura 8: Efeito da temperatura sobre a atividade e a estabilidade da enzima	83
Figura 9: Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da enzima	83
Parte III	
Capítulo 5 - Estudo da Obtenção Monoacilgliceróis por Síntese e Glicerólise Utilizando Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	
Figura 1: Placas de CCD para os diferentes tipos de reação.	93
Figura 2: cromatograma obtido para amostra Síntese 24h (A: Tri; B: Di; C: Mono; D: Ác. Graxo; E: Glicerol).	95
Figura 3: cromatograma obtido para amostra Glicerólise 24h (A: Tri + Di; B: Mono; C: Ác. Graxo; D: Glicerol).	95
Capítulo 6 - Contribuição do Planejamento Experimental de Superfície de Resposta para Síntese de Monoacilgliceróis Catalisada por Lipase Parcialmente Purificada de <i>Rhizopus</i> sp.	
Figura 1: Superfície de resposta e tabela ANOVA para a síntese de monoacilgliceróis após 12 horas de reação.	103
Figura 2: Superfície de resposta e tabela ANOVA para a síntese de monoacilgliceróis após 36 horas de reação.	105

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo purificar e caracterizar a fração lipolítica produzida por linhagem de *Rhizopus* sp. e aplicar a lipase na produção de monoacilgliceróis. Apenas três etapas de purificação foram necessárias para se atingir a homogeneidade em SDS-PAGE, obtendo-se uma banda com massa molecular de 37,5KDa e atividade específica de 1446U/mg de proteína. A fração purificada continha 2 isoformas da lipase, ambas com temperatura ótima de atividade de 50°C, valores para pH ótimos de 5,6 e 7,0, pI de 4,3 e 4,5 e estabilidade a valores de pH entre 6,5 e 7,5 e a temperaturas inferiores a 50°C, além de manter sua atividade em hexano. A lipase foi inativada por Hg⁺² e por n-bromosuccinimida e ativada por Na⁺. Os estudos de purificação por diferentes métodos cromatográficos mostraram que, embora a lipase seja mais seletivamente retida por coluna de troca aniônica, ela perde parte de sua atividade no processo, o que não acontece em colunas de interação hidrofóbica. A lipase purificada por coluna de FENIL *Sepharose* apresentou faixa mais larga de pH de atividade, podendo variar entre 3,5 e 9,0, dependendo da temperatura de reação, porém menor estabilidade térmica do que a fração purificada por DEAE *Sepharose*. Entre os métodos testados, a síntese se mostrou mais promissora para obtenção de monoacilgliceróis. Após planejamento estatístico multivariável verificou-se que a remoção de água do meio reacional é fator preponderante para conversão e que a enzima testada utiliza tanto glicerol quanto monoacilgliceróis como substratos para síntese, o que torna indispensável a separação do produto do meio reacional para obtenção de taxas de conversão satisfatórias.

Palavras-chave: lipase, *Rhizopus* sp., purificação, caracterização bioquímica, monoacilgliceróis, síntese enzimática.

Abstract

The aim of the present study was the purification and characterization of the lipolytic fraction secreted by a strain of *Rhizopus* sp. and to apply this lipase to the production of monoacylglycerols. Only 3 steps of purification were necessary to achieve SDS-PAGE homogeneity. One band with 37.5 KDa molecular mass and with 1446 U/mg specific activity was obtained. The purified fraction presented 2 lipase isoforms; both showed optimum activity at 50°C, but at pH values of 5.6 and 7.0 and isoelectric points of 4.3 and 4.5. The lipase was stable between 6.5 and 7.5 pH values and at temperatures below 50°C and also kept its activity in hexane. The lipase was inactivated by Hg⁺² and by n-bromosuccinimide and activated by Na⁺. The studies on purification by different chromatographic methods showed that, although the lipase is more selectively retained by the anionic exchange column, it loses part of its activity in the process, which does not happen in the hydrophobic interaction column. The lipase purified by the PHENYL Sepharose column showed activity in a larger pH range, that could vary from 3.5 to 9.0 depending on the reaction temperature, but also showed lower thermal stability when compared to the fraction purified by DEAE Sepharose column. Among the methods tested, the synthesis seemed to be the most promising for the production of monoacylglycerols. After the experimental design assays it could be verified that water removal from the reaction medium is a preponderant factor for the conversion and that the enzyme tested uses glycerol but also monoacylglycerol as synthesis substrate, what makes the separation of the product from the reaction medium indispensable for obtaining satisfactory conversion rates.

Keywords: lipase, *Rhizopus* sp., purification, biochemical characterization, monoacylglycerols, enzymatic synthesis.

Introdução

Lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Beisson *et al.* 2000). Estas enzimas, encontradas em tecidos animais, vegetais e em microorganismos, têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reserva energética e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve *et al.* 2000).

Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial de enzimas lipolíticas têm sido bastante estudados e, nos últimos anos, a pesquisa sobre lipases tem sido intensificada devido principalmente a três motivos:

Por serem enzimas que apresentam uma forma de ação incomum – são solúveis em água mas catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos - a estrutura molecular das lipases, muitas vezes composta por uma “tampa” que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima, tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa (Schmidt e Verger 1998);

Lipases apresentam grande relevância médica, principalmente em relação à arterosclerose e a hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação – ácidos graxos livres e diacilgliceróis – têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular (Farooqui *et al.*, 1987);

A descoberta, relativamente recente, da capacidade das lipases de catalisar reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos abriu inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais (Klibanov 1989).

Monoacilgliceróis são as substâncias emulsificantes mais empregadas nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (Bornscheuer 1995). Isto se deve à sua grande versatilidade, uma vez que o tamanho da cadeia carbônica define o balanço hidrofóbico/hidrofílico do surfactante, e também à sua atividade bacteriostática

(principalmente daqueles formados por ácidos graxos de cadeia média) (Conley e Kabara 1973; Petchow *et al.* 1996). Em alimentos, propriedades nutricionais se unem às propriedades funcionais dos monoacilgliceróis. Um bom exemplo está no uso de monoacilgliceróis formados por ácidos graxos poliinsaturados que têm absorção imediata no intestino humano, quando estes estão ligados à posição 2 no glicerol (Li e Ward 1993). Além disso, monoacilgliceróis podem ser utilizados como base para síntese de triacilgliceróis estruturados (Irimescu *et al.* 2001), fosfolipídios, glicolipídios e lipoproteínas (Waldinger e Schneider 1996) e são aplicados como carreadores de drogas na forma de conjugados (Paris *et al.* 1980).

Atualmente, a produção de monoacilgliceróis é realizada através de métodos químicos envolvendo a direta esterificação entre glicerol e ácidos graxos ou a chamada glicerólise, que consiste na alcoólise envolvendo triacilgliceróis e glicerol. Estes processos dependem do uso de altas temperaturas (170°C-250°C), da presença de catalisadores alcalinos (KOH ou NaOH, 0,05 – 0,2%), atmosfera de nitrogênio e excesso molar de glicerol (Tüter e Aksoy, 2000). A aplicação de temperaturas elevadas gera subprodutos com características indesejadas tais como cor escura, odor desagradável e sabor de queimado (McNeil e Yamane 1991). Além disso, independente do processo utilizado, o rendimento em monoacilgliceróis é baixo, variando de 35% a 60% no máximo (Rosu *et al.*, 1997). Em virtude disso o produto obtido deve, obrigatoriamente, passar por etapas de purificação para remoção dos subprodutos e obtenção de um produto final com cerca de 90% de pureza, padrão exigido para uso em alimentos e fármacos, uma vez que a presença de outros glicerídeos reduz bastante a capacidade emulsificante do produto (McNeil *et al.* 1990).

Como alternativa ao processo convencional, a síntese enzimática – envolvendo lipases – apresenta diversas vantagens pois, dependendo da metodologia e da enzima aplicadas, pode garantir maiores rendimentos em reações a temperaturas próximas da ambiente, o que proporciona produtos de qualidade superior, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (Rosu *et al.* 1997).

Objetivos

1. Purificar e caracterizar a fração lipolítica extracelular produzida por linhagem de *Rhizopus* sp. isolada no Laboratório de Bioaromas (DCA/FEA/UNICAMP).
2. Aplicar a lipase de *Rhizopus* sp. na produção de monoacilgliceróis.

Parte I – Revisão Bibliográfica

Capítulo 1

Lipases

Capítulo 2

Produção de Monoacilgliceróis por Via Enzimática

LIPASE

RESUMO

Lipases são enzimas largamente distribuídas na natureza que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras. Os aspectos biológicos, fisiológicos e de aplicação industrial destas enzimas vêm sendo bastante estudados devido à sua ação sobre substratos insolúveis em água, à sua importância no metabolismo celular e à possibilidade de utilização de lipases em diferentes processos nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica, entre outras. Este trabalho apresenta uma visão geral sobre a estrutura e as características de algumas lipases, suas principais aplicações, metodologias para sua purificação e as técnicas desenvolvidas para sua modificação.

PALAVRAS-CHAVE: enzima, lipase, aplicação industrial, purificação, modificações físicas, químicas e genéticas

ABSTRACT

LIPASES. Lipases are widely distributed enzymes which catalyse the hydrolysis of fats and oils. The physiological, biological and industrial application aspects of these enzymes have been largely studied due to their action on water insoluble substrates, to their importance in cellular metabolism and to the possibility of their application in various processes in food, chemical and drug industries, among others. This paper presents an overview of the structure and characteristics of some lipases, their main applications, purification strategies and modification techniques.

KEYWORDS: enzyme, lipase, industrial applications, physical, chemical and genetic modifications

INTRODUÇÃO

Lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Beisson *et al.* 2000). Estas enzimas, encontradas em tecidos animais, vegetais e em microorganismos, têm papel fundamental no metabolismo de lipídeos destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reserva energética e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve *et al.* 2000).

Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial de enzimas lipolíticas têm sido bastante estudados e, nos últimos anos, a pesquisa sobre lipases tem sido intensificada devido principalmente a três motivos:

Por serem enzimas que apresentam uma forma de ação incomum – são solúveis em água mas catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos - a estrutura molecular das lipases, muitas vezes composta por uma “tampa” que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima, tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa (Schmidt e Verger 1998);

Lipases apresentam grande relevância médica, principalmente em relação à arterosclerose e a hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação – ácidos graxos livres e diacilgliceróis – têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular (Farooqui *et al.* 1987);

A descoberta, relativamente recente, da capacidade das lipases de catalisar reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos abriu inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais (Klibanov 1989).

Este capítulo tem por finalidade reunir informações sobre a aplicação industrial, estratégias de purificação e modificações de lipases, principalmente de origem microbiana, publicadas nos últimos anos.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LIPASES

Classificação e estrutura

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (EC 3.1.1.3). Os triacilgliceróis (principais componentes de óleos e gorduras) são seus substratos naturais com conseqüente liberação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos (Borgston 1984). Independente de diferenças na massa molecular, na seletividade de substratos, na resposta a ativadores e inibidores, etc., a grande maioria das lipases apresenta estrutura similar composta por diversas estruturas β -pregueadas em paralelo (pelo menos 5) separadas por trechos de α -hélices, com peptídeos helicoidais cobrindo boa parte de sua superfície (Schrag e Cygler 1997).

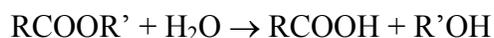
Diferentes graus de homologia na estrutura primária são encontrados em lipases, entretanto, uma seqüência é excepcionalmente bem conservada: o pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly. O grau de conservação desta seqüência e a perda de atividade de lipases que tem o resíduo de serina modificado ou suprimido são fortes indicadores de que este trecho esteja localizado no sítio catalítico destas enzimas.

Além disso, a conformação tridimensional deste pentapeptídeo também é importante para catálise. Em geral ele se arranja formando um “cotovelo” em ângulo bem agudo, o que só é alcançado quando os resíduos localizados nas posições -2 e +2 em relação ao resíduo de serina tem substituições pequenas, isto explica a constante presença de glicina nestas posições. Além destes aminoácidos, estão presentes em muitos casos, no sítio catalítico das lipases, resíduos de histidina e de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico. Nas lipases o sítio ativo fica localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica que pode ser superficial ou profunda, de acordo com a homologia a que pertencem. Nesta cavidade se aloja o ácido graxo de modo a posicionar a ligação éster alinhada com o sítio ativo. Esta cavidade é geralmente protegida por uma “tampa” polipeptídica que se abre, expondo o sítio ativo, quando a lipase se encontra na interface polar/apolar. Isto explica porque a grande maioria das lipases tem sua atividade muito aumentada na interface óleo/água, sobre substratos insolúveis, ao contrário das esterases (Brady *et al.* 1991 e Derewenda 1994).

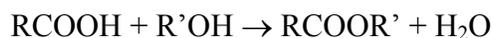
Reações catalisadas por lipases

A função biológica das lipases é hidrolisar ésteres, especialmente triglicerídeos. No entanto, lipases também são capazes de catalisar reações de síntese dependendo, para isso, de baixa atividade de água no meio reacional.

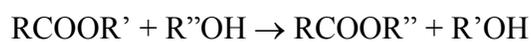
Hidrólise



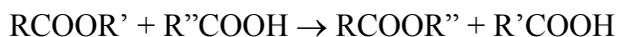
Esterificação



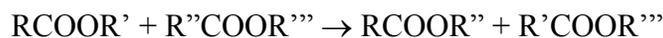
Alcoólise



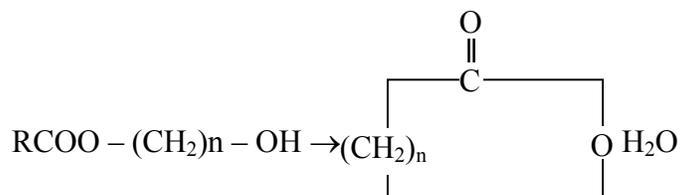
Acidólise



Transesterificação



Lactonização



Aminólise ou síntese de amidas

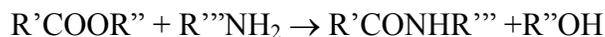


Figura 1: Reações catalisadas por lipases segundo Villeneuve *et al.* (2000) e Gatfield (1997).

Fontes e propriedades gerais de lipases

Lipases são produzidas por virtualmente todos os seres vivos, podendo ser encontradas em células e secreções de animais, vegetais e de diferentes microorganismos (bactérias, fungos e leveduras) (Borgston 1984). Embora a lipase mais estudada até hoje

seja a lipase pancreática, do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são bem mais interessantes pois permitem produção em maior escala e podem mais facilmente ser expressas, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Palekar *et al.* 2000). Além disso, devido à enorme variedade de microorganismos existentes há também uma grande gama de lipases com características diferenciadas de atuação. Há ainda a possibilidade de se induzir a produção de lipases em alguns microorganismos de acordo com a composição do meio fermentativo. Em geral a produção de lipases é inibida na presença de açúcares simples (glicose, frutose) ou glicerol e é estimulada por meios contendo ácidos graxos livres, óleos e gorduras ou polissacarídeos complexos (Macrae e Hammond 1985).

A maior vantagem do uso de lipases em relação a reações químicas convencionais reside no fato dessas enzimas apresentarem sempre algum tipo de seletividade entre as listadas a seguir:

Regioseletividade – de acordo com esta propriedade as lipases podem ser classificadas em (Sonnet 1988):

- Lipases não específicas: hidrolisam ésteres primários e secundários, isto é, liberam ácidos graxos ligados às posições 1[3] e 2 dos triglicerídeos.
- Lipases 1,3 específicas: hidrolisam apenas ésteres primários, isto é, na posição 1[3] dos triglicerídeos. É possível se atingir hidrólise total de triglicerídeos com uso destas enzimas pois o grupo acil ligado à posição 2 em diglicerídeos sofre isomerização para a posição 1[3].

Não são conhecidas lipases 2-específicas porém relatos recentes mostram que certas lipases apresentam algum grau de preferência por esta posição em detrimento das outras duas como por exemplo a lipase A de *Candida antarctica* (Xu 2000).

Seletividade de substrato: grande parte das lipases apresenta a propriedade de hidrolisar preferencialmente um determinado grupo de substratos, em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (Pederson e Holmer 1995). O caso mais clássico é o da lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente ligações éster envolvendo ácidos graxos de cadeia longa, insaturados na posição 9 (Bertolini *et al.* 1995).

Na Tabela 1 estão relacionadas algumas lipases e suas seletividades.

Tabela 1: Seletividade de lipases de diferentes fontes segundo Xu (2000).

Fonte da lipase	Seletividade de substrato	Regioseletividade
<i>Aspergillus niger</i>	C,M,L	1,3>>2
<i>Candida lipolytica</i>	C,M,L	1,3>2
<i>Humicola lanuginosa</i>	C,M,L	1,3>>2
<i>Mucor javanicus</i>	M,L>>L	1,3>2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C>M,L	1>3>>2
Pancreática	C>M,L	1,3
Pré-gástrica	C,M>>L	1,3
<i>Penicillium roquefortii</i>	C,M>>L	1,3
<i>Rhizopus delemar</i>	M,L>>C	1,3>>2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Rhizopus niveus</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M,L>C	1,3>>>2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M,L>C	1,3>2
<i>Pseudomonas</i> sp.	C,M,L	1,3>2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C,M>L	1,3

C, ácidos graxos de cadeia curta; M, cadeia média; L, cadeia longa

Enantioseletividade: algumas lipases apresentam a propriedade de reagir em diferentes velocidades com dois enantiômeros gerando, depois de determinado tempo de reação, um excesso enantiomérico que possibilita a resolução de racematos e a obtenção de compostos opticamente puros. Alguns autores atribuem esta propriedade das lipases ao fato de serem as enzimas constituídas apenas por L-aminoácidos o que as tornaria catalisadores quirais (Margolin 1996; Kamiya *et al.* 1995; Enzelberge *et al.* 1997).

APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE LIPASES

Devido à grande variedade de reações que catalisam, as lipases têm inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, química, farmacêutica e em muitas outras. Entre as vantagens que o uso de lipases apresenta sobre os processos químicos convencionais estão (Xu 2000; Poroske 1984):

- alta eficiência em condições de baixas temperaturas e pressão atmosférica;
- reduzida poluição ambiental;

- produtos originados de reações enzimáticas são considerados “naturais” pela legislação da maioria dos países;
- lipases apresentam vários graus de seletividade, ao contrário dos catalisadores convencionais, gerando menos produtos secundários e reduzindo a necessidade de purificação.

Atualmente o maior empecilho ao uso de lipases em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador, entretanto os recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de modificação e imobilização de lipases têm grande possibilidade de mudar este quadro num futuro próximo (Gandhi 1997).

Produção de óleos e gorduras estruturados

Óleos e gorduras estruturados são produtos que contêm triglicerídeos sintetizados artificialmente com o objetivo de alterar as concentrações relativas de seus ácidos graxos constituintes assim como a posição, no esqueleto de glicerol, que cada grupo acil ocupa. Este tipo de produto apresenta vantagens do ponto de vista funcional e/ou nutricional sobre os óleos e gorduras naturais. A obtenção de triglicerídeos estruturados é feita através de interesterificação química ou enzimática entre dois diferentes óleos ou entre óleo e ácidos graxos livres ou na forma metilada. A síntese química, embora seja uma tecnologia há muito dominada pela indústria, apresenta várias desvantagens em relação ao processo enzimático: obtenção de produtos inespecíficos, uso de altas temperatura e pressão – o que gera subprodutos de cor e odor indesejáveis e implica em várias etapas de purificação subseqüentes. O uso de enzimas 1,3-específicas garante a obtenção de produtos específicos de acordo com os substratos utilizados o que vem a ser de grande importância na aplicação funcional e nutricional dos triglicerídeos estruturados (Iwasaki e Yamane 2000; Quinlan e Moore 1993).

O caso mais clássico de obtenção de triglicerídeos estruturados é o da produção de equivalentes de manteiga de cacau. Esta gordura vegetal tem características funcionais específicas (principalmente ponto de fusão) extremamente interessantes para aplicação em alimentos. A instabilidade dos preços e do fornecimento deste produto no mercado internacional levou ao interesse na produção artificial do mesmo. A manteiga de cacau é constituída principalmente pelos seguintes triglicerídeos: POP, POSt e StOSt (P=palmitico;

O=oléico; St=esteárico), que juntos correspondem a quase 80% da composição da gordura (Shukla 1996). Partindo-se de um óleo que contenha principalmente ácido oléico na posição 2 é possível, na presença de lipases 1,3-específicas mimetizar esta composição com bastante sucesso (Rozendaal e Macrae 1997).

Estudos recentes sobre a absorção de ácidos graxos pelo intestino humano, principalmente de lactentes, levaram à conclusão que ácidos graxos de cadeia longa, tanto saturados quanto insaturados, são mais prontamente absorvidos quando na forma de monoglicerídeos (Jensen e Jensen 1992; Winter *et al.* 1993). Uma vez que a lipase pancreática é uma lipase 1,3-específica, equivalentes de gordura do leite humano (ricos em ácido palmítico) e óleos com fins terapêuticos (contendo ácidos graxos essenciais e poliinsaturados) devem ser sintetizados de modo a conter estes ácidos graxos na posição 2 do triglicerídeo e grupos acil de cadeia média ou curta (mais facilmente absorvidos na forma livre) nas posições 1 e 3 (Innis 1992). Alguns óleos e gorduras estruturados já estão disponíveis comercialmente, um exemplo é o Betapol®, marca comercial da Unilever para um equivalente da gordura de leite humano com valor nutricional muito próximo ao natural e que é produzido com tecnologia enzimática (Xu 2000).

Outros produtos que podem ser obtidos por interesterificação de óleos e gorduras são as margarinas produzidas sem hidrogenação e portanto livres de ácidos graxos trans e de resíduos de catalisadores metálicos (Zhang *et al.* 2000).

Síntese de surfactantes

Surfactantes não iônicos como monoglicerídeos e ésteres de açúcar encontram extensa aplicação na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos não apenas por sua eficiência como agentes tensoativos mas também por seu caráter atóxico e por sua ação como agentes conservantes (Bornscheuer 1995; Hill e Rhode 1999; Thomas *et al.* 1998; Petchow *et al.* 1996). Sua produção por via química não é muito satisfatória pois a presença de catalisadores alcalinos e a alta temperatura de reação provocam a formação de produtos secundários indesejados. Além do custoso processo de purificação, a produção destes surfactantes por via química apresenta baixo rendimento (em torno de 30%) (Bornscheuer 1995).

A produção por via enzimática de monoglicerídeos pode ser alcançada tanto por hidrólise parcial de triglicerídeos usando-se lipases 1,3-específicas - neste caso a maior

dificuldade consiste em se evitar a isomerização dos grupos acil da posição 2 para a posição 1[3], quanto por esterificação do glicerol com ácidos graxos livres ou por glicerólise – neste caso são duas as dificuldades a serem contornadas: a eficiente homogenização dos substratos e a remoção de água do meio reacional. Vários processos já foram propostos neste sentido, alguns alcançando rendimentos de até 90% em monoglicerídeos (Kwon *et al.* 1995; McNeil *et al.* 1990, 1991).

Para a produção de ésteres de açúcar que, por via enzimática, é alcançada por esterificação entre o poliálcool e ácidos graxos ou suas formas metiladas, também foram propostos diferentes processos enzimáticos envolvendo modificações dos reagentes para melhor homogenização do meio reacional (Heo *et al.* 2000; Adelhors *et al.* 1990; Cao *et al.* 1996; Björkling *et al.* 1989).

