

# USO DE REATOR DE LEITO FLUIDIZADO E LIPASE DE *Rhizopus oryzae* PARA MODIFICAÇÃO DA GORDURA DO LEITE POR INTERESTERIFICAÇÃO

A. V. de Paula<sup>1</sup>; G. F. M. Nunes<sup>2</sup>; H. F. de Castro<sup>2</sup>; S. Ferreira-Dias<sup>3</sup>; J. C. dos Santos<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Univ Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Univ de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química

<sup>3</sup> Univ de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia

<sup>4</sup> Univ de São Paulo, USP, Departamento de Biotecnologia

E-mail para contato: ariela@fcfar.unesp.br; jsant200@usp.br

**RESUMO** – Estudos visando à seleção de sistemas enzimáticos e biorreatores adequados são fundamentais para a viabilização de processos bioquímicos em escala industrial. Neste trabalho, lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA foi utilizada em um reator de leito fluidizado para a interesterificação contínua de uma mistura de 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja. O processo foi conduzido a 45°C com um tempo espacial de 50 minutos. A concentração de triacilgliceróis foi determinada por cromatografia gasosa e a consistência dos produtos interesterificados foi medida em texturômetro. O grau de interesterificação obtido foi de 5,10 %, correspondendo a uma redução de 52 % na consistência dos produtos interesterificados, em relação à mistura inicial (1002 gf/cm<sup>2</sup>). Os resultados obtidos sugerem o potencial do sistema na modulação das propriedades químicas e físicas de gorduras interesterificadas, as quais possuem importantes aplicações na indústria de alimentos.

## 1. INTRODUÇÃO

A gordura do leite é a mais abundante fonte de ácidos linolêicos conjugados, que desempenham importante papel em diversos processos