Alimentos

Lipases encontram utilidade em diferentes áreas da indústria de alimentos:

Na indústria de laticínios, lipases, em conjunto com proteases, são utilizadas na aceleração da maturação de queijos melhorando a textura e o aroma destes produtos (Kinsella e Hwang 1976; Sod e Kosikowski 1979; Farahat *et al.* 1990). Da mesma forma, na indústria de chocolates e caramelos a liberação de ácidos graxos pela adição de lipases melhora o aroma do produto final.

Na panificação a adição de lipases a massas de pães e bolos aumenta a capacidade de retenção de ar e o aroma além de retardar a sinerese, aumentando a vida de prateleira (Gandhi 1997).

No processamento de carnes e pescados lipases são utilizadas na remoção de gordura (produção de “fat-free meats”) e na melhoria do aroma de produtos embutidos (Wiseman 1975).

O uso de lipases sobre a clara de ovo provoca aumento de sua capacidade emulsificante (Gatfield e Holzminden 1995).

Além da aplicação direta no processamento, a indústria de alimentos se beneficia também da produção de aditivos por lipases. Entre eles estão os óleos e gorduras estruturados e os surfactantes citados acima e também ésteres do aroma produzidos por síntese enzimática. Vale lembrar que aditivos produzidos por via enzimática recebem o rótulo “natural” de acordo com a legislação de muitos países o que é um importante atrativo

para consumidores de alimentos em todo o mundo. Os ésteres de ácidos carboxílicos são importantes componentes do aroma de vários alimentos, principalmente os de baixo peso molecular como butirato de etila com aroma característico de morango e acetato de isoamila, composto de impacto do aroma de banana (Gatfield e Holzminden 1995; Christen e Mungia 1994). Lipases podem ser utilizadas na síntese de uma grande gama de ésteres de aroma com a vantagem adicional de garantir um excesso enantiomérico muitas vezes crucial para obtenção do aroma, uma vez que o caráter e a intensidade dos compostos de aroma estão intimamente relacionados com sua estereoquímica (Rossiter 1996).

Produção de compostos opticamente ativos e resolução de racematos

Nos seres vivos, a atividade biológica de uma droga é geralmente dependente da estereoquímica do composto em questão. Assim, enquanto um enantiômero apresenta um efeito benéfico, o outro pode ser tóxico ou inócuo. Alguns exemplos dos diferentes efeitos das formas enantioméricas das drogas nos seres vivos podem ser observados na tabela 2 (de Souza Pereira 1998; Sheldon 1996).

Em 1992 a FDA (Food and Drug Administration) adotou um programa no qual as drogas racêmicas enfrentariam processos muito mais longos e complexos de aprovação para venda nos EUA do que as drogas quirais. A partir desse ano a grande maioria das indústrias farmacêuticas tem procurado metodologias eficientes para produção de compostos opticamente puros e para resolução de racematos. Devido a sua enantioseletividade, lipases têm sido empregadas em vários processos deste tipo por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico (Margolin 1996; Tsai e Huang 1999).

Tabela 2: Efeito das formas enantioméricas das drogas

Droga	R-enantiômero	S-enantiômero
Carnitina	Efetivo no tratamento de doenças cardíacas de ordem muscular	Tóxico
Ibuprofeno	Inativo	Antiinflamatório
Penicilamina	Tóxico	Antiartrítico
Talidomida	Sedativo	Provoca morte e deformação fetal

Uma outra aplicação de lipases em química fina está na produção de compostos quirais puros para utilização como intermediários em sínteses químicas e como padrões para análises cromatográficas.

Detergentes

A indústria de detergentes é o destino da maior parte das lipases produzidas comercialmente. Isto se dá pois a utilização de formulações contendo lipases e proteases reduz expressivamente o tempo e a temperatura de lavagem, resultando em um processo mais eficiente com menor gasto de energia. Entretanto, para este determinado fim as lipases devem apresentar características específicas tais como: atividade a temperaturas em torno de 60°C e valores de pH alcalinos, resistência a surfactantes e à proteólise (Villeneuve *et al.* 2000).

Tratamento de efluentes

Lipases são utilizadas em lodo ativado e em outros processos aeróbicos de tratamento de efluentes de diversas indústrias (alimentos, couro, abatedouros, etc.) na remoção da camada lipídica que flota dificultando a aeração dos tanques (Godfrey e Reichelt 1983; Bailey e Ollis 1986).

Outras aplicações industriais de lipases estão relacionadas na Tabela 3.

Tabela 3: Aplicações industriais de lipases

Indústria	Aplicação	Referência
Couros	Remoção de gordura residual das peles	(Poroske 1984, Gandhi 1997)
Rações	Melhoria da palatabilidade	(Poroske 1984)
Medicina	Auxiliar de digestão	(Gehartz 1990)
	Análises clínicas	(Lott e Lu 1991)
Cosméticos	Auxiliar na penetração de produtos para permanentes	(Poroske 1984)
	Lise de material gorduroso da pasta de celulose	(Bajpai 1999)
Papel e celulose	Remoção de tinta em papel reciclado	(Treimanis <i>et al.</i> 1999)
Tecidos	Refino de seda	(Liu <i>et al.</i> , 1989)
Química	Síntese de ésteres e poliésteres usados como lubrificantes	(Gandhi 1997)
Farmacêutica	Síntese de amidas precursoras de análogos da penicilina	(Matos <i>et al.</i> 1987)

PURIFICAÇÃO DE LIPASES

A purificação de lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da enzima virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com maior atividade específica (unidades de atividade/mg de proteína) para aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final. Normalmente os protocolos de purificação de enzimas microbianas extracelulares são separados em duas etapas: pré-purificação e purificação por métodos cromatográficos (Palekar *et al.* 2000). As enzimas intracelulares (animais, vegetais e microbianas) exigem uma etapa anterior de lise da célula e liberação da proteína de interesse. Existem ainda metodologias de purificação em uma única etapa que visam reduzir os custos de purificação enzimática. Alguns dos diversos protocolos utilizados na purificação de lipases, especialmente de origem microbiana, serão discutidos a seguir.

Pré-purificação

Consiste em técnicas de concentração de proteínas, geralmente por precipitação, para separação das mesmas dos outros componentes do meio. A metodologia mais utilizada é a precipitação por sulfato de amônio embora precipitação/extração com solventes e ultrafiltração também sejam bastante empregadas. A tabela abaixo apresenta alguns métodos utilizados na pré-purificação de lipases.

Tabela 4: Pré-purificação de lipases segundo Palekar *et al.*

Técnica utilizada	Aumento da atividade específica*	Fonte da lipase	Referência
Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	2x	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Hoshino <i>et al.</i> 1992)
Ultrafiltração	1,1x	<i>Pseudomonas putida</i>	(Lee e Rhee 1993)
Suspensão com PEG ¹	2,3x	<i>Manduca sexta</i> ²	(Arrese e Wells 1994)
Extração com hexano	2,3x	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	(Schmidt-Dannert <i>et al.</i> 1994)
Precipitação com etanol	1,1x	<i>Aspergillus niger</i>	(Torossian e Bell 1991)
Precipitação com acetona	2,1x	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Iizumi <i>et al.</i> 1990)

*em relação à etapa anterior de purificação ¹ polietilenoglicol ² espécie de inseto.

É interessante notar que, independente da fonte da lipase ou da técnica empregada, a pré-purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica, mantendo o aumento sempre dentro de uma faixa. Há, no entanto, algumas exceções como os trabalhos de Ameis *et al.* (1994) e Sugihara *et al.* (1991) que alcançaram aumentos de 35x e de 50x na atividade específica, respectivamente, com técnicas inovadoras de pré-purificação.

Purificação por métodos cromatográficos

Lipases microbianas extracelulares são menos estáveis, em solução, que lipases animais e vegetais, embora sejam mais facilmente purificadas. Para purificação total destas enzimas, normalmente um passo cromatográfico não é suficiente, devendo ser utilizadas duas ou mais colunas em seqüência o que pode vir a ocasionar perdas na atividade da enzima. Lipases resultantes de clonagem em microorganismos são mais facilmente purificadas do que aquelas obtidas de linhagens selvagens (Palekar *et al.* 2000).

Na purificação de lipases são aplicados principalmente três tipos de colunas cromatográficas: colunas de troca iônica, colunas de interação hidrofóbica e colunas de permeação em gel. Além destas, são também utilizadas colunas de bioafinidade e colunas de adsorção inespecífica – empacotadas com hidroxiapatita, por exemplo.

Para o desenvolvimento de um protocolo racional de purificação, algumas informações sobre a lipase em questão são altamente desejáveis como a massa molecular da enzima e seu ponto isoelétrico. Entretanto, geralmente estes dados só estarão disponíveis uma vez que a enzima tenha sido purificada e estudada. Portanto, o desenho dos passos de purificação é feito, em geral, por tentativa e erro. Como regra geral a maioria dos protocolos de purificação de lipases segue a seguinte lógica: nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas com grande capacidade de troca e baixo custo. Estão aí incluídas as resinas de troca iônica e de interação hidrofóbica. Estas últimas têm sido aplicadas com excelentes resultados na purificação de lipases e apresentam a vantagem adicional de dispensarem diálise de extratos precipitados pela adição de sais. Nas etapas finais de purificação em geral são aplicadas colunas de filtração em gel que garantem a remoção de agregados e produtos de degradação sofrida pela enzima ao longo do processo

de purificação. Entretanto, este tipo de cromatografia fatalmente irá provocar a diluição do produto final, exigindo uma etapa de concentração posterior, como a liofilização.

O quadro abaixo mostra algumas estratégias de purificação de lipases (apenas etapas cromatográficas) disponíveis na literatura.

Tabela 5: Etapas cromatográficas utilizadas para purificação de lipases de diferentes fontes.

Fonte da lipase	Coluna utilizada	Método cromatográfico	Aumento na atividade específica*	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mono Q	Troca Iônica	2,6x	(Gilbert <i>et al.</i> 1991)
	Superose	Gel filtração	5,4x	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Q Sepharose	Troca Iônica	1,25x	(Hoshino <i>et al.</i> 1992)
	Fenil Sepharose	Interação hidrofóbica	12,2x	
<i>Penicillium simplissimum</i>	Fenil Sepharose	Interação hidrofóbica	46x	
	Ultrogel AcA-54	Troca Iônica	1,16x	(Sztajer <i>et al.</i> 1992)
	Hidroxiapatita	Adsorção inespecífica	1,33x	
	Sephacryl-S200	Gel filtração	4,03x	
<i>Aeromonas hydrophila</i> expressa em <i>E.coli</i>	DEAE	Troca Iônica	6,67x	(Anguita <i>et al.</i> 1993)

*em relação à etapa anterior de purificação

Purificação em uma única etapa

Este tipo de purificação é geralmente desenvolvido para uma lipase específica e pode não ser efetivo para enzimas de outras fontes. Normalmente estas estratégias evitam o uso de colunas cromatográficas o que facilita sua aplicação em grande escala. Um dos métodos mais eficazes envolve o uso de sistemas de duas fases aquosas no qual a separação de fases é provocada pela adição de polietilenoglicol, dextranas, detergentes (como Triton) ou de diferentes sais ao meio onde a lipase se encontra. Outras metodologias de purificação em uma única etapa foram sugeridas por Sztajer e Bryjak (1989), usando ultrafiltração em membranas capilares e por Genest *et al.* (1998), aplicando diferentes resinas de gel filtração empacotadas em seqüência em uma única coluna. No caso de glicoproteínas, caso da maioria das lipases produzidas por organismos eucariotos, uma possibilidade interessante

de purificação em um único passo seria a utilização de colunas de cromatografia por afinidade, disponíveis comercialmente, empacotadas com Concanavalina A ligada a suporte de agarose (Kristiansen 1974). No entanto, o uso de colunas de bioafinidade costuma representar um alto custo.

MODIFICAÇÕES DE LIPASES

Lipases, como anteriormente mencionado, são, potencialmente, importantes ferramentas na conversão de óleos e gorduras em produtos de maior valor agregado, na resolução de racematos, na síntese de fármacos, na produção de surfactantes, etc. Entretanto, embora um grande número de lipases com grande variedade de seletividades, esteja disponível comercialmente, algumas dificuldades como: baixa estabilidade, baixa atividade e baixa seletividade, além do alto custo do catalisador ainda impedem que um maior número de processos se beneficie da utilização de lipases. Para superar estas dificuldades, diferentes modificações podem ser feitas nestas enzimas de modo a melhorar sua performance em um dado processo (Kilara e Shahani 1979).

Modificações físicas

As modificações físicas envolvendo enzimas são normalmente denominadas de “imobilização”. Os métodos de imobilização mais comuns envolvem: adsorção da lipase a um material carreador sólido, encapsulamento ou inclusão ou ainda ligação covalente da enzima a um suporte (que no presente trabalho será discutido entre as modificações químicas). Entre as vantagens da imobilização estão o aumento da estabilidade térmica da maioria das lipases e a maior facilidade de recuperação da enzima, possibilitando sua contínua reutilização (Omar *et al.* 1988). Em alguns casos é possível ainda obter-se produtos com seletividade alterada e hiperativados. Bastida *et al.* (1998) imobilizando lipases de *Mucor miehei* e de *Humicola lanuginosa* em octil-agarose obtiveram um produto com alta enantioseletividade e atividade 20 vezes maior que os preparados solúveis iniciais.

Imobilização por adsorção

Os procedimentos necessários para este tipo de imobilização são bastante simples e a enzima fica ligada ao suporte por forças de interação de baixa energia como interações de

Van der Waals ou pontes de hidrogênio. Existem vários materiais de suporte e sua escolha depende principalmente da característica desejável para a aplicação em questão: hidrofobicidade/hidrofilicidade, estabilidade química, capacidade de adsorção, custo, etc. Geralmente, materiais hidrofóbicos são mais desejáveis para imobilização de enzimas proporcionando maior adsorção e produtos com mais atividade enzimática (Brady et al. 1988, 1987; Garcia et al. 1992).

Encapsulamento ou inclusão

Nesta técnica de imobilização a enzima é dissolvida em uma solução contendo os monômeros da matriz que sofrem polimerização. Neste processo a enzima fica presa dentro da matriz formada. Os materiais mais utilizados para encapsulamento são géis de poliacrilamida, alginato de sódio (que polimeriza quando o sódio é trocado por cálcio pela adição de cloreto de cálcio) e carragena (que sofre o mesmo processo na presença de potássio) (Hertzberg *et al.* 1992). Mais recentemente polímeros fotossensíveis vêm sendo empregados. A maior vantagem desta técnica está no fato da enzima não interagir com a matriz, o que reduz as chances de perdas na atividade, entretanto o acesso dos substratos ao sítio ativo fica restrito.

Um caso especial de inclusão é a microencapsulação de lipases. Nesta técnica a lipase é envolta por uma membrana semipermeável que impede a saída da enzima mas permite a passagem de substratos e produtos. A maior vantagem desta imobilização ainda pouco estudada é garantir que a microrregião que envolve a enzima possa ser controlada, pois durante a microencapsulação, parte do ambiente original da enzima é englobado com ela. Isto é de extrema importância para aplicação da enzima em meios reacionais agressivos e em reações de atividade de água controlada (Jenta *et al.* 1997).

Modificações químicas

As metodologias para modificação química de lipases têm dois objetivos distintos: elucidar detalhes de sua estrutura química como sítios ativos (Kaimai e Saroja 1989^a) e conferir às enzimas características novas desejáveis (Kawase e Tanaka 1989). Para tanto podem ser utilizadas técnicas para modificação de resíduos de aminoácidos, ligação covalente da enzima a matrizes insolúveis ou formação de matrizes contendo lipases ligadas por ligações cruzadas. De uma forma geral verifica-se que as modificações

químicas geram lipases mais aptas a atuar em meios hidrofóbicos e aumentam sua capacidade para síntese, entretanto, algumas das técnicas utilizadas acabam por danificar a estrutura das lipases gerando produtos com baixa atividade (Kaimai e Saroja 1989^b).

Ligação covalente a matrizes

Esta metodologia, semelhante à imobilização por meios físicos, é bem menos empregada porém oferece a vantagem de não ser susceptível a dessorção da lipase além de gerar produtos muito estáveis e resistentes a condições extremas de pH e temperatura. Geralmente são empregados suportes minerais como celite e sílica (Stark e Holmberg 1989) embora recentemente o uso de polímeros como nylon esteja em estudo (Manjon *et al.* 1991). A maior dificuldade encontrada neste tipo de processo é evitar que partes da proteína envolvidas na catálise sejam utilizadas para ligação covalente com a matriz.

Formação de ligações cruzadas entre lipases

Nesta técnica de imobilização as lipase são ligadas umas às outras por intermédio de reagentes bifuncionais. Para tanto é necessária a pré-imobilização das enzimas em resinas de troca iônica para tratamento e posterior formação das ligações intermoleculares (Omar *et al.* 1988). Embora este tipo de imobilização geralmente ocasione perdas significativas na atividade da enzima, duas lipases de origem microbiana (*Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa*) estão disponíveis comercialmente sob esta forma por apresentarem enantioseletividade muito aumentada, sendo indicadas para uso na resolução de ibuprofeno racêmico (Lalonde *et al.* 1995).

Modificações por técnicas de engenharia genética

As tecnologias de DNA recombinante e de engenharia genética permitem o isolamento e manipulação de ácidos nucléicos que conseqüentemente provocarão alterações na seqüência de aminoácidos e nas propriedades de uma dada enzima sendo, portanto, ferramentas poderosas para modificação de lipases. A ausência de um maior número de modelos de estruturas de lipases e de informações sobre seu funcionamento restringe um pouco a possibilidade de se alterar pontos específicos da molécula visando objetivos claros (seletividade de substrato, termoresistência, etc.), mas ainda assim muitos avanços já foram alcançados neste sentido (Cygler *et al.* 1992).

Separação de genes

Na maioria dos casos, os organismos produzem diversas isoenzimas com atividade lipolítica e cada uma delas tem características específicas interessantes para aplicação em determinados processos. Como a purificação destas enzimas normalmente envolve diferentes etapas e nem sempre é possível se obter enzimas puras e a preços atrativos, há a possibilidade de se clonar o gene responsável pela expressão da proteína de interesse e expressá-lo em outro organismo. Um caso clássico em que esta técnica foi aplicada com sucesso é o da lipase de *Geotrichum candidum* que, entre outras isoenzimas, produz uma com características extremamente interessantes: seletividade por ácidos graxos insaturados na posição 9. Com o uso da técnica de separação de genes é possível gerar uma linhagem altamente produtora desta enzima de interesse obtendo-se dela um preparado lipolítico bruto com alta seletividade (Bertolini *et al.* 1995).

Alterações na atividade e na seletividade por mutagênese direta

Esta técnica visa, por modificação racional de um ou poucos resíduos de aminoácidos na molécula, restringir tanto quanto possível o número de substratos reconhecidos pela lipase. Este tipo de modificação só foi reportado muito recentemente e depende ainda de maiores informações a respeito da funcionalidade de cada trecho da molécula protéica para alcançar os resultados almejados, ainda assim alguns trabalhos bem sucedidos apontam o caminho a ser seguido (Pederson e Holmer 1995). Haas e Joerger (1995) estudaram a modificação de diversos resíduos de aminoácidos da parte hidrofóbica do sítio ativo de lipases produzidas por *Rhizopus* sp. e *Rhizomucor* sp. para determinação dos resíduos responsáveis pela seletividade das lipases dos gêneros em estudo por ácidos graxos de até 12 carbonos.

CONCLUSÃO

Lipases apresentam uma vasta gama de aplicações em diferentes indústrias e vêm crescendo em participação no comércio mundial de enzimas. Um maior conhecimento sobre a estrutura, o modo de ação e os genes codificadores destas enzimas vai permitir um enorme avanço no campo da engenharia de proteínas, possibilitando a síntese de enzimas específicas, mais fáceis de purificar e mais adaptadas aos processos de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelhorst, K.; Björkling, F.; Godtfredsen, S.E.; Kirk, O. 1990. Enzyme Catalysed Preparation of 6-O-Acylglucopyranosides. *Synthesis*. 2:112-115.

Ameis, D.; Merkel, M.; Eckerskorn, C.; Greten, H. 1994. Purification, Characterization and Molecular Cloning of Human Pancreatic Lysosomal Acid Lipase. *European Journal of Biochemistry*. 219: 905-914.

Anguita, J.; Rodriguez-Aparicio, L.B.; Naharro, G. 1993. Purification, Gene Cloning, Amino Acid Sequences Analysis and Expression of an Extracellular Lipase from an *Aeromonas hydrophila* Human Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2411-2417.

Arrese, E.L.; Wells, M.A. 1994. Purification and Properties of a Phosphorilatable Triacylglycerol Lipase from the Fat Body of an Insect, *Manduca sexta*. *Journal of Lipid Research*. 35: 1652-1660.

Bailey, J.E.; Ollis, D.F. 1986. Applied Enzyme Catalysis. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, Nova York. 157-227.

Bajpai, P. 1999. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. *Biotechnology Progress*. 15(2): 147-157.

Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisan, J.M. 1998. A Single Step Purification, Immobilization and Hyperactivation of Lipases Via Interfacial Adsorption On Strongly Hydrophobic Supports. *Biotechnology Bioengineering*. 58(5): 486-493.

Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. 2000. Methods for Lipase Detection and Assay: a Critical Review. *European Journal Of Lipid Science and Technology*. 133-153.

Bertolini, M.C.; Schrag, J.D.; Cygler, M.; Ziomek, E.; Thomas, D.Y.; Vernet, T. 1995. Expression and Characterization of *Geotrichum Candidum* Lipase I Gene: Comparison of Specificity Profile with Lipase II. *European Journal of Biochemistry*. 228: 863-869.

Björkling, F.; Godtfredsen, S.E.; Kirk, O. 1989. A Highly Selective Enzyme-Catalysed Esterification of Simple Glucosides. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*. 14: 934-935.

Borgston, B.; Brockman, H.L. 1984. *Lipases*. Elsevier, Amsterdam.

Bornscheuer, U.T. 1995. Lipase Catalysed Synthesis of Monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*. 17: 578-586.

Brady, C.; Metcalfe, L.; Slaboszewski, D.; Frank, D. 1987. Hydrolysis of Liquid Fats Using Lipase Adsorbed On Porous Substrate of Untreated Microporous Polyolefin, from Aqueous Medium, Using Fixed Bed Or Stirred Reactors. US patent N° 4.629.742.

Brady, C.; Metcalfe, L.; Slaboszewski, D.; Frank, D. 1988. Lipase Immobilized on a Hydrophobic Support for the Hydrolysis of Fats. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 65(6): 917-921.

Brady, R.L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J.P.; Christiansen, L.; Høge-Jensen, B. Nørskov, L.; Thim, L.; Menge, U. 1991. A Serine Proteases Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase. *Nature*, 351: 491-494.

Cao, L.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. 1996. Lipase-Catalysed Solid Phase Synthesis of Sugar Esters. *Fett/lipid*. 10: 332-335.

Christen, P.; Mungia, L.A. 1994. Enzymes and Food Flavor – a Review. *Food Biotechnology*. 8(2,3): 167-190.

Cygler, M.; Schrag, J.D.; Ergun, F. 1992. Advances in Structural Understanding of Lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 10: 143-184.

De Souza Pereira, R. 1998. The Use of Baker's Yeast in the Generation of Asymmetric Centers to Produce Chiral Drugs and Other Compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*. 18: 25-83.

Derewenda, Z.S. 1994. Structure and Function of Lipases. *Advances in Protein Chemistry*. 45:1-52.

Enzelberger, M.M.; Bornscheuer, U.T.; Gatfield, I.; Schmid, R.D. 1997. Lipase Catalysed Resolution of γ - And δ -Lactones. *Journal of Biotechnology*. 56: 129-133.

Farahat, S.M.; Rabie, A.M.; Faras, A.A. 1990. Evaluation of the Proteolytic and Lipolytic Activity of Different *Penicillium roqueforti* Strains. *Food Chemistry*. 36: 169-180.

Farooqui, A.A.; Taylor, W.A.; Horrocks, L.A. 1987. Phospholipases, Lysophospholipases and Lipases and Their Involvement in Various Diseases. *Neurochemical Pathology*. 7(2): 99-128.

Gandhi, N.N. 1997. Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 74(6): 621-634.

Garcia, H.S.; Malacat, F.X.; Hill, C.G.; Amundson, C.H. 1992. Use of *Candida rugosa* Lipase Immobilized in a Spiral Wound Membrane Reactor for the Hydrolysis of Milkfat. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(7): 535-545.

Gatfield, I.L. 1997. Biotechnological Production of Flavor-Active Lactones. *Biochemical Engineering*. 55: 221-238.

Gatfield, I.L.; Holzminden, G.R. 1995. Enzymatic and Microbial Generation of Flavours. *Perfumer and Flavorist*. 20: 5-14.

Gehartz, W. 1990. Industrial Uses of Enzymes. In: *Enzymes in Industry – Production and Application*. VCH, Weinheim. 77-148.

Genest, P.W.; Field, T.G.; Vasudevan, P.T.; Palekar, A.A. 1998. Continuous Purification of Porcine Lipase by Rotating Annular Size-Exclusion Chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 73: 215-230.

Gilbert, E.J.; Cornish, A.; Jones, C.W. 1991. Purification and Properties of an Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*. 137: 2223-2229.

Godfrey, T.; Reichelt, J. 1983. Industrial Applications. In: *Industrial Enzymology – Applications of Enzymes in Industry*. The Nature Press, Londres. 170-465.

Haas, M.J.; Joerger, R.D. 1995. Lipases of the Genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: Versatile Catalysts in Nature and the Laboratory. In: *Food Biotechnology: Microorganisms*. Ed: Hui, Y.H.; Khachatourians, G.G. VCH. Nova York. 549-588.

Heo, J.H.; Kim, H.S.; Yoo, K.P. 2000. Enzymatic Preparation of Carbohydrate Ester of Medium Chain Fatty Acid in Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnology Letters*. 22: 995-998.

Hertzberg, S.; Kvittingen, L.; Anthosen, T.; Skjak-Brack, G. 1992. Alginate as Immobilization Matrix and Stabilizing Agent in Two-Phase Liquid System: Application in Lipase Catalyzed Reaction. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(1): 42-47.

Hill, K.; Rhode, O. 1999. Sugar-Based Surfactants for Consumer Products and Technical Applications. *Fett/Lipid*. 101(1): 25-33.

Hoshino, T.; Sasaki, T.; Watanabe, Y.; Nagasawa, T.; Tamane, T. 1992. Purification and Some Characteristics of Extracellular Lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 56: 660-664.

Iizumi, T.; Nakamura, K.; Fusake, T. 1990. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from Newly Isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54: 1253-1258.

Innis, S.M. 1992. Human Milk and Formula Fatty Acids. *Journal of Pediatrics*. 120: s56-s61.

Iwasaki, Y.; Yamane, T. 2000. Enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10: 129-140.

Jensen, R.G.; Jensen, G.L. 1992. Specialty Lipids for Infant Nutrition. I Milks and Formulas. *Journal of Pediatrival and Gastroenterological Nutrition*. 15: 232-245.

Jenta, T.R.J.; Batts, G.; Rees, G.D.; Robinson, B.H. 1997. Kinetic Studies of *Chromobacterium viscosum* Lipase in AOT Water in Oil Microemulsions and Gealtin Microemulsion-based Organogels. *Biotechnology Bioengineering*. 54(5): 416-427.

Kaimai, T.N.B.; Saroja, M. 1989^b. Enhancement of Catalytic Activity of Porcine Pancreatic Lipase by Reductive Alkylation. *Biotechnology Letters*. 11(1): 31-36.

Kaimai, T.N.B.; Saroja, M. 1989^a The Active Site Composition of Porcine Pancreatic Lipase : Possible Involvement Of Lysine. *Biochimica et Biophysica Acta.* 999(3): 331-334.

Kamiya, N.; Goto, M.; Nakashio, F. 1995. Surfactant-Coated Lipase Suitable for the Enzymatic Resolution of Menthol as a Biocatalist in Organic Media. *Biotechnology Process*. 11: 270-275.

Kawase, M.; Tanaka, A.; 1989. Effects of Chemical Modification of Amino Acid Residues on the Activities of Lipase from *Candida cylindracea*. *Enzyme and Microbial Technology*. 11(1): 44-48.

Kilara, A.; Shahani, C.R.C.; 1979. The Use of Immobilized Enzymes in the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 12(2): 161-198.

Kinsella, J.E.; Hwang, D.H. 1976. Enzymes of *Penicillium roqueforti* Involved in the Biosynthesis of Cheese Flavours. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 8: 192-228.

Klibanov, A.M. 1989. Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents. Trends in Biochemical Sciences. 14(4): 141-144.

Kristiansen, T. 1974. Group-Specific Separation of Glycoproteins. In: Methods in Enzymology. Vol 34. Eds: Jakoby, W.B.; Wilchek, M. Academic Press. Nova York. 331-340.

Kwon, S.J.; Han, J.J.; Rhee, J.S. 1995. Production and in Situ Separation of Mono- or Diacylglycerol Catalysed by Lipases in n-Hexane. Enzyme and Microbial Technology. 17: 700-704.

Lalonde, J.J.; Govardhan, C.; Khakaf, N.; Martinez, A.G.; Visuri, K.; Margolin, A.L. 1995. Cross-Linked Crystals of *Candida rugosa* Lipase: Highly Efficient Catalysts for the Resolution Of Chiral Esters. Journal of the American Oil Chemists Society. 117(26): 6845-6852.

Lee, S.Y.; Rhee, J.S. 1993. Production and Partial Purification of a Lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. Enzyme and Microbial Technology. 15: 617-621.

Liu, Q.; Chang, X.; Yue, K.; Wang, C. 1989. Refining Mulberry Silk with Protease and Lipase. Fangzhi Xuebao. 10: 116-119.

Lott, J.A.; Lu, C.J. 1991. Lipase Isoforms and Amylase Isoenzymes – Assays and Application in the Diagnosis of Acute Pancreatitis. Clinical Chemistry. 37(3): 361-368.

Macrae, A.R.; Hammond, R.C. 1985. Present and Future Applications of Lipases. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 3: 193-217.

Manjon, A.; Iborra, J.L.; Arocas, A. 1991. Short-Chain Flavor Ester Synthesis by Immobilized Lipase in Organic Media. Biotechnology Letters. 13(5): 339-344.

Margolin, A.L. 1996. Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs. Enzyme and Microbial Technology. 7: 113-119.

Matos, J.R.; West, J.B.; Wong, C.H. 1987. Lipase Catalysed Synthesis of Peptides: Preparation of Penicillin G Precursor and Other Peptides. Biotechnology Letters. 9: 233-236.

Mcneil, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. 1991. High-Yield Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils. Journal of the American Oil Chemists Society. 68(1): 1-5.

Mcneil, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. 1990. Solid Phase Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in a High Yield of Monoglyceride. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 67(11): 779-783.

Omar, I.C.; Saeki, H.; Nishino, N.; Nagai, S. 1988. Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Thermostable Lipase from *Humicola lanuginosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 52(1): 99-105.

Palekar, A.A.; Vasudevan, P.T., Yan, S. 2000. Purification of Lipase: a Review. *Biocatalysis Biotransformation*. 18: 177-200.

Pederson, S.B.; Holmer, G. 1995. Studies of The Fatty Acid Specificity of the Lipase from *Rhizomucor Miehei* Toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 72: 239-243.

Petchow, B.W.; Batema, R.P.; Ford, L.L. 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Bactericidal Properties of Medium-Chain Monoglycerides and Free Fatty Acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(2):302-306.

Poroske, L.H. 1984. Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 61(11): 1758-1765.

Quinlan, P.; Moore, S. 1993. Modification of Triglycerides by Lipases: Process Technology and its Application to the Production of Nutritionally Improved Fats. *INFORM*. 4: 580-585.

Rossiter, K. 1996. Quantitative Relationships Between Structure and the Fruity Odor of Esters. *Perfumer and Flavorist*. 21: 33-46.

Rozendaal, A.; Macrae, A.R. 1997. Interesterification of Oils and Fats. In: *Lipids Technologies and Applications*. Eds. Gunstone, F.D.; Padley, F.B., Marcel Dekker Inc., Nova York. 233-263.

Schmidt, R.D.; Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angewandte Chemie – International Edition*. 37(12): 1609-1633.

Schmidt-Dannert, C.; Sztajer, H.; Stöcklein, W.; Menge, U.; Schmid, R. 1994. Screening, Purification and Properties of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1214: 43-53.

Schrag, J.D.; Cygler, M. 1997. Lipases and The α/β Fold. In: *Methods in Enzymology* Vol. 284. Academic Press, New York. 85-106.

Sheldon, R.A. 1996. Chirotechnology: Designing Economic Chiral Syntheses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 67: 1-14.

Shukla, V.K.S. 1996. Confectionary Fats. In: *Developments in Oils and Fats*. Ed. Hamilton, R.J. Blakie Academic e Professional, Glasgow. 66-94.

Sod, V.K.; Kosikowski, F.V. 1979. Accelerated Cheddar Cheese Ripening by Added Microbial Enzymes. *Journal of Dairy Science*. 62: 1865-1872.

Sonnet, P.E. 1988. Lipase Selectivities. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 65(6): 900-904.

Stark, M.B.; Holmberg, K. 1989. Covalent Immobilization of Lipase in Organic Solvents. *Biotechnology Bioengineering*. 34(7): 942-950.

Sugihara, A.; Tani, T.; Tominaga, Y. 1991. Purification and Characterization from a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. *Journal of Biochemistry*. 109: 211-216.

Sztajer, H.; Bryjak, M. 1989. Capillary Membranes for the Purification of *Pseudomonas fluorescens* Lipase. *Bioprocess Engineering*. 4: 257-259.

Sztajer, H.; Lünsdorf, H.; Erdmann, H.; Menge, U.; Schmid, R. 1992. Purification and Properties of Lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1124: 253-261.

Thomas, L.V.; Davies, E.A.; Delves-Broughton, J.; Wimpenny, J.W.T. 1998. Synergist Effect of Sucrose Fatty Acid Esters on Nisin Inhibition of Gram Positive Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 85:1013-1022.

Torossian, K.; Bell, A.W. 1991. Purification and Characterization of an Acid Resistant Triacylglycerol Lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 13: 205-211.

Treimanis, A.; Leite, M.; Eisimonte, M.; Viesturs U. 1999. Enzymatic Deinking of Laser-Printed White Office Wastepaper. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 13(2): 53-57.

Tsai, S.W.; Huang, C.M. 1999. Enantioselective Synthesis of (s)-Suprofen Ester Prodrugs by Lipase in Cyclohexane. *Enzyme and Microbial Technology*. 25(8-9): 682-688.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M.M. 2000. Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 9: 113-148.

Winter, C.H.; Hovig, E.B.; Muskiet, F.A.J. 1993. Fatty Acid Composition of Human Milk Triglycerid Species: Possible Consequences for Optimal Structures of Infant Formula Triglycerides. *Journal of Chromatography*. 616: 97-103.

Wiseman, A. 1975. Industrial Practice with Enzymes: Application and Sources of Industrial Enzymes. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ed. Wiseman, A. Ellis Horwood Ltd. Chichester. 252-259.

Xu, X. 2000. Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 287-303.

Zhang, H.; Xu, X.B.; Mu, H.L.; Nilsson, J.; Adler-Nissen, J.; Hoy, C.E. 2000. Lipozyme-Catalyzed Interesterification for the Production of Margarine Fats in a 1Kg Scale Stirred Tank Reactor. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 102(6): 411-418.

PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS POR VIA ENZIMÁTICA

RESUMO

Monoacilgliceróis são as substâncias surfactantes mais usadas nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos. Sua produção atual é feita através de síntese química sob alta temperatura. Esta metodologia, além de gerar produtos secundários indesejados, apresenta baixo rendimento. Uma alternativa interessante para produção de monoacilgliceróis é a síntese enzimática com o uso de lipases. Este artigo revisa as principais técnicas para síntese enzimática destas substâncias, publicadas nos últimos anos.

PALAVRAS-CHAVE: enzima, lipase, monoacilglicerol, hidrólise, esterificação, alcoólise.

ABSTRACT

ENZYMATIC PRODUCTION OF MONOACYLGLYCEROLS. Monoacylglycerols are the most applied surfactant substances in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. Its current production is accomplished through chemical synthesis under high temperature. Besides generating not desired by-products, this methodology presents low yield. An interesting alternative for monoacylglycerol production is the enzymatic synthesis applying lipases. This article reviews the main enzymatic methodologies for the synthesis of these substances, published in the last years.

KEYWORDS: enzyme lipase, monoacylglycerols, hydrolysis, esterification, alcoholysis.

INTRODUÇÃO

Monoacilgliceróis são as substâncias emulsificantes mais empregadas nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (Bornscheuer 1995). Isto se deve à sua grande versatilidade, uma vez que o tamanho da cadeia carbônica define o balanço hidrofóbico/hidrofílico do surfactante, e também à sua atividade bacteriostática (principalmente daqueles formados por ácidos graxos de cadeia média) (Conley e Kabara 1973; Petschow *et al.* 1996). Em alimentos, propriedades nutricionais se unem às propriedades funcionais dos monoacilgliceróis. Um bom exemplo está no uso de monoacilgliceróis formados por ácidos graxos poliinsaturados que têm absorção imediata no intestino humano, quando estes estão ligados à posição 2 no glicerol (Li e Ward 1993). Além disso, monoacilgliceróis podem ser utilizados como base para síntese de triacilgliceróis estruturados (Irimescu *et al.* 2001), fosfolipídios, glicolipídios e lipoproteínas (Waldinger e Schneider, 1996) e são aplicados como carreadores de drogas na forma de conjugados (Paris *et al.* 1980).

Atualmente, a produção de monoacilgliceróis é feita por métodos químicos envolvendo a direta esterificação entre glicerol e ácidos graxos ou a chamada glicerólise, que consiste na alcoólise envolvendo triacilgliceróis e glicerol. Estes processos dependem do uso de altas temperaturas (170°C-250°C), na presença de catalisadores alcalinos (KOH ou NaOH, 0,05 – 0,2%), atmosfera de nitrogênio e excesso molar de glicerol (Tüter e Aksoy, 2000). A aplicação de temperaturas elevadas gera subprodutos com características indesejadas tais como cor escura, odor desagradável e sabor de queimado (McNeil e Yamane 1991). Além disso, independente do processo utilizado, o rendimento em monoacilgliceróis é baixo, variando de 35% a 60%, no máximo (Rosu *et al.* 1997). Em virtude disso o produto obtido deve, obrigatoriamente, passar por etapas de purificação para remoção dos subprodutos e obtenção de um produto final com cerca de 90% de pureza, padrão exigido para uso em alimentos e fármacos, uma vez que a presença de outros glicerídeos reduz bastante a capacidade emulsificante do produto (McNeil *et al.* 1990).

Como alternativa ao processo convencional, a síntese enzimática – envolvendo lipases – apresenta diversas vantagens pois, dependendo da metodologia e da enzima aplicadas, pode garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da

ambiente, o que proporciona produtos de qualidade superior, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (Rosu *et al.* 1997).

Este capítulo tem por finalidade fazer um levantamento dos métodos enzimáticos de obtenção de monoacilgliceróis, apresentando suas principais vantagens e desvantagens.

OBTENÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS POR VIA ENZIMÁTICA

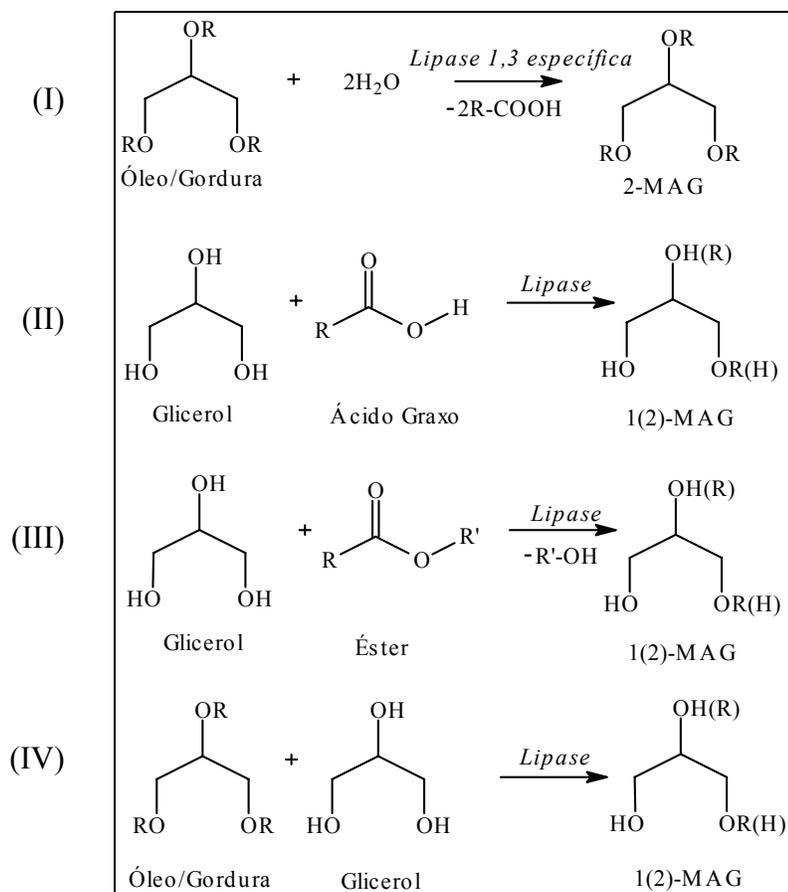


Figura 1. Desenho esquemático das reações catalisadas por lipase para obtenção de monoacilgliceróis: (I) Hidrólise; (II) Esterificação com ácido graxo ou (III) éster e (IV) Glicerólise. Segundo Bornscheuer (1995).

As diferentes metodologias utilizadas para obtenção de monoacilgliceróis por via enzimática são baseadas nas reações esquematizadas no quadro da Figura 1 e serão discutidas em mais detalhes a seguir.

Hidrólise

Para obtenção de monoacilgliceróis por hidrólise enzimática é necessário evitar-se a completa hidrólise do triacilglicerol inicial a ácidos graxos livres e glicerol. A metodologia mais indicada neste caso é a aplicação de lipases 1,3-específicas que geram 2-monoacilgliceróis. A principal dificuldade nestes casos é evitar que ocorra a migração natural dos ácidos graxos da posição 2 para as posições 1(3), o que acaba por possibilitar a hidrólise total do substrato. Alguns autores se dedicaram ao estudo das causas desta isomerização (Heisler *et al.* 1991; Goh *et al.* 1993; Xu *et al.* 2001; Lyubachevskaya e Boyle-Roden 2000), no entanto um método eficiente de controle ainda não foi proposto e, normalmente, o rendimento, em monoacilgliceróis, é determinado pelo tempo de reação. Esta metodologia, embora seja das de mais simples aplicação, apresenta o inconveniente de gerar baixas concentrações do produto de interesse, pois, além da possibilidade de ocorrer hidrólise total do substrato, cada mol deste mesmo substrato só é capaz de gerar, mesmo em condições ideais, um mol de monoacilglicerol para dois moles de ácidos graxos livres. Vários trabalhos foram publicados nos últimos anos sobre hidrólise enzimática para obtenção de monoacilgliceróis em meios reacionais contendo solventes ou na ausência destes.

Rendimentos de até 70% em 2-monoacilgliceróis foram alcançados em um meio reacional bifásico contendo hexano, 2-butanol e tampão usando lipase 1,3-específica comercial de *Rhizomucor miehei*. Os autores reportam que um segundo passo, de esterificação dos ácidos graxos liberados com álcoois primários, proporciona rendimentos em monoacilgliceróis ainda maiores (Mansur *et al.* 1991).

Hidrólise de óleo de mamona por lipase 1,3-específica de *Rhizopus arrhizus* em tampão (pH=7,5) gerou 23% de monoacilgliceróis após 3h de reação. A precipitação dos ácidos graxos liberados pela adição de sal foi capaz de deslocar o equilíbrio da reação provocando um aumento no rendimento final (até 65% de monoacilgliceróis) (Flenker *et al.* 1990). Holmberg e Österberg (1988) alcançaram excelentes resultados utilizando surfactantes aniônicos para formação de um meio reacional emulsificado, entretanto,

rendimentos acima de 80% não puderam ser atingidos devido à ocorrência de hidrólise total do substrato.

O uso de reatores para hidrólise contínua também foi testado por diferentes autores. Kosugi e Tomizuka (1995) desenvolveram um aparato de hidrólise contínua em sistema de duas fases seguido de um separador da mistura óleo/água. Kittikun *et al.* (2000) utilizaram lipase de *Candida rugosa* imobilizada em resina porosa para montagem de um sistema contínuo para hidrólise de óleo de palma.

Esterificação

Lipases são hidrolases que, em meios reacionais com baixa atividade de água, são capazes de catalisar a reação inversa à hidrólise, isto é, podem promover a esterificação de ácidos graxos com glicerol. Neste tipo de reação, a maior dificuldade consiste em manter a atividade de água nos níveis ideais, pela remoção da água liberada durante a reação. Para tanto, diversas metodologias foram desenvolvidas envolvendo o uso de peneiras moleculares (Yamagushi e Mase, 1991) e aplicação de vácuo ao meio reacional (Miller *et al.* 1988).

A forma mais simples de se conduzir este tipo de reação consiste na mistura dos ácidos graxos com glicerol, na presença ou na ausência de solventes orgânicos. A cinética desta reação foi estudada por Sakiyama *et al.* (2001) em um sistema no qual gotículas de ácidos graxos foram dispersas em uma solução contendo glicerol e lipase de *Pseudomonas* sp. em tampão. De forma semelhante, Weiss (1990) atingiu uma conversão de até 96% em monoacilgliceróis utilizando um sistema no qual ácidos graxos na forma sólida foram dispersos na fase contendo glicerol e lipase de *Penicillium cyclopium*. Curiosamente, o mesmo sistema, utilizando lipase de *Rhizopus* sp. produziu apenas 8% de monoacilgliceróis. Macrae *et al.* (1998), utilizando uma lipase de origem vegetal, atingiram cerca de 95% de rendimento com diversos ácidos graxos dispersos em glicerol sob atmosfera de pressão reduzida.

A presença de diferentes solventes no meio reacional tem grande influência no produto obtido como mostra o trabalho de Gancet (1990). Neste caso, a lipase de *Rhizopus arrhizus* foi testada em três diferentes solventes apresentando rendimentos em monoacilgliceróis de 18%, 37% e 44%.

Com o objetivo de aumentar o contato entre os substratos e, conseqüentemente, o rendimento da reação de esterificação, diferentes modificações dos substratos e do meio reacional foram propostas por diversos autores.

A utilização de agentes tensoativos em solventes orgânicos para formação de micelas reversas é um bom exemplo de sistema reacional alternativo. Este artifício, além do aumento da área de contato entre enzima e substratos, proporciona também a proteção do glicerol (por seu encapsulamento dentro das micelas), o que contorna o problema de sua baixa solubilidade em solventes apolares. Bornscheuer *et al.* (1994) atingiram até 90% de rendimento em monoacilgliceróis na reação entre ácido láurico e glicerol usando lipase de *Pseudomonas cepacia* em um meio contendo AOT (dioctil sodiosulfocinato).

Outra metodologia bastante empregada é a adsorção do glicerol a suportes sólidos como sílica ou celite. Desta forma, a dispersão deste substrato em solventes apolares fica bastante facilitada, aumentando o rendimento final da reação. Berger e Schneider (1993) atingiram até 70% de rendimento em monoacilgliceróis utilizando essa metodologia, independente do ácido graxo utilizado. Entretanto, maiores rendimentos não puderam ser alcançados pois os monoacilgliceróis formados se tornavam substratos preferenciais das diferentes enzimas testadas, a partir dessa concentração, gerando di- e triacilgliceróis.

Uma terceira alternativa para maior dispersão do glicerol no meio reacional é a sua modificação química com agentes solubilizantes e protetores das hidroxilas. Estão incluídos aí o uso de ácido fenilborônico e a modificação por reação com acetona gerando isopropilideno-glicerol. Nos dois casos, a conseqüência prática é a proteção de duas das três hidroxilas do glicerol, aumentando sua solubilidade em solventes apolares e garantindo a regioseletividade da esterificação. Ao término da reação o produto deve passar por uma etapa de separação do bloco protetor, que normalmente é alcançada por hidrólise ácida (Figura 2). Devido à sua complexidade este tipo de modificação geralmente é aplicado quando a pureza ótica do produto final é muito importante. Wang *et al.* (1988) produziram glicerol monovalerato e monoacetato através deste processo conseguindo um excesso enantiomérico de 67%.

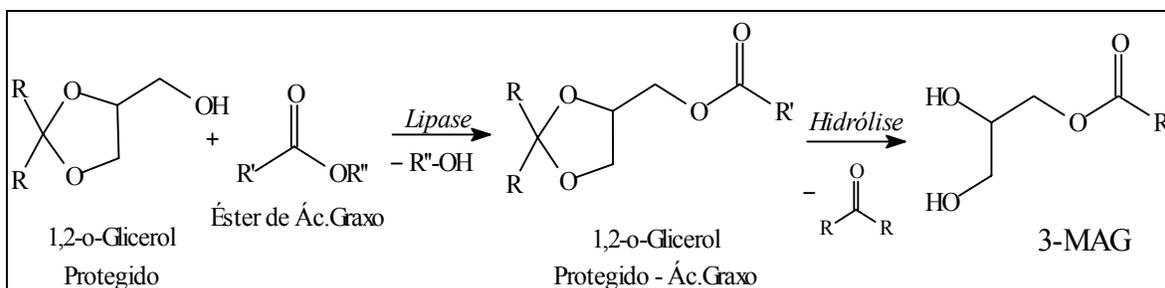


Figura 2. Desenho esquemático da síntese de monoacilgliceróis a partir de glicerol protegido e éster do ácido graxo. Segundo Bornscheuer (1995).

Alcoólise

A alcoólise consiste basicamente na transesterificação entre um éster e um álcool (Figura 1). Para produção de monoacilgliceróis grande atenção foi dispensada a um tipo especial desta reação, a glicerólise. Isto acontece pois entre todas as formas possíveis de se obter o produto desejado é a glicerólise que oferece maior rendimento teórico, uma vez que cada mol de triacilglicerol usado como substrato pode gerar três moles de monoacilgliceróis, na presença de excesso de glicerol.

Embora diferentes metodologias tenham sido testadas, na presença de solventes (Yang *et al.* 1993) e em meio de micelas reversas (Chang *et al.* 1991), em geral o meio reacional para glicerólise é o mais simples possível, apenas a mistura de óleo/gordura e glicerol. Rosu *et al.* (1997) usando diferentes lipases bacterianas imobilizadas em suportes minerais conseguiram produzir até 90% de monoacilgliceróis em 72h de reação, quando o suporte usado foi carbonato de cálcio. El *et al.* (1998) tiveram um rendimento de 66% na glicerólise de óleo de girassol usando lipase de origem vegetal. Tüter e Aksoy (2000) tiveram rendimento máximo de 38% em monoacilgliceróis na glicerólise de óleo de palma com lipase comercial de *Humicola lanuginosa*.

Outro tipo de alcoólise aplicada com sucesso na obtenção de monoacilgliceróis é a etanólise na qual o etanol atua como solvente e substrato. Irimescu *et al.* (2001) obtiveram mais de 90% de rendimento em monoacilgliceróis através da etanólise de óleo de peixe utilizando lipase microbiana comercial após apenas duas horas de reação. Vacek *et al.* (2001) obtiveram cerca de 40% de rendimento após etanólise de óleo de groselha com lipase de *Pseudomonas fluorescens*.

Independentemente da metodologia utilizada para obtenção de monoacilgliceróis, um importante fator para alcançar-se um alto rendimento está em se deslocar o equilíbrio da reação, pela remoção do produto de interesse do meio reacional. Isto tem ainda como conseqüência a possibilidade de se evitar que os monoacilgliceróis formados atuem como substrato no decorrer da reação.

A metodologia aplicada com maior sucesso, tanto em esterificação quanto em glicerólise consiste em se reduzir a temperatura de reação de modo que os monoacilgliceróis formados cristalizem seletivamente. O momento em que essa redução de temperatura deve acontecer e a temperatura de cristalização (denominada de temperatura crítica) devem ser estabelecidos experimentalmente para cada meio reacional, de acordo com os substratos utilizados e com os produtos obtidos. Este artifício, aplicado para síntese gerou um sistema de produção de monoacilgliceróis com altos rendimentos e obtenção do produto puro, em estado sólido, patenteado por Schneider em 1992 (Schneider 1992). Sua aplicação em glicerólise foi extensivamente estudada pelo grupo liderado por Yamane (McNeil e Yamane 1991; McNeil *et al.* 1990, 1991).

Um processo alternativo, proposto por Van der Padt *et al.* (1992) consiste na adsorção dos acilgliceróis (mono e di) formados em uma coluna por onde o meio reacional é refluxado. A separação deve ser feita por eluição seletiva, após o término da reação.

CONCLUSÃO

A produção de monoacilgliceróis por via enzimática, empregando lipases, pode ser alcançada de diversas formas. Entretanto, os resultados obtidos variam enormemente de acordo com a fonte da enzima utilizada, as condições da reação como temperatura, agitação, tempo de reação etc. e do meio reacional: relação molar entre os substratos, modificações dos reagentes, presença de tensoativos, etc.. Além disso, artifícios como uso de pressão reduzida (para controle da atividade de água) e remoção do produto do meio reacional podem contribuir de forma expressiva para o rendimento da reação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berger, M.; Schneider, M. 1993. Regioisomerically Pure Monoacylglycerol and Diacylglycerol as Synthetic Building-Blocks. *Fat Science and Technology*. 95 (5): 169-175.

Bornscheuer, U.W.; Stamatis, H.; Xenakis, A.; Yamane, T.; Kolisis, F.N. 1994. A Comparison of Different Strategies for Lipase Catalysed Synthesis of Partial Glycerides. *Biotechnology Letters*. 16 (7): 697-702.

Bornscheuer, U.W. 1995. Lipase-catalysed Syntheses of Monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*. 17(7): 578-586.

Chang, P.S.; Rhee, J.S.; Kim, J.J. 1991. Continuous Glycerolysis of Olive Oil by *Chromobacterium viscosum* Lipase immobilized on Liposome in Reversed Micelles. *Biotechnology Bioengineering*. 38 (10): 1159-1165.

Conley, A.J.; Kabara, J.J. 1973. Antimicrobial Action of Esters of Polihydric Alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4 (5): 501-506.

El, N.; Dandik, L.; Aksoy, H.A. 1998. Solvent Free Glycerolysis Catalysed by Acetone Powder of *Nigela sativa* Seed Lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 75 (9): 1207-1211.

Flenker, J.; Spener, F. 1990. DECHEMA – Biotechnology Conference. 1990. ptA v.4. 139-142.

Gancet, C. Catalysis by *Rhizopus arrhizus* Mycelial Lipase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 613 (dez/28): 600-604.

Goh, S.H.; Yeong, S.K.; Wang, C.W. 1993. Transesterification of Cocoa Butter by Fungal Lipases – Effect of Solvent on 1,3-specificity. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 70 (8): 567-570.

Heisler, A.; Rabiller, C.; Hublin, L. 1991. Lipase Catalysed Isomerization of 1,2-(2,3)-Diglyceride into 1,3-Diglyceride. The Crucial Role of Water. *Biotechnology Letters*. 13 (5): 327-332.

Holmberg, K.; Österberg, E.J. 1988. Enzymatic Preparation of Monoglycerides in Microemulsion. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 65 (9): 1544-1548.

Irimescu, R.; Furihata, K.; Hata, K.; Iwasaki, Y.; Yamane, T. 2001. Two-Step Enzymatic Synthesis of Docosahexanoic Acid-Rich Symmetrically Structured

Triacylglycerols via 2-Monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 78 (7): 743-748.

Kittikun, A.H.; Prasertsan, P.; Sungpud, C. 2000. Continuous Production of Fatty Acids from Palm Olein by Immobilized Lipase in a Two-Phase System. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 77(6): 599-603.

Kosugi, Y.; Tomizuka, N. 1995. Continuous Lipolysis Reactor with a Loop Connecting an Immobilized Lipase Column and an Oil-Water Separator. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 72(11): 1329-1332.

Li, Z.Y.; Ward, O.P. 1993. Lipase-catalysed Esterification of Glycerol and n-3 Polyunsaturated Fatty-Acid Concentrate in Organic Solvent. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 70 (8): 745-748.

Lyubachevskaya, G.; Boyle-Roden, E. 2000. Kinetics of 2-Monoacylglycerol Acyl Migration in Model Chylomicra. *Lipids*. 35(12): 1353-1358.

Macrae, A.R.; Visicchio, J.E.; Lanot, A. 1998. Application of Potato Lipid Acyl Hydrolase for the Synthesis of Monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 75(11): 1489-1494.

Mansur, A.W.; Hiler, G.D.; El-Nokaly, M. 1991. In: *Microemulsions and Emulsions in Foods*. ACS Symposium Series. V.448. 51-61.

McNeil, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. 1991. High-Yield Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 68(1): 1-5.

McNeil, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. 1990. Solid Phase Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in a High Yield of Monoglyceride. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 67(11): 779-783.

McNeil, G.P.; Yamane, T. 1991. Further Improvements in the Yield of Monoglycerides During Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 68(1):6- 10.

Miller, C.; Austin, H.; Poroske, L.; Gonzalez, J. 1988. Characteristics of an Immobilized Lipase for the Commercial Synthesis of Esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 65 (6): 927-931.

Paris, G.Y.; Cimon, D.G.; Garmaise, D.L.; Swett, L.; Carter, J.W.; Young, P.Y. 1980. Glycerides as Prodrugs III. Synthesis and Antiinflammatory Activity of [1-(p-cholobenzoyl)-

5-methoxy -2-methylindole-3-acetyl]glycerides (indomethacin glycerides). *Journal of Medicinal Chemistry*. 23(1): 9-13.

Petschow, B.W.; Batema, R.P.; Ford, L.L. 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Bactericidal Properties of Medium Chain Monoglycerides and Free Fatty Acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(2): 302-306.

Rosu, R.; Uozaki, Y.; Iwasaki, Y.; Yamane, T. 1997. Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-phase Glycerolysis of Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 74(4): 445-450.

Sakiyama, T.; Yoshimi, T.; Tanaka, A.; Ozaki, S.; Nakanishi, K. 2001. Analysis of Monoglyceride Synthetic Reaction in a Solvent Free Two-Phase System Catalysed by a Monoacylglycerol Lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(1): 88-90.

Schneider, M. 1992. World Patent WO9214830.

Tüter, M.; Aksoy, H.A. 2000. Solvent-free Glycerolysis of Palm and Palm Kernel Oils Catalysed by Commercial 1,3-Specific Lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of Glycerolysis Products. *Biotechnology Letters*. 22 (1): 31-34.

Vacek, M.; Zarevúcka, M.; Wimmer, Z.; Stránský, K.; Macková, M.; Demnerová, K. 2001. Enzymic Alcoholysis of Blackcurrant oil. *Biotechnology Letters*. 23 (1): 27-32.

van der Padt, A.; Keurentjes, J.T.F.; Sewalt, J.J.W.; van Dam, E.M.; van Dorp, L.J.; van't Riet, K. 1992. Enzymatic-Synthesis of Monoglycerides in a Membrane Bioreactor with an In-Line Adsorption Column. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 69 (8): 748-754.

Waldinger, C.; Schneider, M. 1996. Enzymatic Esterification of Glycerol III. Lipase-catalysed Synthesis of Regioisomerically Pure 1,3-sn-Diacylglycerols and 1(3)-rac-Monoacylglycerols Derived from Unsaturated Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 73(11): 1513-1519.

Wang, Y.F.; Lalonde, J.J.; Momongan, M.; Bergbreiter, D.E.; Wong, C.H. 1988. Lipase-Catalysed Irreversible transesterification Using Enol Esters as Acylating reagentes-Preparative Enantioselective and Regioselective Syntheses of Alcohols, Glycerol Derivatives, Sugars, and Organometallics. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 110 (21): 7200-7205.

Weiss, A. 1990. Enzymatic Preparation of solid Fatty-Acid Monoglycerides. *Fat Science and Technology*. 92 (10): 392-396.

Xu, X.B.; Skands, A.; Adler-Nissen, J. 2001. Purification of Specific Structured Lipids by Distillation: Effects on Acyl Migration. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 78(7): 715-718.

Yamagushi, S.; Mase, T. 1991. High-Yield Synthesis of Monoglyceride by Monoacylglycerol and Diacylglycerol Lipase from *Penicilium camambertii* U150. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72 (3): 162-167.

Yang, B.K.; Harper, W.P.; Parkin, K.L. 1993. Control of Lipase-Mediated Glycerolysis Reactions with Butteroil in Single Liquid-Phase Media with 2-methyl-2-propanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1899-1904.

Parte II – Estudo para Purificação e Caracterização Bioquímica da Lipase de *Rhizopus* sp.

Capítulo 3

Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Lipase Produced by a New Strain of *Rhizopus* sp.

Capítulo 4

Purificação Parcial da Lipase de *Rhizopus* sp. por Dois Diferentes Métodos Cromatográficos

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AN EXTRACELLULAR LIPASE PRODUCED BY A NEW STRAIN OF *RHIZOPUS* SP.

ABSTRACT

The present study had as a goal to purify and characterize the lipolytic fraction secreted by a strain of *Rhizopus* sp. Only 3 steps of purification were necessary to achieve SDS-PAGE homogeneity. One band with 37.5 KDa molecular mass and with 1446 U/mg specific activity was obtained. The purified fraction presented 2 lipase isoforms; both showed optimum activity at 50°C, but at pH values of 5.6 and 7.0 and isoelectric points of 4.3 and 4.5. The lipase was stable between 6.5 and 7.5 pH values and at temperatures below 50°C and also kept its activity in hexane. The lipase was inactivated by Hg⁺² and by n-bromosuccinimide and activated by Na⁺.

KEYWORDS: lipase, *Rhizopus* sp., purification, biochemical characterization

INTRODUCTION

Lipases are enzymes belonging to the group of serine hydrolases (E.C. 3.1.1.3). Their natural substrates are triglycerides and their mode of action is similar to that of the esterases. However, their activity is considerably increased when they are located at the polar/non polar interface. The lipases are able to catalyze hydrolysis, esterification, transesterification and lactonization (intramolecular esterification) (Park *et al.* 1998; Carvalho and Pastore 1998). This flexibility, allied to the possibility of different substrate specificity among the different lipases, gives these enzymes an enormous potential for applications (Gandhi *et al.* 2000). Besides their industrial application possibilities, the lipases are linked to the deterioration of some products, mainly dairy products and oils, and the identification and study of their mode of action may aid in the solution of these problems (Hiol *et al.* 2000).

Lipases can be found in animal and vegetable cells and they can also be produced by microorganisms. From the industrial point of view these are considered to be of greater importance, due to their great production potential on a large scale and to the capacity of deterioration of microorganisms (Gandhi 1997). This work reports on the characterization of a lipase secreted by a *Rhizopus sp.* strain isolated in the Laboratory of Bioaromas - UNICAMP, the methodology for purifying this enzyme and on the biochemical characterization of fraction obtained in the purification process.

MATERIAL AND METHODS

Enzyme preparation: 1 mL of spore suspension, from a culture in BDA medium after 72 hours incubation, was inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 20 g of wheat bran and water (60:40 w/w). These flasks were incubated at 30°C for 120 hours and the lipase produced was extracted with distilled water, followed by filtration.

Purification steps: Ammonium sulfate was added to the culture broth up to 70% saturation, centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes and the resulting precipitate dialyzed against distilled water for 48 hours at 4°C. The product obtained was freeze dried and maintained at -10°C. This freeze dried enzyme preparation was dissolved in sodium acetate buffer (pH=5.6; 50 mmol/L) to a concentration of 50 mg/mL, centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes and filtrate through acetate membrane (pore: 0.22 µm).

A pre-packed Q *Sepharose* fast flow column of 5 mL of internal volume was employed for the anionic exchange chromatographic step. The injection consisted of 1 mL of crude enzyme and elution was achieved using a non-linear NaCl gradient, with a final concentration of 1 mol/L of the salt and a flow rate of 5 mL/min. Fractions of 5 mL were collected. Active fractions were pooled, dialyzed against water and freeze-dried.

This partially purified lipolytic fraction was dissolved in sodium acetate buffer (pH=5.6; 50 mmol/L) containing 0.15 mol/L NaCl to a concentration of 20 mg/mL and filtrated through acetate membrane (pore: 0.22 μ m). 1 mL of this preparation was loaded to a pre-packed *Sephacryl* S200 column (60 cm height of the gel bed and internal volume of 120 mL) for the gel filtration chromatographic step. Elution was achieved at a flow rate of 0.3 mL/min and fractions of 2.4 mL were collected. A FPLC equipment (Amersham Pharmacia Biotech) was employed in all chromatographic steps.

Protein content: Protein was estimated colorimetrically according to Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard. In the chromatography separation, the protein concentration in the fraction was routinely estimated by measuring the absorbance at 280 nm.

Lipase detection – assay of esterase activity: Enzyme activity was assayed spectrophotometrically using p-nitrophenyllaurate (p-NPL) as substrate, according to Lin *et al.* (1995). The substrate solution was prepared by dissolving 161 mg of p-NPL in 80 mL of 5 mmol/L acetate buffer pH 5.6 containing 1% Triton X-100. Assays were performed by adding 0.45 mL of 100 mmol/L acetate buffer pH 5.6 (except where otherwise stated) and 0.05 mL of the enzymatic solution to 0.50 mL of the substrate solution in a final volume of 1 mL. Incubations were performed at 40°C for 15 minutes and the reaction stopped by the addition of 2 mL acetone. The release of p-nitrophenol was measured at 410 nm against a blank in which the enzyme was added after the addition of acetone, using a DU-640 spectrophotometer (Beckman Coulter). One enzyme unit corresponded to the release of one μ mol/L of p-nitrophenol per minute under the assay conditions.

Analytical gel electrophoresis: SDS-PAGE was run on a Bio-Rad Mini-Protean II Dual Slab Cell, following the manufacturer's instructions. Analyses were performed using 4% stacking gel and 12% separating gel in the presence of 0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), according to Laemmli (1970). The gels were stained with Coomassie Brilliant

Blue R-250. For the estimation of the molecular mass of the enzyme, the following proteins were used as markers: phosphorylase (94KDa), serum albumin (67KDa), ovalbumin (43KDa), soybean trypsin inhibitor (20KDa) and lysozyme (14.4KDa).

Determination of molecular mass by gel filtration: The calibration curve was prepared using the following proteins as standards: phosphorilase b (94 KDa); serum albumin (67 KDa); ovalbumin (43 KDa); carbonic anhidrase (30 KDa) and soy trypsin inhibitor (20.1 KDa). Void volume was determined using blue dextran. Molecular mass of the lipase from *Rhizopus* sp. was calculated from the regression curve where the log of the molecular mass of each standard was plotted against the ratio of the elution volumes of the standards and the void volume (V_e/V_0).

Effect of pH values and of the temperature on the activity and stability of the lipase: The optimal temperature for the hydrolysis of p-nitrophenyllaurate was determined by measuring the rate of reaction at temperatures ranging from 30 to 70°C under standard assay conditions, at pH 5.6. Controls were performed adding the enzyme after the addition of acetone. For studying thermal stability, the enzyme was incubated at temperatures ranging from 30 to 70°C for 1 hour. Aliquots were taken after incubation and the residual activity determined. The optimal pH for enzyme activity was determined by measuring p-nitrophenyllaurate hydrolysis at pH values ranging from 3.6 to 9.0 in various buffers, at 40°C. The effect of pH on lipase stability was studied by measuring residual activity at pH 5.6, after 24 hours incubation at pH values ranging from 3.6 to 9.0, at 25°C.

Isoelectric focusing: isoelectric point determination was run on IPG (immobilized pH gradient) strips with non-linear separation range of 3-10 (Amersham Biosciences), according to manufacturer's instructions. Proteins were detected using standard Coomassie Blue staining and isoelectric point was determined according to a calibrating curve supplied by the manufacturer.

Analytical RP-HPLC of purified lipase: the purified lipase preparation was analyzed for homogeneity by RP-HPLC under the following conditions: column – Bondapack (preparative scale; 7.8x300mm); flow rate 1 mL/min; initial solution (sol A): 0.1% TFA in water, elution: linear gradient with solution B (60% acetonitrile in sol. A); total volume: 50 mL. Protein was detected at 280 nm.

K_m and V_{max} determination: Michaelis-Menten constants for the lipase substrate p-NPL were determined by incubating the purified enzyme with concentrations of the substrate ranging from 0.1 to 3.0 mmol/L. The constant values were calculated according to the Lineweaver-Burk graphic method.

Determination of lipase activity and specificity: lipolytic activity on different triacylglycerols was determined titrimetrically using 10 mmol/L KOH as titrant. The reaction medium contained 0.1 g tributyrin, tricaprylin, trilaurin, triolein, or tristearin as synthetic substrates and coconut fat, olive oil or cow's milk cream (25% fat) as natural substrates, dispersed by stirring in 1 mL of 50 mmol/L sodium acetate buffer pH=5.6. Hydrolysis was measured at 50°C and 150 rpm for 60 minutes. The reaction was initiated by the addition of enzyme and terminated by the addition of 15 mL of acetone/ethanol (1:1 v/v). Controls were carried as above but the enzyme solution was added after the acetone/ethanol solution. One enzyme unit corresponded to the release of one μ mole of fatty acid per minute under the assay conditions.

Stability in organic solvents: 1 mg of the purified enzyme was incubated in the presence of 1 mL of different organic solvents for 1 hour, under refrigeration. Control was kept in buffer solution (pH=7.0, 0.05 mol/L). After this time the solvents were evaporated with Nitrogen and the enzyme dissolved in buffer solution (pH=7.0, 0.05 mol/L). Residual activity was measured by the standard assay system.

The effect of inhibitors/effectors: the purified lipase was incubated with various compounds (1 mmol/L) at 30°C for 1 hour. The remaining activity was measured using the standard assay system.

RESULTS AND DISCUSSION

Enzyme production and purification

Hiol *et al.* (2000) studied a lipase from *Rhizopus oryzae* strain and found the maximal enzyme concentration corresponded to 120 U/mL lipolytic activity. In a previous work of the same research group (1999) a strain of *Mucor hiemalis* produced less than 100 U/mL and the enzyme extraction involved a defatting step with hexane. The strain of *Rhizopus sp.* reported in the present work generated 579.4 U/mL of lipolytic activity in the

extraction broth. Therefore the strain in question was considered to be a very good lipase secretor. It must also be taken into account that the solid fermentation medium is very inexpensive (by product of the flour industry) and that the enzyme extraction is extremely easy.

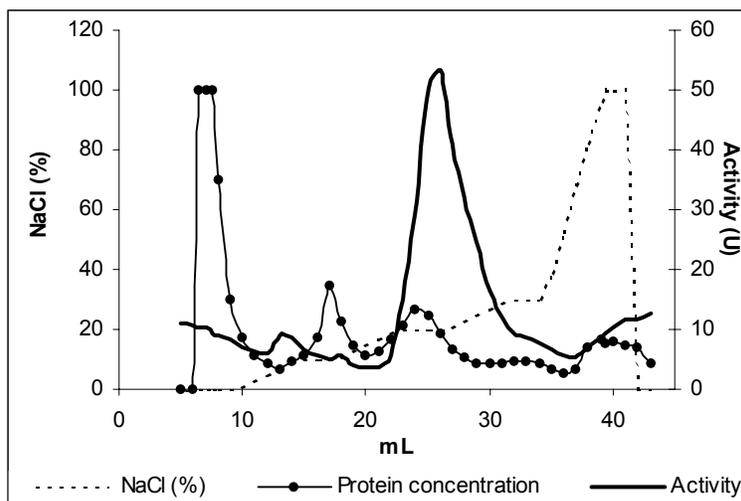


Figure 1: Chromatography of lipase from *Rhizopus* sp on Q Sepharose

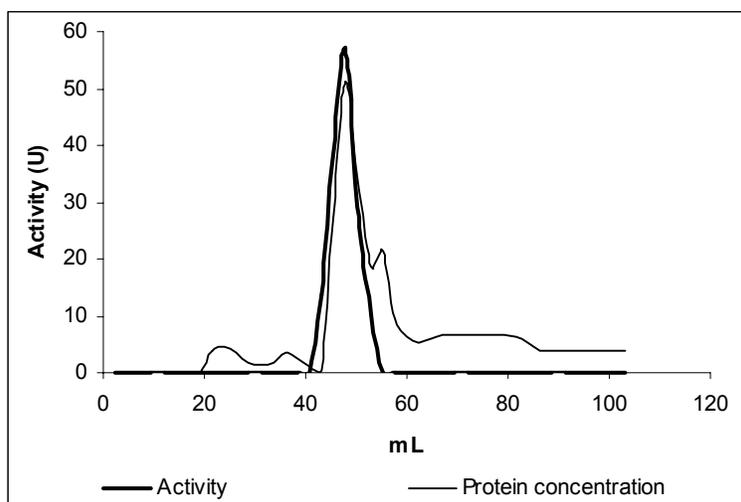


Figure 2: Chromatography of lipase from *Rhizopus* sp on Sephacryl S200.

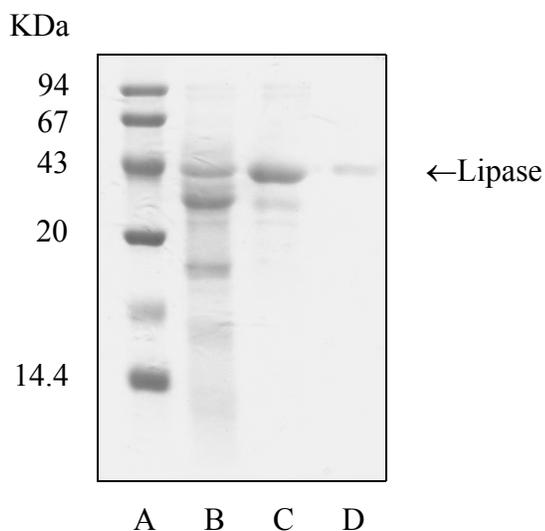


Figure 3: SDS-PAGE of *Rhizopus* sp lipase at various stages of purification. Lane A: molecular weight markers; lane B: crude extract; lane C: Q *Sepharose*; lane D: *Sephacryl* S200.

Table 1: Summary of the purification of lipase from *Rhizopus* sp.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Extraction broth	1245710.0	8342.0	149.3	1.0	100.0
Ammonium sulfate fraction	619019.5	3010.2	205.6	1.4	49.7
Q <i>Sepharose</i>	907892.0	684.4	1326.6	8.9	72.9
<i>Sephacryl</i>	3071.3	2.1	1446.0	9.7	0.25

Only three purification steps were required to reach SDS-PAGE homogeneity. The purified lipase showed specific activity of 1446 U/mg, with a 9.7-fold purification. The final specific activity obtained here was high compared to some fungal lipases, e.g. 63 U/mg for *Pythium ultimum* lipase (Mozaffarand and Weete 1993), 189 U/mg for *R. oryzae* and 11.1 U/mg for *R. rhizopodiformis* lipases (Razak *et al.* 1997) and although

purification fold and yield (table 1) seem rather low, they are similar to other published data (Razak *et al.* 1997; Kermasha *et al.* 1998).

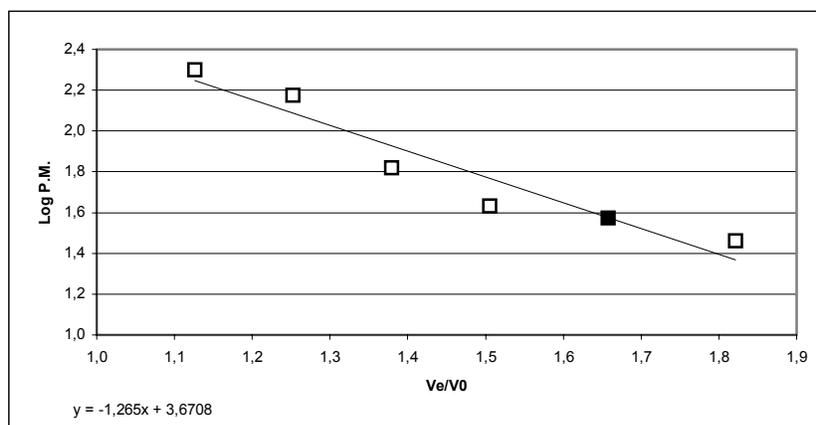


Figure 4: Molecular mass regression curve for *Sephacryl* S200 column. Black spot corresponds to *Rhizopus* sp. lipase. Other spots correspond to standards.

As shown in Figure 2, upon analytical SDS-PAGE, the purified enzyme, appeared as a single band with molecular mass around 40 KDa. Upon gel filtration, a single peak of lipase activity was eluted and corresponded to a protein of molecular mass of 37.5 KDa (Figures 1 and 3). These results indicate that the enzyme is a monomer. Other fungal lipases present molecular masses around the same value, e.g. *Aspegillus niger* 35.5 KDa (Namboodiri and Chattopadhyaya, 2000); *Ophistoma piceae* 37 KDa (Gao and Breuil 1998); *Mucor hiemalis* 49 KDa (Hiol *et al.* 1999).

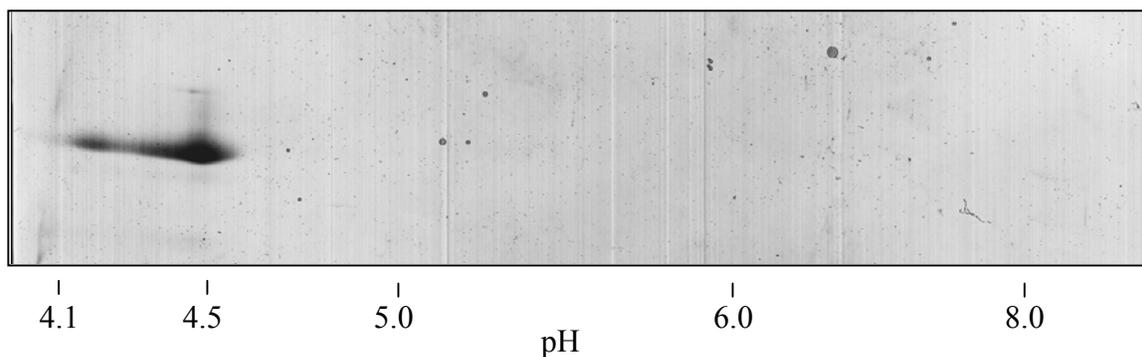


Figure 5: Isoelectric point of both isoenzymes from *Rhizopus* sp. lipolytic fraction.

In contrast to SDS-PAGE, where only one protein band was resolved on the gel, two protein bands at pI values 4.3 (minor) and 4.6 (major) were observed after IEF (Figure 4). Since both bands appeared to be lipolytically active (see Figure 6 and discussion below) the two bands probably represent isoforms of the lipase. The presence of multiple lipases was also reported for *Pythium ultimum* lipase (Mozaffar and Weete 1993) and for *Ophistoma piceae* lipase (Gao and Breuil 1998).

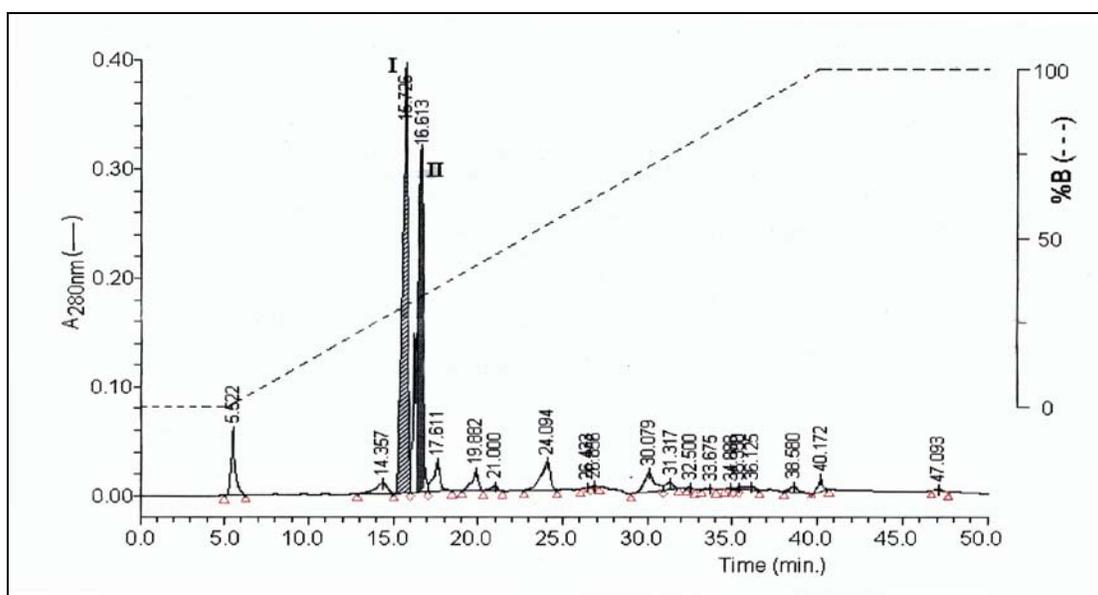


Figure 6: HPLC chromatogram for the purified lipolytic fraction produced by *Rhizopus* sp.

The presence of two major proteins in the sample was confirmed by analytical reversed-phase HPLC. The little difference between their retention times might indicate a strong similarity of both lipases.

Biochemical Characterization

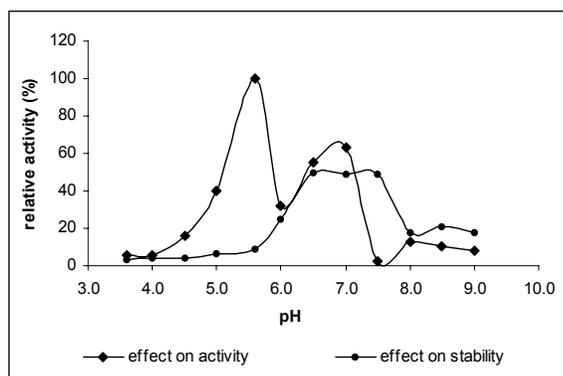


Figure 7: Effect of pH on the activity and stability of lipase from *Rhizopus* sp.

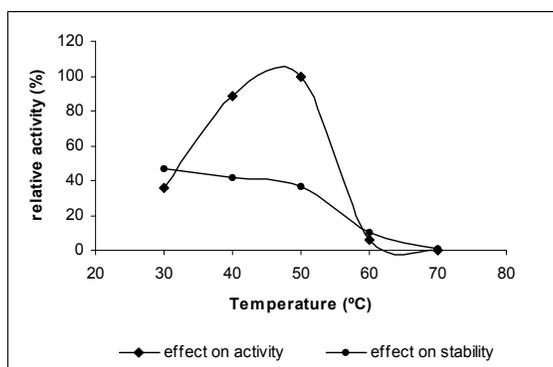


Figure 8: Effect of temperature on the activity and stability of lipase from *Rhizopus* sp.

The optimal temperature for the lipase activity was 50°C. This result agrees with those obtained by Pastore *et al* (2003) when studying the partially purified lipase from the same source. According to Razak *et al.* (1997) very few fungal lipases exhibit temperature optima above 40°C, thus the extracellular lipase from *Rhizopus* sp. may have potential in high temperature reactions. The enzyme was stable at temperatures below 50°C keeping at least 40% of its activity after 1h treatment.

The purified lipase showed two different optima pH values: 5.5 and 7.0. This may indicate that both proteins revealed by IEF and RP-HPLC have lipolytic activity, each one presenting an optimal pH value. Since the isoenzymes seem to be very similar (same molecular mass, same optimal temperature and similar hydrophobicity) it would be very useful to protein engineering to verify their structural differences. The lipase was stable over a pH range of 6.5-7.5.

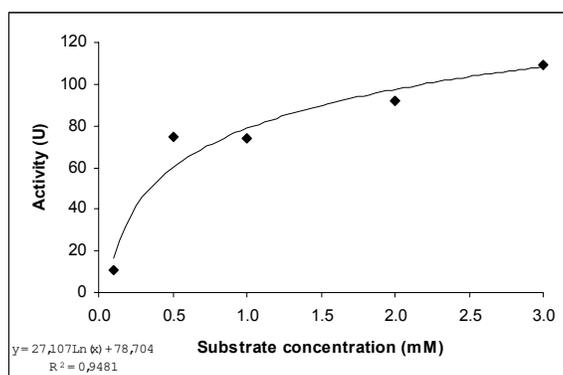


Figure 9: Graphic method of Michaelis & Menten for the calculation of V_{max} and K_m .

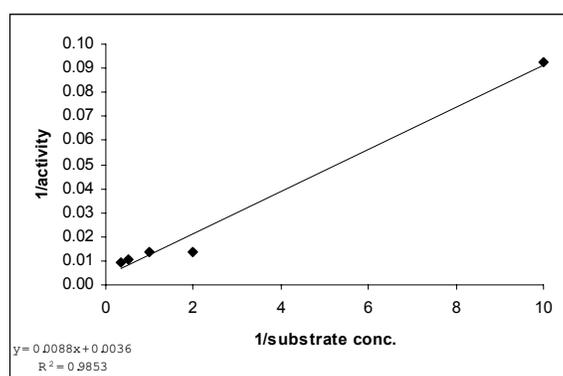


Figure 10: Graphic method of Lineweaver & Burk for the calculation of V_{max} and K_m .

The kinetic studies of the purified enzyme showed a K_m value of 2.4 mmol/L and a V_{max} value of 277.8 U for the synthetic substrate *p*-NPL.

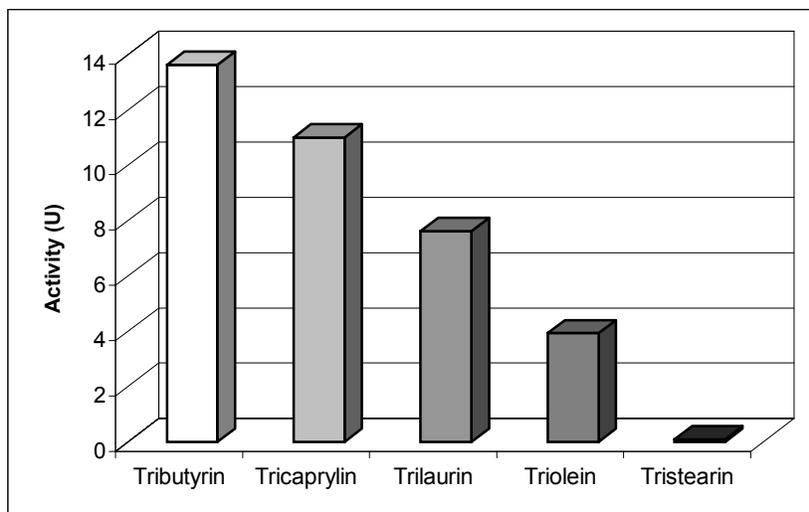


Figure 11: activity of *Rhizopus* sp. lipase against different synthetic triacylglycerols.

The purified lipase hydrolyzed all triacylglycerol tested, and highest activity was obtained with tributyrin. Activity decreased with the increase of the chain length although even tristearin could be hydrolyzed by the enzyme. Hydrolysis of natural fats and oils followed the same pattern. According to Gao and Breuil (1998) this substrate specificity is shared by the majority of the fungal lipases.

Table 2: Specificity of lipase from *Rhizopus* sp in respect of various lipids.

Substrate	Relative activity (%)
Tributyrin	100.0
Tricaprylin	80.8
Trilaurin	55.9
Triolein	28.8
Tristearin	0.6
Olive oil	3.4
Coconut fat	25.1
Milk cream (25% fat)	71.2

Table 3: Effect of different compounds on the activity of the purified lipase

Compound (1 mmol/L)	Relative Activity (%)
K ₂ SO ₄	119
NaCl	118.8 ^b
Na ₂ SO ₄	113
HgCl ₂	1.8 ^a
ZnSO ₄	107
CoCl ₂	113
MnSO ₄	109
FeSO ₄	71.3
MgSO ₄	107
CaCl ₂	84.3
FeCl ₃	89.7
CuSO ₄	109.5
EDTA	107
2-mercaptoethanol	107.1
Cystein chlorydrat	124.2
Sodic azide	128.6
Bissulfito de sódio	131.2
Iodamide	125.3
n-bromosuccinimide	45.5 ^a
Benzoic acid	126
Buffer (7.0, 50 mmol/L)	100

^a differ significativelly – p= 0.095

^b differ significativelly – p= 0.090

As shown in Table 3, Hg⁺² strongly inhibited the lipase activity and Na⁺¹ lightly enhanced it. Other compounds did not affect the activity of the enzyme, which suggests that the lipase is not a metalloenzyme and that sulphhydryl groups are not essential to this lipase stability or activity. The exception was n-bromosuccinimide which, according to Garrett

and Grisham (1995) inhibits enzymes that contain histidine, tryptophan and / or tyrosine residues in the active site.

Table 4: Stability of the purified lipase in different organic solvents

Solvent	Relative Activity (%)
Hexane	94
Ethanol	27 ^a
Methanol	0.75 ^a
Acetone	25 ^a
Buffer (7.0, 50mmol/L)	100

^a differ significantly – p= 0.095

The stability of lipase in organic solvents offers advantages for enzyme precipitation and synthesis. As shown in Table 4, the *Rhizopus* sp. lipase had good stability in hexane but was highly denatured in hydrophilic solvents, especially methanol. This behaviour was also observed by Hiol *et al.* (1999, 2000) for *M. hiemalis* and *R. oryzae* lipases.

CONCLUSION

The *Rhizopus* sp. lipase could be purified to SDS-PAGE homogeneity, although the lipolytic fraction seemed to contain two lipase isoforms. This fraction was purified 9.7-fold, and presented 0.25% yield. The lipase studied showed a high optimum temperature and also good stability in hydrophobic solvents which makes it a good candidate for esterification reactions in organic media. Among the substrates tested the enzyme showed better activity against short to medium chain fatty acids, suggesting that future catalysis assays should be conducted applying substrates with 12 C or less carbon chains.

REFERENCES

Carvalho, P.O.; Pastore, G.M. 1998. Enrichment of gamma linolenic acid from fungal oil by lipase. Food Biotechnology. 12 (1): 57-71.

Gandhi, N.N.; Patil, N.S.; Swant, S.B.; Joshi, J.B. 2000. Lipase-catalysed esterification. *Catalysis Reviews – Sci.Eng.* 42(4): 439-480.

Gao, y.; Breuil, C. 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophistoma piceae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 14: 421-429.

Garrett, R.H.; Grisham, C.M. 1995. *Biochemistry.* Saunders College Publishing.

Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Druet, D.; Comeau, L.C. 1999. Production, purification and characterization of an extra cellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology.* 25: 80-87.

Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. 2000. Purification and characterization of an extra cellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology.* 26: 421-430.

Kermasha, S.; Safari, M.; Bisakowski, B. 1998. Characterization of purified lipase fractions from *Rhizopus niveus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 46: 4451-4456.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.

Lin, S.F.; Chiou, C.M.; Tsai, C.Y. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnology letters.* 17(9): 959-962.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the phenol folin reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 193: 265-275.

Mozaffar, Z.; Weete, J.D. 1993. Purification and properties of an extracellular lipase from *Phytium ultimum*. *Lipids.* 31: 379-384.

Namboodiri, V.M.H.; Chattopadhyaya, R. 2000. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids.* 35(5): 495-502.

Pastore, G.M.; Koblitz, M.G.B.; Costa, V.S.R. 2003. Produção, Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos – Agosto. IN PRESS.*

Razak, C.N.A; Salleh, AB.; Musani, R.; Samad, M.Y.; Basri, M. 1997. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 3: 153-159.

PURIFICAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE *RHIZOPUS* SP. POR DOIS DIFERENTES MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

RESUMO

Lipases, especialmente as de origem microbiana, são largamente utilizadas em processos e na obtenção de produtos para as indústrias química, cosmética, farmacêutica e alimentícia. A produção de enzimas de elevada pureza é importante, principalmente, do ponto de vista do controle dos processos (ausência de interferentes), porém as etapas necessárias à purificação, em geral, provocam perdas na atividade das enzimas e aumentam seu custo final. O objetivo deste trabalho foi propor a melhor metodologia de purificação para a lipase de *Rhizopus* sp. através do teste de dois diferentes métodos cromatográficos (troca iônica e interação hidrofóbica) e ainda verificar o melhor design estatístico para caracterização bioquímica da mesma. Foi possível purificar parcialmente a lipase de *Rhizopus* sp. com o uso de coluna de DEAE *Sepharose* (troca aniônica) e de FENIL *Sepharose* (interação hidrofóbica). A primeira, embora mais seletiva para a enzima em questão, parece provocar redução de sua atividade. A presença de maiores concentrações de íons Na^{+1} na fração purificada por FENIL *Sepharose* parece contribuir para o aumento de atividade da lipase. Embora os resultados obtidos por análise multivariável para determinação das características bioquímicas da lipase sejam compatíveis com a análise univariável aquele planejamento não foi considerado indicado no presente caso.

PALAVRAS-CHAVE: purificação, lipase, métodos cromatográficos, troca iônica, interação hidrofóbica

ABSTRACT

PARTIAL PURIFICATION OF THE LIPASE FROM *RHIZOPUS* SP. BY TWO DIFFERENT CHROMATOGRAPHIC METHODS. Lipases, especially of microbial origin, are widely applied in processes and in the production of insumes for the chemical, cosmetic, pharmaceutical and food industries. To produce highly pure enzyme is important to process control (absence of interferentes). However the necessary stages to the purification, in general, cause losses of activity and increases enzyme's final cost. The aim of this work was to

consider the best methodology of purification for the *Rhizopus* sp. lipase through the test of two different chromatographic methods (ion exchange and hydrophobic interaction) and also to verify the best statistical design for the biochemical characterization of the enzyme. It was possible to partially purify the *Rhizopus* sp lipase applying a DEAE *Sepharose* (anionic exchange) column and a PHENYL *Sepharose* (hydrophobic interaction) column. The first, although more selective for the enzyme in study, seems to cause reduction of its activity. The presence of higher concentrations of Sodium ions in the PHENYL *Sepharose* fraction seems to contribute for an increased activity of the lipase. Although the results obtained through the factorial design for the biochemical characteristics of the lipase were compatible with the single variable analysis, that statistical approach should not be indicated in the present case.

KEYWORDS: purification, lipase, chromatographic methods, ion exchange, hydrophobic interaction

INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (EC 3.1.1.3). Os triacilgliceróis (principais componentes de óleos e gorduras) são seus substratos naturais com conseqüente liberação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos (Borgston 1984). A função biológica das lipases é hidrolisar ésteres, no entanto, lipases também são capazes de catalisar reações de síntese dependendo, para isso, de baixa atividade de água no meio reacional (Villeneuve *et al.* 2000).

Devido à variedade de reações que catalisam, as lipases têm inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, química, farmacêutica e em muitas outras. Atualmente o maior empecilho ao uso de lipases em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador, entretanto os recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de modificação e imobilização de lipases têm grande possibilidade de mudar este quadro num futuro próximo (Gandhi 1997).

A purificação de lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da enzima virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com maior atividade específica (unidades de atividade/mg de proteína) para aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final

Segundo Palekar *et al.* (2000) nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas com grande capacidade de troca e baixo custo. Estão aí incluídas as resinas de troca iônica e de interação hidrofóbica. Estas últimas têm sido aplicadas com excelentes resultados na purificação de lipases e apresentam a vantagem adicional de dispensarem diálise de extratos precipitados pela adição de sais. Nas etapas finais de purificação em geral são aplicadas colunas de filtração em gel, que garantem a remoção de produtos de degradação sofrida pela enzima ao longo da purificação, mas que provocam diluição do produto final, exigindo uma etapa de concentração posterior.

O objetivo do presente trabalho é a comparação do uso de troca iônica e interação hidrofóbica para purificação da lipase de *Rhizopus* sp. e do uso de diferentes planejamentos estatísticos (multivariável e univariável) para o estudo das características bioquímicas da enzima parcialmente purificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da Enzima: 1 ml de suspensão de esporos, obtida de cultura em BDA (batata, dextrose, ágar) inclinado após incubação por 72 horas, foi inoculado em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 20 g de meio de cultura composto por farelo de trigo e água (60:40 p/p). O meio foi mantido a 30⁰C por 120 horas e após este tempo a lipase foi extraída com água destilada, seguida de filtração em gaze.

Purificação da Enzima:

Para cromatografia de troca iônica: o caldo de cultura foi adicionado de sulfato de amônio até 80% de saturação. Após 12 horas sob refrigeração o caldo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O precipitado formado foi dialisado contra água destilada por 48 horas a 4⁰C. O produto assim obtido foi liofilizado e estocado a -10⁰C.

Para cromatografia de interação hidrofóbica: a precipitação foi alcançada por adição de sulfato de sódio até 80% de saturação. Após 12 horas sob refrigeração o caldo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O precipitado formado foi adicionado de tampão (fosfato de sódio pH=7,0, 0,05 mol/L) até a completa dissolução, filtrado em membrana de poro 0,45 mm e estocado a - 10⁰C.

Cromatografia de troca iônica: Para esta etapa de purificação, o extrato liofilizado foi dissolvido em tampão (fosfato de sódio pH=7,0, 0,05 mol/L) na concentração de 50 mg/mL e filtrado em membrana de poro 0,45 mm. Para a cromatografia foi utilizada uma coluna manualmente empacotada com DEAE *Sepharose* “fast flow”, de 10 ml de volume interno. A injeção consistiu de 1 mL da solução de enzima e a eluição foi atingida por gradiente não linear de NaCl, com patamares nas concentrações de 0,1 mol/L, 0,2 mol/L e 0,3 mol/L e concentração final de 1 mol/L do sal.

Cromatografia de interação hidrofóbica: Foi utilizada uma coluna manualmente empacotada com FENIL *Sepharose* “fast flow”, de 10 mL de volume interno. A injeção consistiu de 1 mL da solução de enzima e a eluição foi alcançada por gradiente linear Na₂SO₄ com concentração inicial de 1 mol/L do sal.

Em todas as etapas cromatográficas foi utilizado um equipamento de FPLC (fast protein liquid chromatography – Amersham Pharmacia).

Análise dos resultados: Todos os produtos obtidos durante a purificação da enzima foram submetidos a ensaios para medida da concentração de proteína pelo Método de Lowry

(1951) tendo-se albumina de soro bovino como padrão. Durante a eluição cromatográfica, os picos protéicos foram monitorados por absorção a 280 nm. A determinação da atividade enzimática de todos os produtos, assim como a localização da enzima de interesse no cromatograma foi feita através da metodologia descrita por Lin *et al.* (1995). Considerou-se 1 (uma) unidade de atividade a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol/L}$ de p-nitro-fenol, por minuto de reação, por mL de amostra. Para verificação do grau de purificação da enzima foram realizados ensaios eletroforéticos de proteína desnaturada (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Determinação da atividade de protease: realizada segundo Obata *et al.* (1977), usando caseína como substrato.

Caracterização bioquímica: Para verificação do pH e da temperatura ótimos e de estabilidade das frações parcialmente purificadas foi utilizado um planejamento estatístico experimental multivariável baseado na análise de superfície de resposta. Para geração da planilha de ensaios e análise dos resultados foi aplicado o *Software* STATISTICA (versão 5.0).

Tabela 1: Planilha de ensaios

Ensaio	pH	Temp.(°C)
1	3,0	19
2	8,0	19
3	3,0	61
4	8,0	61
5	5,6	10
6	5,6	70
7	2,0	40
8	9,0	40
9	5,6	40
10	5,6	40
11	5,6	40
12	5,6	40
13	5,6	40

Foi utilizado um planejamento fatorial completo com cinco pontos centrais. Para determinação da temperatura e do pH ótimos foram feitas medidas de atividade nos parâmetros determinados, com 15 minutos de reação. Para determinação da temperatura e

do pH de estabilidade a enzima foi mantida nos parâmetros determinados por 1 hora e foi medida a atividade residual em pH 5,6 e a 50°C.

Para efeito de comparação, as características bioquímicas da enzima parcialmente purificada por DEAE *Sepharose* foram também determinadas pelo método univariável utilizando-se temperaturas na faixa entre 30 e 70°C e valores de pH entre 3,6 e 9,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação

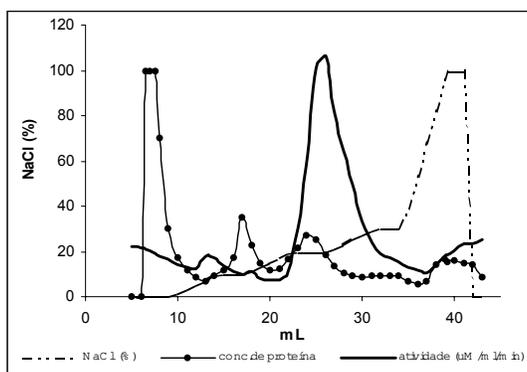


Figura 1: Cromatograma obtido para purificação por DEAE Sepharose

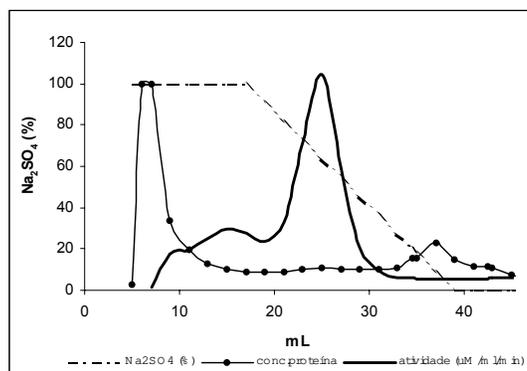


Figura 2: Cromatograma obtido para purificação por e FENIL Sepharose

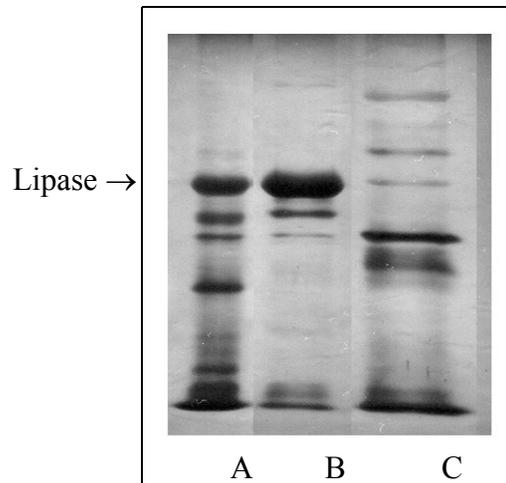


Figura 3: Eletroforese em gel de SDS-PAGE – amostras: enzima bruta (linha A); DEAE Sepharose (linha B); FENIL Sepharose (linha C)

A lipase de *Rhizopus* sp. pôde ser purificada pelas duas colunas propostas, uma vez que foi retida seletivamente pelas mesmas e pôde ser eluída com facilidade pelos gradientes de sal utilizados.

A coluna de FENIL *Sepharose* apresenta a vantagem de dispensar a etapa de diálise, após a precipitação com sal, o que representa economia de tempo, energia (a diálise deve ser feita em ambiente refrigerado) e aumenta as chances de manutenção da atividade enzimática (Palekar *et al.*, 2000). Pela observação da Figura 2 esperava-se obter uma fração bastante pura após utilização da coluna de FENIL *Sepharose*, uma vez que o pico de atividade é muito acentuado e o de proteína é praticamente imperceptível. Entretanto, após ensaio em SDS-PAGE (Figura 3) verifica-se que a suposição acima não se concretizou e que a coluna de DEAE *Sepharose* parece ser mais seletiva para a lipase em questão, como pode ser observado na figura 3.

Tabela 2: Resumo da purificação por DEAE *Sepharose*

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação	Recuperação (%)
Caldo de cultura	17620289,86	11228,57	1569,24	1,00	100,00
Enzima bruta	4217391,30	791,07	5331,24	3,40	23,93
<i>DEAE</i>	74530,6	12,18	6119,1	3,90	0,42

Tabela 3: Resumo da purificação por FENIL *Sepharose*

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação	Recuperação (%)
Caldo de cultura	17620289,86	11228,57	1569,24	1,00	100,00
Enzima bruta	3567536,23	442,07	8070,04	5,14	20,25
<i>FENIL</i>	69855,07	6,50	10746,93	6,85	0,40

Nas tabelas de purificação acima verificam-se diferenças entre os valores obtidos para enzima bruta. Isto se deve, provavelmente, à presença de sódio na preparação destinada à purificação por interação hidrofóbica, uma vez que este íon tem a propriedade de ativar a lipase de *Rhizopus* sp.

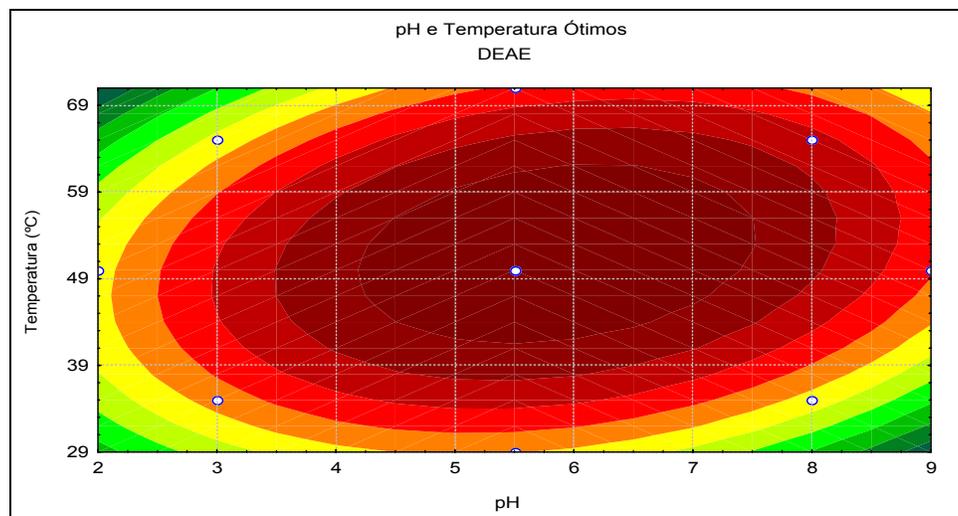
De acordo com as tabelas 2 e 3, a purificação por coluna de FENIL *Sepharose* proporciona uma maior purificação em relação ao uso de troca iônica, o que é devido à maior atividade da fração conseguida por interação hidrofóbica e à menor concentração de proteína presente na mesma. Estes resultados são, de certa forma, contraditórios aos observados na Figura 2. Isto pode ser devido a dois fatores: à redução da atividade da lipase, em consequência da perda de sua fração glicosídica, em contato com a coluna de troca aniônica (Borgston, 1984) e à ativação sofrida pela enzima quando em meio rico em sódio.

A determinação de atividade de protease na fração lipolítica parcialmente purificada é importante para se estimar a estabilidade da fração ao longo do tempo. É desejável que o

método de purificação seja capaz de eliminar as proteases para garantir que não haverá hidrólise da enzima de interesse durante o armazenamento. No presente trabalho, ambas as colunas testadas foram capazes de separar a fração lipolítica da proteásica, não restando na fração coletada qualquer sinal da atividade proteolítica encontrada na enzima bruta, que era de 1,16 U/mL.

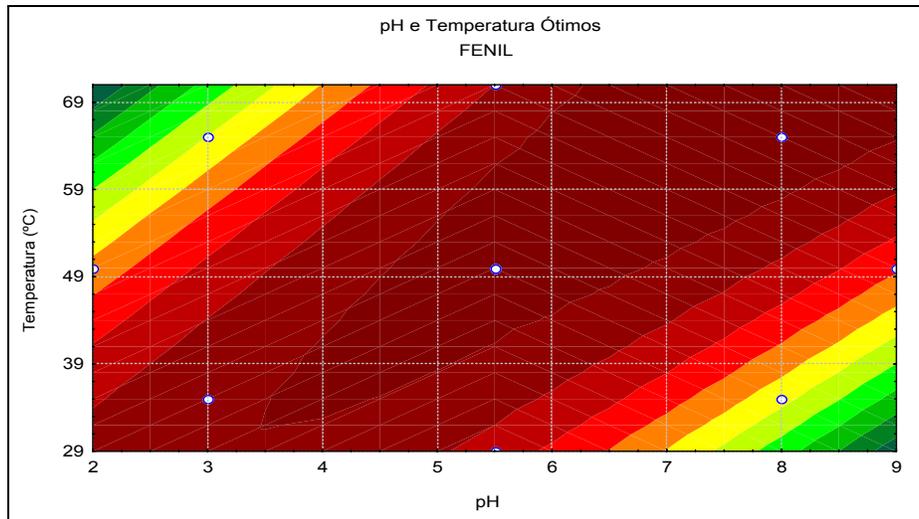
Caracterização Bioquímica

Análise Multivariável



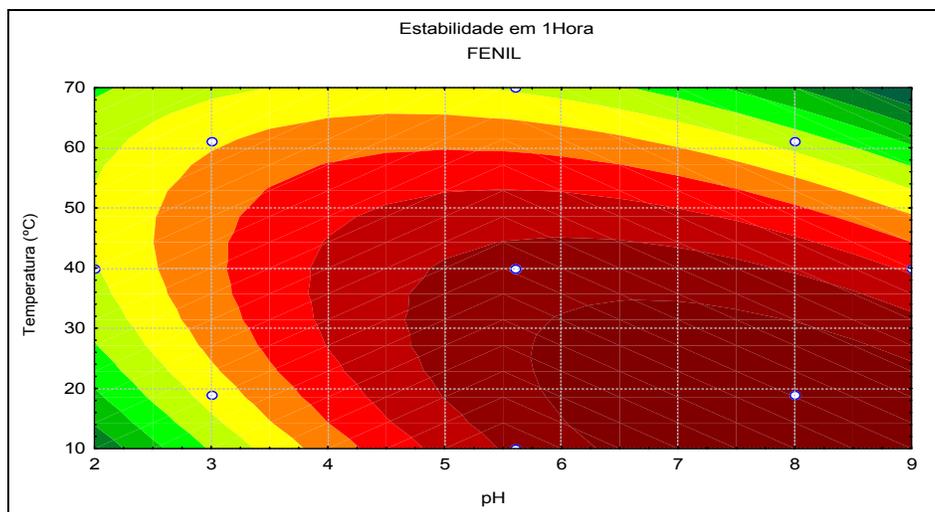
Fator	Soma Q	GL	Média Q	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	72130,84	5	14426,17	12,81	3,97	3,22
Resíduo	7880,69	7	1125,81			
Falta de ajuste	7768,29	3				
Erro puro	112,39	4			R ² =0,90	
Total	80011,53	12			p=0,099	

Figura 4: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em coluna de DEAE *Sepharose* – pH e temperatura ótimos



Fator	Soma Q	GL	Média Q	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	115009,44	3	38336,48	29,63	3,86	7,68
Resíduo	11644,84	9	1293,87			
Falta de ajuste	9948,67	5				
Erro puro	1696,18	4			$R^2=0,90$	
Total	126654,28	12			$p=0,099$	

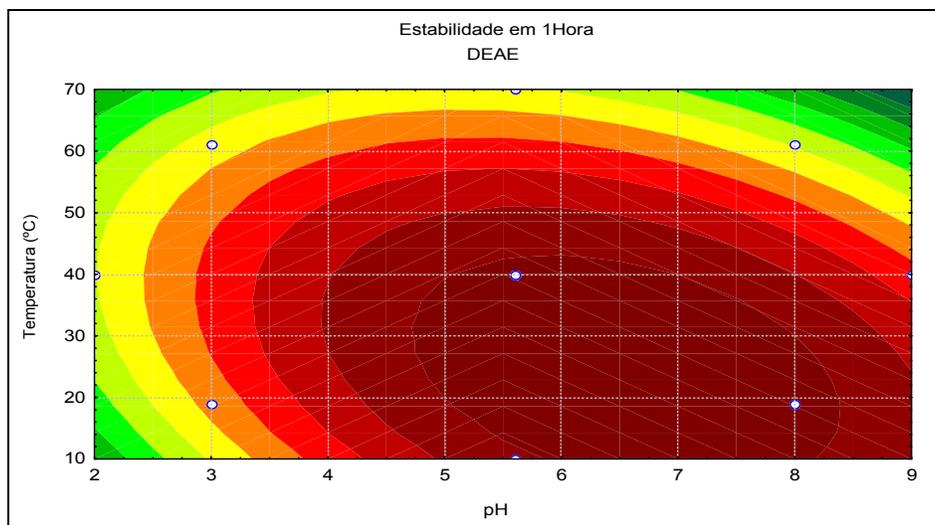
Figura 5: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em coluna de FENIL *Sepharose* - pH e temperatura ótimos



Fator	Soma Q	GL	Média Q	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	49206,72	5	9841,34	7,26	3,97	1,83
Resíduo	9477,40	7	1353,91			
Falta de ajuste	8174,09	3				
Erro puro	1303,31	4				
Total	58684,12	12				

$R^2=0,838$
 $p=0,099$

Figura 6: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em colunas de FENIL *Sepharose* – pH e temperatura de estabilidade



Fator	Soma Q	GL	Média Q	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	112660,7	5	22532,15	6,12	3,97	1,54
Resíduo	25759,77	7	3679,96			
Falta de ajuste	17904,71	3				
Erro puro	7855,06	4			R ² =0,814	
Total	138420,5	12			p=0,099	

Figura 7: Superfície de resposta e Tabela ANOVA obtidas para a lipase purificada em coluna de DEAE Sepharose – pH e temperatura de estabilidade

As superfícies quadráticas foram as que melhor se ajustaram aos resultados obtidos, uma vez que em todos os casos os efeitos quadráticos dos parâmetros testados foram significativos (para $\alpha < 0,01$). Foram também significativos os efeitos lineares para todos exceto para a superfície gerada para pH e temperatura ótimos da enzima parcialmente purificada em coluna de FENIL *Sepharose*.

Análise Univariável

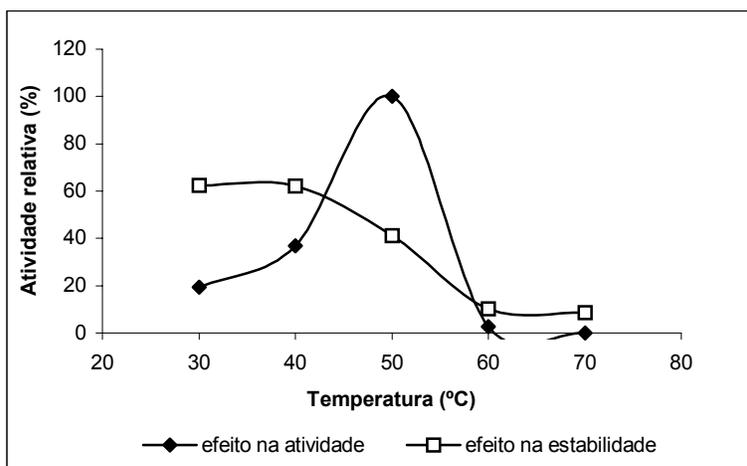


Figura 8: Efeito da temperatura sobre a atividade e a estabilidade da enzima

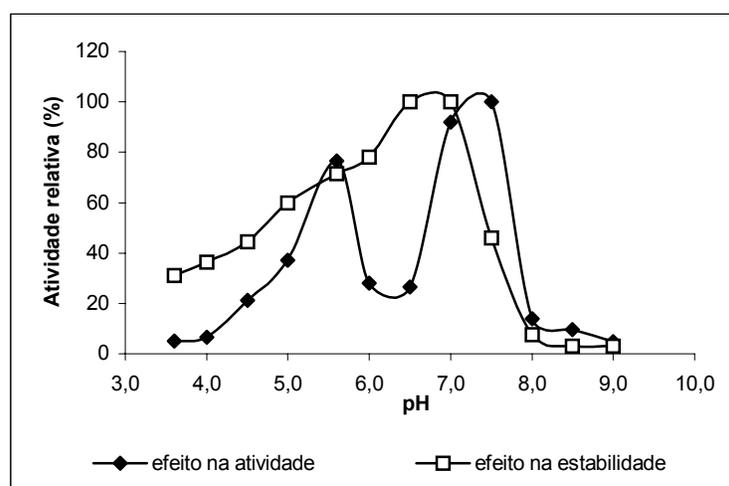


Figura 9: Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da enzima

De acordo com as superfícies de resposta para pH e temperatura ótimos (Figura 4 e 5) a lipase obtida por purificação em coluna de DEAE *Sepharose* apresenta maior atividade para os valores de pH entre 4,5 e 7,5 a temperaturas entre 45 e 65°C. No caso da lipase purificada em coluna de FENIL *Sepharose*, para temperaturas até 50°C a atividade é máxima em valores de pH entre 3,5 e 5,5; acima desta temperatura a atividade é maior para valores de pH entre 5,5 e 9,0. Apesar destas diferenças, nos dois casos no centro do máximo de atividade encontra-se o ponto correspondente a pH=5,6 e temperatura de 50°C. É possível que a maior faixa de ótimo da lipase obtida por FENIL *Sepharose* se deva à maior atividade observada nesta fração.

Os resultados obtidos através da análise univariável para pH ótimo mostram dois picos distintos de atividade máxima (em 5,5 e 7,5), porém, na temperatura estudada (50°C) os pontos de pH 6,0 e 6,5 apresentam valores inferiores de atividade. Este fenômeno, que é um indicador da presença de isoenzimas na fração, não pôde ser observado quando a análise multivariável foi aplicada.

A superfície de resposta gerada para estabilidade da enzima obtida por purificação em coluna de DEAE *Sepharose* indica que esta lipase mantém 50% ou mais de sua atividade quando submetida a valores de pH entre 5,0 e 8,5 a temperaturas inferiores a 40°C. No caso da lipase obtida por purificação em coluna de FENIL *Sepharose*, só foi possível manter 50% de atividade ou mais em valores de pH superiores a 6,0 e a temperaturas inferiores a 35°C. A diferença apresentada na estabilidade pode ser devida à menor concentração de proteína na fração obtida por interação hidrofóbica.

De acordo com a análise univariável a enzima parcialmente purificada mantém 50% ou mais de sua atividade após tratamento térmico de 1 hora a temperaturas inferiores a 50°C e após 24 horas a 25°C, em valores de pH entre 5,0 e 7,0.

A relação entre $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} indica que embora a regressão obtida seja significativa ela não é preditiva do processo. Os baixos valores obtidos para esta relação podem ser devidos às diferenças encontradas entre os métodos multi – e univariável.

CONCLUSÃO

Foi possível purificar parcialmente a lipase de *Rhizopus* sp. com o uso de coluna de DEAE *Sepharose* (troca aniônica) e de FENIL *Sepharose* (interação hidrofóbica). A

primeira, embora mais seletiva para a enzima em questão, parece provocar redução de sua atividade, provavelmente por perda da fração não protéica da lipase. A enzima assim purificada é mais termoestável que a purificada por interação hidrofóbica. A presença de maiores concentrações de íons Na^+ na fração purificada por FENIL *Sepharose* parece contribuir para o aumento de atividade da lipase, que apresentou maior faixa de ótimo de atividade. O uso de planejamento multivariável na determinação das principais características bioquímicas das frações estudadas encobriu a percepção da presença de isoformas da lipase. Embora os resultados sejam compatíveis com a análise univariável esse planejamento não foi o mais indicado no presente caso

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borgston, B.; Brockman, H.L. 1984. Lipases. Elsevier. Amsterdam.
- Gandhi, N.N. 1997. Applications of Lipase. Journal of the American Oil Chemists Society. 74(6): 621-634.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Lin, S.F.; Chiou, C.M.; Tsai, C.Y. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Biotechnology Letters. 17(9): 959-962.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the phenol folin reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
- Obata, T.; Iwata, H.; Namba, Y. 1977. Proteolytic enzyme from *Oerskovia sp* CK lysing viable yeast cell. Agricultural and Biological Chemistry. 41(12): 2387-2394.
- Palekar, A.A.; Vasudevan, P.T., Yan, S. 2000. Purification of Lipase: a Review. Biocatalysis Biotransformation. 18: 177-200.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M.M. 2000. Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 9: 113-148.

Parte III – Estudo da Aplicação da Lipase de *Rhizopus* sp. na Obtenção de Monoacilgliceróis

Capítulo 5

Estudo da Obtenção Monoacilgliceróis por Síntese e Glicerólise Utilizando Lipase de *Rhizopus* sp.

Capítulo 6

Contribuição do Planejamento Experimental de Superfície de Resposta para Síntese de Monoacilgliceróis Catalisada por Lipase Parcialmente Purificada de *Rhizopus* sp.

ESTUDO DA OBTENÇÃO MONOACILGLICERÓIS POR SÍNTESE E GLICERÓLISE UTILIZANDO LIPASE DE *RHIZOPUS* SP.

RESUMO

Entre as substâncias surfactantes mais aplicadas em alimentos, cosméticos e fármacos estão os monoacilgliceróis, especialmente aqueles compostos por ácidos graxos de cadeia média. A obtenção destes produtos por via química gera subprodutos indesejados e tem baixo rendimento, o que vem estimulando sua substituição por métodos enzimáticos, envolvendo lipases. Neste trabalho foram testadas as metodologias de síntese e glicerólise para produção de monolaurina com uso da lipase de *Rhizopus* sp. De acordo com os resultados obtidos, a metodologia mais promissora foi a síntese com 13,4% de conversão em 12h de reação.

PALAVRAS-CHAVE: Monoacilglicerol, lipase, síntese, glicerólise, ácido láurico

ABSTRACT

STUDY FOR THE OBTAINMENT OF MONOACYLGLYCEROLS, BY SYNTHESIS AND GLYCEROLYSIS, APPLYING THE LIPASE FROM *RHIZOPUS* SP. Among the most applied surfactant substances in food, cosmetics and drugs are the monoacylglycerols, specially those containing medium chain fatty acids. Besides the low yields achieved, the chemical obtainment of these products generates not desired by-products. This stimulates its substitution by enzymatic methods that involve lipases. This work tested both synthesis and glycerolysis methodologies for the production of monolaurin applying the *Rhizopus* sp. lipase. According to the results obtained synthesis is the most promising method with 13,4% conversion after 12 hours of reaction

KEYWORDS: Monoacylglycerols, lipase, synthesis, glycerolysis, lauric acid

INTRODUÇÃO

Monoacilgliceróis são as substâncias emulsificantes mais empregadas nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (Bornscheuer, 1995). Isto se deve à sua grande versatilidade, uma vez que o tamanho da cadeia carbônica define o balanço hidrofóbico/hidrofílico do surfactante, e também à sua atividade bacteriostática (principalmente daqueles formados por ácidos graxos de cadeia média) (Conley e Kabara, 1973; Petschow *et al.*, 1996).

Atualmente, a produção de monoacilgliceróis é feita por métodos químicos envolvendo a direta esterificação entre glicerol e ácidos graxos ou a chamada glicerólise, que consiste na alcoólise envolvendo triacilgliceróis e glicerol. Esta metodologia depende da aplicação de altas temperatura e pressão, na presença de catalizadores alcalinos, o que gera a produção de subprodutos de aparência e odor indesejados, que devem ser removidos por processos de purificação, aumentando os custos de produção (Tüter e Aksoy, 2000).

Uma possível alternativa para a produção de monoacilgliceróis é o uso de processos enzimáticos (Rosu *et al.*, 1997). Há três possíveis metodologias, hidrólise, síntese e glicerólise, quando são aplicadas lipases para obtenção destes surfactantes. Dentre elas, a hidrólise é a que apresenta as menores probabilidades de êxito, por ter baixo rendimento teórico e ser um processo de difícil controle (Bornscheuer, 1995).

A lipase de *Rhizopus* sp., aplicada no presente estudo, foi anteriormente utilizada com sucesso na síntese de ésteres de baixo peso molecular (Pastore *et al.* 2003) e apresenta boa atividade sobre o ácido láurico que, pelo tamanho de sua cadeia carbônica, é considerado um dos mais indicados para produção de substâncias tensoativas.

O objetivo deste trabalho foi testar duas metodologias – síntese e glicerólise - na obtenção de monoacilgliceróis utilizando a lipase de *Rhizopus* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de reação

1. Síntese: 0,32 g de glicerol (Merck, P.A.)
0,68 g de ácido láurico (Aldrich, P.A.) (Rel. molar 1:1)
0,50 g de peneira molecular (Aldrich)

2. Glicerólise: 0,12 g de glicerol

0,88 g de gordura de coco (comercial) (Rel. molar 1:1)*

*Para fins de cálculo da massa molecular da gordura de coco foi utilizada a média ponderada das massas dos triglicerídeos formados pelos ácidos graxos presentes na gordura em questão, de acordo com composição publicada por Gunstone e Padley (1997).

Todas as reações foram conduzidas à 50°C, 200 rpm (banho com agitação New Brunswick Scientific C76), em frascos erlenmeyer de 50 mL lacrados com filme plástico e contendo 10 pérolas de vidro, utilizando 10 mg de enzima bruta, com atividade de 205,6 U/mg de proteína. Alíquotas foram retiradas após 12, 24 e 36 horas de reação e análises conduzidas em duplicata.

Análise dos resultados: As amostras foram submetidas à extração pelo método de Bligh - Dyer (1959) e a fase orgânica (10 mL) foi retirada e conservada em frascos de vidro lacrados, à temperatura de -10°C até o momento da análise. Para injeção em cromatógrafo o solvente das amostras foi evaporado com Nitrogênio e os sólidos presentes foram redissolvidos em Tetrahydrofurano (THF – J.T. Baker, grau HPLC). As amostras assim preparadas foram filtradas em filtro de poro 0,22 mm (Millipore – membrana de nylon).

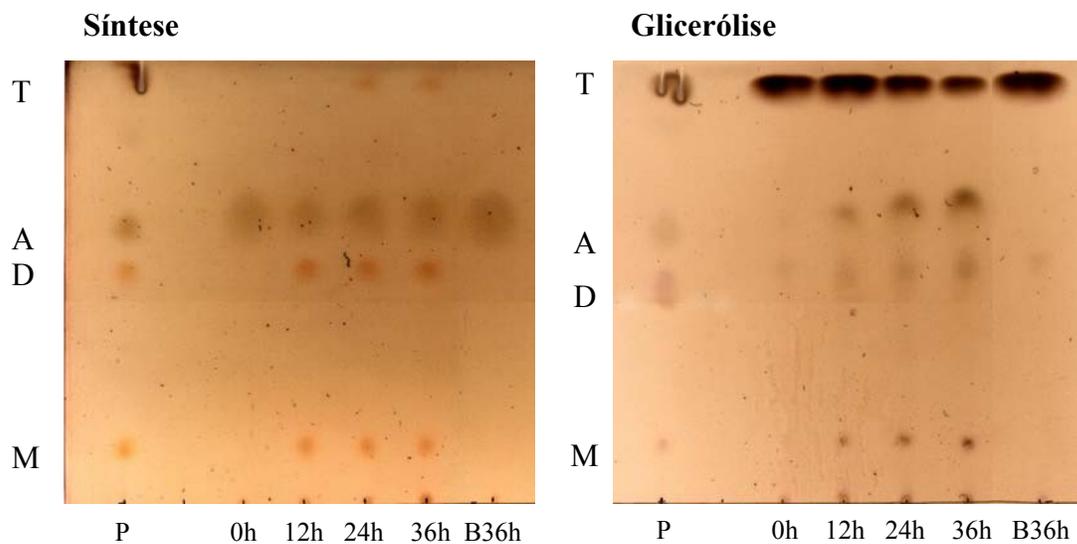
Para observação qualitativa dos resultados de reação foram corridas placas de sílica gel (Merck 60, 20x20 cm) utilizando como fase móvel éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico (210: 90: 0,4 - v:v:v) e como revelador ácido sulfúrico (5%) em etanol, seguido por aquecimento a 100°C.

A separação dos compostos presentes nas amostras foi alcançada pelo método de HPSEC (high pressure size exclusion chromatography) utilizando-se cromatógrafo líquido Waters 600E com detector de índice de refração Waters 410 e equipado com duas colunas em série (Agilent Tech., PLgel, 5 µm, 500 Å e 100 Å), segundo Marquez-Ruíz *et al.* (1992). Para registro dos cromatogramas foi utilizado o *software* Waters Millennium 32. A corrida isocrática utilizou THF como fase móvel, na vazão de 1,1 mL por minuto e teve duração de 20 minutos. As injeções foram de 20 µL.

A quantificação dos produtos de reação foi calculada através de padronização externa, pela construção de curva padrão (em anexo) utilizando-se uma mistura de padrões

(Sigma) trilaurina, dilaurina, monolaurina e ácido láurico (a 0,25% cada) em injeções de 20, 30, 40 e 50 μ L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



T: Triglicerídeo; A: Ácido graxo; D: Diglicerídeo; M: Monoglicerídeo; P: Padrão; B: Branco.

Figura 1: Placas de CCD para os diferentes tipos de reação.

É possível verificar, pelas placas de CCD (Figura 1), que não houve ocorrência de reação espontânea, uma vez que o branco, que passou 36h nas mesmas condições das amostras, apresenta o mesmo perfil do branco obtido no tempo 0h.

A CCD foi ainda bastante útil na identificação dos picos obtidos por HPSEC.

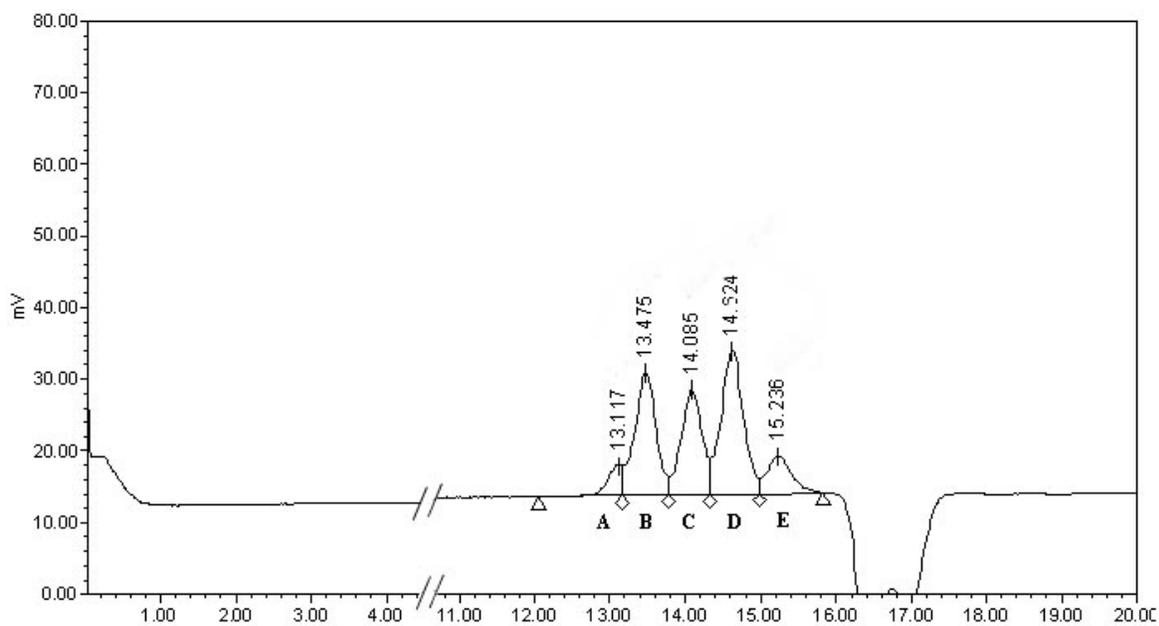


Figura 2: cromatograma obtido para amostra Síntese 24h (A: Tri; B: Di; C: Mono; D: Ác. Graxo; E: Glicerol).

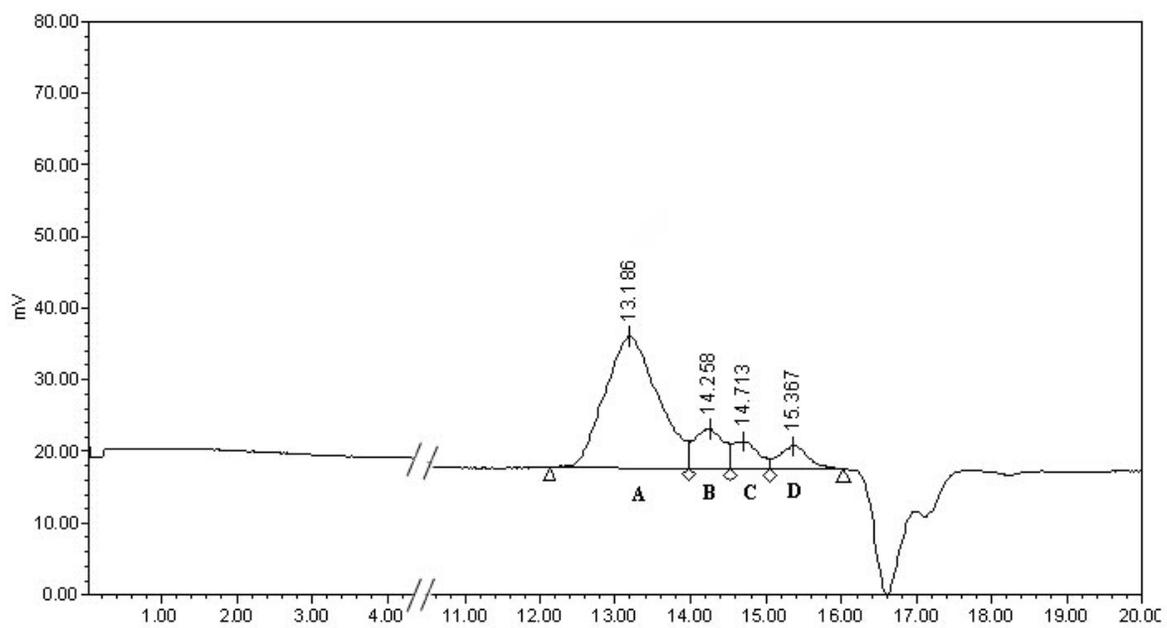


Figura 3: cromatograma obtido para amostra Glicerólise 24h (A: Tri + Di; B: Mono; C: Ác. Graxo; D: Glicerol).

A identificação dos picos foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões. Em casos de dúvida, devido à pequena diferença entre estes tempos, foram realizadas co-injeções com padrões.

Na figura 3 verifica-se sobreposição dos picos referentes a triglicerídeo e a diglicerídeo, devido, provavelmente, à grande concentração de triglicerídeo na amostra – nos casos de glicerólise a gordura de coco foi utilizada como reagente. A presença de ácidos graxos nas amostras de glicerólise se deve à pequenas quantidades de água, contidas no reagente glicerol, que favorecem a ocorrência de hidrólise.

Tabela 1: Resultados obtidos para produção de monoacilgliceróis por diferentes métodos.

Tempo de Reação	Síntese			Glicerólise		
	Área ¹ do pico	mg de MAG ²	Conversão ³ (%)	Área ¹ do pico	mg de MAG ²	Conversão ³ (%)
12h	380706	133,9	13,39	109532	43,5	4,35
24h	286695	102,5	10,25	152573	57,8	5,78
36h	219017	79,9	7,99	101467	40,8	4,08

¹ média obtida das duplicatas. Pelo teste de *Student* não houve diferença significativa entre as mesmas.

² calculado de acordo com curva padrão para monolaurina segundo a equação:
 $y = 3.10^6x - 20969$.

³ calculada sobre a massa total dos reagentes (1g).

A amostragem ao longo do tempo era importante para demonstrar principalmente a partir de que momento a remoção de água na reação de síntese se tornava insuficiente, provocando hidrólise dos produtos. De acordo com a Tabela 1 verifica-se que já a partir de 12h de reação a remoção de água do meio reacional foi insuficiente para garantir conversão continuada para monoglicerídeos, embora a conversão para glicerídeos maiores também possa ser responsável pelo decréscimo nas quantidades de monoglicerídeos presentes nas amostras.

A conversão pode ser considerada baixa quando comparada com a literatura disponível sobre o assunto (50% em MAG obtido por Watanabe *et al.* (2002) para síntese;

45% obtido por Ferreira-Dias *et al.* (2001) para glicerólise, entre outros), porém, antes de um trabalho de otimização é impossível afirmar-se que esta seria a maior conversão atingida quando a lipase de *Rhizopus* sp. é utilizada. De acordo com a Tabela 1, a metodologia mais promissora para obtenção de monoacilgliceróis é a síntese (com 13,4% de conversão em 12h de reação).

CONCLUSÃO

Entre as metodologias testadas, a reação de síntese foi considerada a mais promissora. Os resultados alcançados, em rendimento de monoacilgliceróis, não atingiram os níveis publicados na literatura. No entanto, antes da realização de experimentos para otimização da reação, é prematuro descartar a lipase em estudo para uso na obtenção destes surfactantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bligh, E.G.; Dyer, W.J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.

Bornsheuer, U.W. 1995. Lipase-catalysed Syntheses of Monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*. 17(7): 578-586.

Conley, A.J.; Kabara, J.J. 1973. Antimicrobial Action of Esters of Polihydric Alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4 (5): 501-506.

Ferreira-Dias, S.; Correia, A.C.; Baptista, F.O.; da Fonseca, M.M.R. 2001. Contribution of Response Surface Design to the Development of Glycerolysis Systems Catalysed by Commercial Immobilized Lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 699-711.

Gunstone, F.D.; Padley, F.B. 1997. Cap. 2: Major Sources of Lipids em *Lipid Technologies and Applications*. Pág. 19-51. Marcel Dekker Inc., Nova York.

Marquez-Ruiz, G.; Perez-Camino, M.C.; Dobarganes, M.C. 1992. In Vitro Action of Pancreatic Lipase on Complex Glycerides from Thermally Oxidized Oils. *Fat Science and Technology*. 94(8): 307-312.

Pastore, G. M., Macedo, G.A., Lozano, M. M. S. 2003. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Universidade Católica de Valparaíso, v.6, n.1.

Petschow, B.W.; Batema, R.P.; Ford, L.L. 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Bactericidal Properties of Medium Chain Monoglycerides and Free Fatty Acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(2): 302-306.

Rosu, R.; Uozaki, Y.; Iwasaki, Y.; Yamane, T. 1997. Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-phase Glycerolysis of Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 74(4): 445-450.

Watanabe, Y, *et al.* 2002. Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 79(9): 891-896.

CONTRIBUIÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA SÍNTESE DE MONOACILGLICERÓIS CATALISADA POR LIPASE PARCIALMENTE PURIFICADA DE *RHIZOPUS SP.*

RESUMO

A lipase de *Rhizopus sp.* provou, em experimento anterior, ser capaz de sintetizar monolaurina a partir de ácido láurico e glicerol. No entanto, os rendimentos alcançados não foram compatíveis com a literatura, indicando a necessidade de estudos para a otimização do processo proposto. O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições para síntese de monolaurina, aplicando a lipase em questão, de modo a se obter maiores taxas de conversão. Para tanto foi aplicado o planejamento estatístico multivariável. A análise da superfície de resposta gerada indicou que a enzima em estudo utiliza tanto glicerol quanto monoacilglicerol como substrato para síntese, o que impede o acúmulo do produto de interesse no meio reacional.

PALAVRAS-CHAVE: lipase, monolaurina, síntese, planejamento estatístico multivariável

ABSTRACT

CONTRIBUTION OF RESPONSE SURFACE DESIGN TO THE SYNTHESIS OF MONOACYLGLYCEROLS CATALYSED BY *RHIZOPUS SP.* LIPASE. The *Rhizopus sp.* lipase proved, in a former assay, to be able to catalize the synthesis of monolaurin from lauric acid and glycerol. However the yield achieved was not similar to those described in the literature, which indicates the need for optimization of the proposed methodology. The aim of this work was to determinate the best reaction conditions for monolaurin synthesis by *Rhizopus sp.* lipase in order to obtain better conversion rates. a surface response design was applied for this purpose. The analysis of the generated surface showed that the enzyme in this study uses glycerol and monoacylglycerol as substrates, which prevents the desired product to accumulate in the reaction medium.

KEYWORDS: lipase, monolaurin, synthesis, response surface design

INTRODUÇÃO

Lipases são hidrolases que, em meio reacional com baixa atividade de água, são capazes de catalisar a reação inversa à hidrólise, isto é, podem promover a esterificação de ácidos graxos com glicerol. Neste tipo de reação, a maior dificuldade consiste em manter a atividade de água nos níveis ideais, pela remoção da água liberada durante a reação. Para tanto, diversas metodologias foram desenvolvidas envolvendo o uso de peneiras moleculares (Yamagushi e Mase 1991) e aplicação de vácuo ao meio reacional (Miller *et al.* 1988). A forma mais simples de se conduzir este tipo de reação consiste na mistura dos ácidos graxos com glicerol, na presença ou na ausência de solventes orgânicos.

Outro tipo de reação realizada com sucesso através de uso de lipases é a alcoólise. Esta reação consiste, basicamente, na transesterificação entre um éster e um álcool. Para produção de monoacilgliceróis grande atenção foi dispensada a um tipo especial desta reação, a glicerólise. Isto acontece pois entre todas as formas possíveis de se obter o produto desejado é a glicerólise que oferece maior rendimento teórico, uma vez que cada mol de triacilglicerol usado como substrato pode gerar três moles de monoacilgliceróis, na presença de excesso de glicerol (Bornscheuer 1995).

Embora diferentes metodologias tenham sido testadas, na presença de solventes (Yang *et al.* 1993) e em meio de micelas reversas (Chang *et al.* 1991), em geral o meio reacional para glicerólise é o mais simples possível, apenas a mistura de óleo/gordura e glicerol.

Independentemente da metodologia utilizada para obtenção de monoacilgliceróis, um importante fator para alcançar-se um alto rendimento está em se deslocar o equilíbrio da reação, pela remoção do produto de interesse do meio reacional. Isto tem ainda como consequência a possibilidade de se evitar que os monoacilgliceróis formados atuem como substrato no decorrer da reação (McNeil 1991).

Em estudo anterior (Capítulo 5), foi possível determinar que a lipase de *Rhizopus* sp. apresentava algum potencial para produção de monolaurina através da metodologia de síntese. Entretanto, os resultados obtidos, em conversão para monoacilgliceróis, não eram compatíveis com os reportados na literatura, indicando a necessidade de otimização do processo proposto. O objetivo deste trabalho foi, então, determinar, através de análise

estatística multivariável, as melhores condições para síntese de monolaurina, aplicando a lipase de *Rhizopus* sp. parcialmente purificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de reação

Para determinação das melhores condições de síntese foi utilizado um planejamento estatístico experimental multivariável baseado na análise de superfície de resposta. Para geração da planilha de ensaios e análise dos resultados foi aplicado o *Software* STATISTICA (versão 5.0). Os parâmetros analisados foram: relação molar entre os reagentes (ácido láurico e glicerol) e peneira molecular. Como variável dependente (resposta) foi considerada a conversão (sobre a massa total de reagentes – 1 g), em porcentagem, para monoglicérides.

Tabela 1: Planilha de ensaios

Ensaio	Relação molar (glicerol: ác láurico)	Peneira molecular (% em peso)
1	2;1	85,5
2	2:1	14,5
3	1:2	85,5
4	1:2	14,5
5	1:1	100
6	1:1	0
7	2,78:1	50
8	1:2,78	50
9	1:1	50
10	1:1	50
11	1:1	50
12	1:1	50
13	1:1	50

Foi utilizado um experimento fatorial completo, com cinco pontos centrais. Todas as reações foram conduzidas a 50°C, 200 rpm (banho com agitação New Brunswick Scientific C76), em frascos erlenmeyer de 50 mL lacrados com filme plástico e contendo 10 pérolas de vidro, utilizando 2 mg de enzima parcialmente purificada em coluna de DEAE *Sepharose*, com atividade de 1326,6 U/mg de proteína (como descrito no capítulo 3). Todo o experimento foi realizado para 12 e 36 horas de reação.

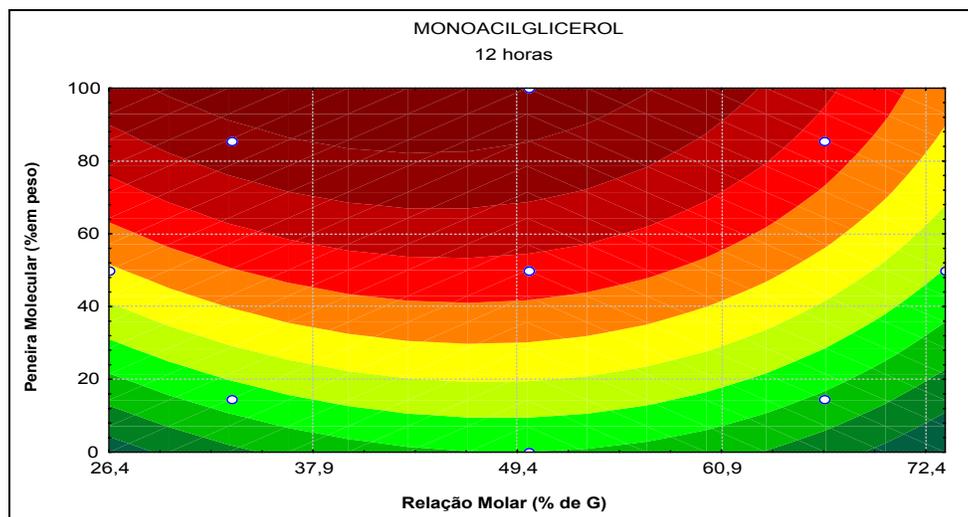
Análise dos resultados

As amostras foram dissolvidas em 10 mL de Tetrahidrofurano (THF – J.T. Baker, grau HPLC), adicionadas de 1 g de sulfato de sódio anidro, filtradas em papel qualitativo e armazenadas em frascos lacrados a –10°C, até o momento da análise. Para injeção em cromatógrafo, alíquotas foram retiradas e filtradas em filtro de poro 0,22 µm (Millipore – membrana de nylon). Quando necessário foram feitas diluições com THF.

A separação dos compostos presentes nas amostras foi alcançada pelo método de HPSEC (high pressure size exclusion chromatography) utilizando-se cromatógrafo líquido Waters 600E com detector de índice de refração Waters 410 e equipado com duas colunas em série (Agilent Tech., PLgel, 5 µm, 500 Å e 100 Å), segundo Marquez-Ruiz *et al.* (1992). Para registro dos cromatogramas foi utilizado o *software* Waters Millennium 32. A corrida isocrática utilizou THF como fase móvel, na vazão de 1,1 mL por minuto e teve duração de 20 minutos. As injeções foram de 20 µL.

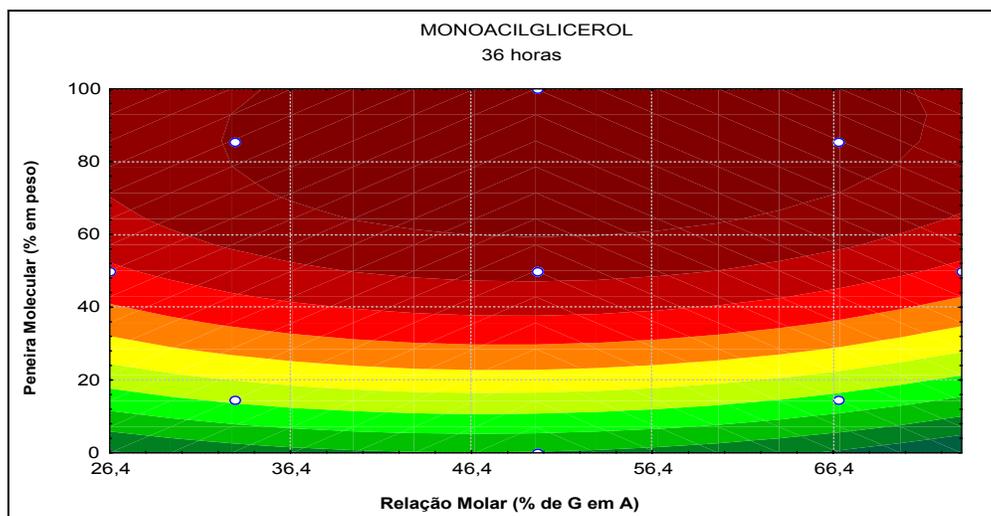
A quantificação dos produtos de reação foi calculada através de padronização externa, pela construção de curva padrão (em anexo) utilizando-se uma mistura de padrões (Sigma) trilaurina, dilaurina, monolaurina e ácido láurico (a 0,25% cada) em injeções de 20, 30, 40 e 50 µL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Fator	Soma Q	GL	Média Q	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	14038,09	3	4679,36	8,70	4,07	2,13
Resíduo	4837,90	9	537,54			
Falta de ajuste	3826,87	5			$R^2=0,74$	
Erro puro	1011,03	4			$P=0,99$	
Total	18876	12				

Figura 1: Superfície de resposta e tabela ANOVA para a síntese de monoacilgliceróis após 12 horas de reação.



Fator	Soma Q	GL	Média Q	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	20696,38	2	10348,19	16,27	4,1	3,97
Resíduo	6357,15	10	635,71			
Falta de ajuste	4083,42	6			$R^2=0,76$	
Erro puro	2273,72	4			$p=0,99$	
Total	27053,53	12				

Figura 2: Superfície de resposta e tabela ANOVA para a síntese de monoacilgliceróis após 36 horas de reação.

Tabela 2: Conversão para monoacilgliceróis e para diacilgliceróis após 12 horas de reação

Ensaio	mag mg	Conversão (%)	dag mg	Conversão (%)	Soma	Conversão (%) total (dag+mag)
1	100,35	10,04	15,09	1,51	115,44	11,54
2	29,70	2,97	0,00	0,00	29,70	2,97
3	119,14	11,91	24,54	2,45	143,69	14,37
4	100,35	10,04	0,00	0,00	100,35	10,04
5	136,51	13,65	25,76	2,58	162,27	16,23
6	10,75	1,08	0,00	0,00	10,75	1,08
7	15,16	1,52	0,00	0,00	15,16	1,52
8	58,87	5,89	5,69	0,57	64,56	6,46
9	71,40	7,14	7,55	0,76	78,95	7,90
10	87,67	8,77	14,71	1,47	102,38	10,24
11	78,77	7,88	10,56	1,06	89,33	8,93
12	92,98	9,30	12,47	1,25	105,45	10,54
13	113,07	11,31	18,19	1,82	131,26	13,13

Tabela 3: Conversão para monoacilgliceróis e para diacilgliceróis após 36 horas de reação

Ensaio	mag mg	Conversão (%)	dag mg	Conversão (%)	Soma	Conversão (%) total (mag+dag)
1	150,46	15,05	32,12	3,21	182,59	18,26
2	54,07	5,41	8,17	0,82	62,23	6,22
3	127,71	12,77	31,61	3,16	159,32	15,93
4	63,05	6,30	8,52	0,85	71,57	7,16
5	131,75	13,17	28,07	2,81	159,82	15,98
6	16,02	1,60	0,00	0,00	16,02	1,60
7	99,24	9,92	19,55	1,95	118,79	11,88
8	100,72	10,07	23,92	2,39	124,64	12,46
9	131,37	13,14	28,77	2,88	160,14	16,01
10	169,45	16,94	45,33	4,53	214,78	21,48
11	154,33	15,43	38,64	3,86	192,97	19,30
12	177,19	17,72	39,58	3,96	216,77	21,68
13	121,82	12,18	29,26	2,93	151,07	15,11

Em ambos os casos, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou aos resultados obtidos pois, para níveis de significância de $\alpha < 0,01$, os efeitos quadráticos para peneira molecular (12 horas) e relação molar entre os reagentes (36 horas) foram significativos.

Para 12 horas de reação foram também significativos ($\alpha < 0,01$) os efeitos lineares dos dois parâmetros testados. Para 36 horas de reação, apenas o efeito linear para peneira molecular foi também significativo.

Os valores obtidos para R^2 e para a relação entre $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} , embora significativos, não podem ser considerados preditivos do processo. Isto pode ser devido ao alto desvio padrão encontrado entre as amostras. Esta alta variabilidade pode ter sido provocada por vários fatores: diferenças na pesagem dos reagentes e, principalmente, da enzima, dificuldades na diluição das alíquotas para injeção em cromatógrafo, diferenças na própria injeção manual em cromatógrafo, entre outros.

As superfícies de resposta da Figura 1 indicam uma tendência de que o aumento na quantidade de peneira molecular proporcionaria uma maior conversão para monoacilgliceróis. Esta tendência é um pouco menos acentuada com o aumento do tempo de reação, porém persiste. Isto apenas reforça o conceito, anteriormente mencionado, de que a remoção de água do meio reacional é fator preponderante quando é aplicada síntese enzimática de ésteres (Yamagushi e Mase 1991). Entretanto, quantidades superiores a 100% de peneira molecular (em massa sobre a massa dos reagentes) dificultam a agitação e homogeneização do meio reacional e são operacionalmente impraticáveis. É indicado, portanto, o teste de uma forma alternativa de remoção de água, como aplicação de pressão reduzida ao meio reacional (Miller *et al.* 1988). É importante notar que estas formas alternativas de desidratação do meio também apresentam dificuldades operacionais como a manutenção da temperatura de reação e uso de forma alternativa de agitação, mas que não são intransponíveis.

Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se os resultados de conversão tanto para monoacilgliceróis quanto para diacilgliceróis. É possível verificar-se que conversões maiores para monoacilgliceróis correspondem também a maiores conversões para diacilgliceróis. Isto indica que a enzima em questão usa como substrato, indiscriminadamente, tanto o glicerol quanto os monoacilgliceróis (Ferreira-Dias *et al.* 2001). Em casos como este faz-se necessário remover seletivamente o produto de interesse do meio reacional, para que este não fique disponível para posteriores transformações, garantindo assim maiores taxas de conversão.

Mesmo não havendo diferenças significativas entre os resultados de conversão para monoacilgliceróis nos tempos de reação de 12 e 36 horas para o ponto considerado melhor para conversão, devido às diferenças encontradas em outros pontos do planejamento, foi realizado um experimento, nas condições acima descritas, utilizando relação molar entre os reagentes de 1:1 e 100% de peneira molecular em relação à massa total dos reagentes, retirando-se alíquotas ao longo do tempo. Alguns pontos foram repetidos utilizando-se hexano (10 mL) como solvente da reação. Nestes casos, o solvente foi evaporado após a retirada da alíquota e os sólidos foram redissolvidos em THF para análise cromatográfica. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Conversão para monoacilgliceróis ao longo do tempo e na presença de hexano.

Tempo de reação	Conversão (%)	
	mag	mag - na presença de hexano
06h	10,05	
12h	13,85	6,84
24h	13,97	6,37
36h	13,81	
48h	16,28	7,31
60h	16,33	
72h	17,52	

É possível observar que após 48 horas de reação a conversão praticamente se estabiliza. Isto é um indicativo de que a partir deste momento a quantidade de peneira molecular já não é mais suficiente para garantir que não haja hidrólise dos produtos formados e as reações de síntese e hidrólise entram em equilíbrio no meio. É possível também que esteja havendo inativação da enzima pelo longo tempo de aquecimento.

Já a partir de 12 horas de reação o aumento da concentração de monoacilgliceróis no meio reacional é lento ao longo do tempo, o que é provavelmente causado pela subsequente transformação dos monoacilgliceróis formados para glicerídeos maiores.

A presença de hexano no meio reacional não foi favorável à conversão para monoacilgliceróis, ficando sua concentração no meio reacional em torno da metade da alcançada na ausência de solvente.

Comparando-se os resultados de conversão obtidos nos testes preliminares (Tabela 1 - Capítulo 5) e no estudo de otimização (Tabela 4 - Capítulo 6) verifica-se que após 12 horas de reação não há diferença significativa entre os resultados obtidos (13,39% e 13,85%, respectivamente). Diferenças significativas, no entanto, aparecem quando comparados tempos mais longos de reação. Nos testes preliminares, a partir de 24 horas de reação, a conversão para monoacilgliceróis se reduz significativamente, ao contrário do que acontece no ensaio em condições otimizadas, nos quais esta conversão aumenta até o tempo final de teste (72h). Isto é devido, provavelmente, a maior eficiência na remoção de água do meio reacional, uma vez que em condições otimizadas o meio conta com o dobro da quantidade de peneira molecular que a utilizada e nos testes preliminares

O uso da enzima parcialmente purificada nos ensaios de otimização tinha como objetivo garantir a mesma atividade enzimática aplicada nos testes preliminares, porém em uma massa menor, o que facilita a dispersão da enzima no meio e reduz a ação de interferentes (presença de proteases no extrato bruto, por exemplo).

CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados obtidos verifica-se que as maiores conversões foram alcançadas quando o meio reacional era composto de glicerol e ácido láurico na proporção molar de 1:1 e continha 100% em peso (sobre a massa total dos reagentes) de peneira molecular, 2 mg da lipase parcialmente purificada, a 50°C e com agitação de 200 rpm. No entanto, altas taxas de conversão não puderam ser atingidas uma vez que a enzima utiliza tanto o glicerol quanto monoacilgliceróis como substrato, gerando diacilgliceróis e reduzindo a concentração do produto de interesse no meio reacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bornsheuer, U.W. 1995. Lipase-catalysed Syntheses of Monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*. 17(7): 578-586.

Chang, P.S.; Rhee, J.S.; Kim, J.J. 1991. Continuous Glycerolysis of Olive Oil by *Chromobacterium viscosum* Lipase immobilized on Liposome in Reversed Micelles. *Biotechnology Bioengineering*. 38 (10): 1159-1165.

Ferreira-Dias, S.; Correia, A.C.; Baptista, F.O.; da Fonseca, M.M.R. 2001. Contribution of Response Surface Design to the Development of Glycerolysis Systems Catalysed by

Commercial Immobilized Lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 699-711.

Marquez-Ruiz, G.; Perez-Camino, M.C.; Dobarganes, M.C. 1992. In Vitro Action of Pancreatic Lipase on Complex Glycerides from Thermally Oxidized Oils. *Fat Science and Technology*. 94(8): 307-312.

McNeil, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. 1991. High-Yield Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 68(1): 1-5.

Miller, C.; Austin, H.; Poroske, L.; Gonzalez, J. 1988. Characteristics of an Immobilized Lipase for the Commercial Synthesis of Esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 65 (6): 927-931. Yamagushi, S.; Mase, T. 1991. High-Yield Synthesis of Monoglyceride by Monoacylglycerol and Diacylglycerol Lipase from *Penicillium camambertii* U150. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72 (3): 162-167.

Yang, B.K.; Harper, W.P.; Parkin, K.L. 1993. Control of Lipase-Mediated Glycerolysis Reactions with Butteroil in Single Liquid-Phase Media with 2-methyl-2-propanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1899-1904.

Conclusão

- Foi possível purificar a lipase de *Rhizopus* sp. até a homogeneidade em SDS-PAGE, obtendo-se uma única banda com massa molecular de 37,5 KDa. A fração foi purificada 9,7 vezes com um rendimento de 0,25% sobre o caldo de cultura inicial e teve uma atividade específica de 1446 U/mg de proteína. A fração purificada continha duas isoformas da lipase que apresentaram PI de 4,3 e 4,5, pH ótimo de atividade de 5,6 e 7,0 e atividade ótima a 50°C. A fração mostrou-se estável numa faixa de pH entre 6,5 e 7,5 e em temperaturas abaixo de 50°C. Para o substrato sintético p-nitro-fenil-laurato a lipase purificada apresentou K_m de 2,4 mM e $V_{máx}$ de 277,8 U. Quando foram usados triglicerídeos sintéticos como substratos, a lipase apresentou maior atividade contra tributirina e a atividade decresceu com o aumento da cadeia carbônica dos ácidos graxos envolvidos. Quando foram usados óleos e gorduras naturais como substratos, a atividade seguiu o mesmo padrão, sendo maior a hidrólise de creme de leite de vaca. A lipase foi inativada por Hg^{+2} e por n-bromosuccinimida e ativada por Na^{+1} . Manteve sua atividade em hexano mas foi fortemente inativada por metanol.
- Foi possível purificar parcialmente a lipase de *Rhizopus* sp. com o uso de coluna de DEAE *Sepharose* (troca aniônica) e de FENIL *Sepharose* (interação hidrofóbica). A primeira, embora mais seletiva para a enzima em questão, parece provocar redução de sua atividade, provavelmente por perda da fração não protéica da lipase. A enzima assim purificada é mais termoestável que a purificada por interação hidrofóbica. A presença de maiores concentrações de íons Na^{+1} na fração purificada por FENIL *Sepharose* parece contribuir para o aumento de atividade da lipase, que apresentou maior faixa de ótimo de atividade. O uso de planejamento multivariável na determinação das principais características bioquímicas das frações estudadas encobriu a percepção da presença de isoformas da lipase. Embora os resultados sejam compatíveis com a análise univariável esse planejamento não foi o mais indicado no presente caso.

- Dentre as metodologias testadas para obtenção de monoacilgliceróis através da aplicação da lipase de *Rhizopus* sp., a mais promissora foi a síntese, por apresentar as maiores conversões, em menor tempo de reação. As maiores conversões foram alcançadas quando o meio reacional era composto de glicerol e ácido láurico na proporção molar de 1:1 e continha 100% em peso (sobre a massa total dos reagentes) de peneira molecular, 2 mg da lipase parcialmente purificada, a 50°C e com agitação de 200 rpm. Os estudos para produção de monoacilgliceróis devem levar em consideração métodos alternativos de remoção do produto de interesse do meio reacional, de modo a deslocar o equilíbrio da reação, uma vez que a lipase em estudo utiliza monoacilgliceróis como substrato para síntese de glicerídeos maiores.

Sugestões para Trabalhos Futuros

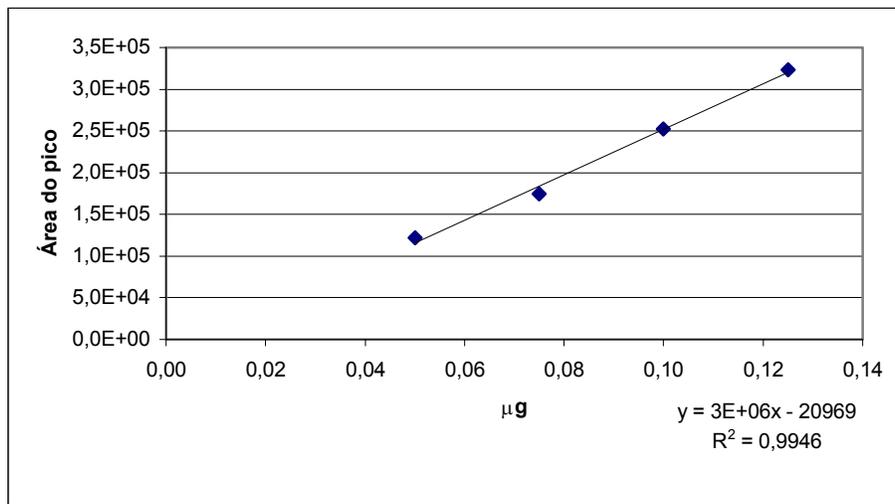
Separar as isoformas da lipase de *Rhizopus* sp. e realizar estudos quanto à sua estrutura primária, de modo a verificar as causas estruturais nas diferenças de pH ótimo apresentadas pelas mesmas, o que pode ser de grande importância para a engenharia de proteínas.

Estabelecer uma metodologia de reação para remoção de água do meio reacional e separação seletiva do produto de interesse (monoacilgliceróis) durante o curso da reação, para garantir maiores taxas de conversão na síntese de monolaurina por lipase de *Rhizopus* sp.

Anexo

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

MONOACILGLICEROL



DIACILGLICEROL

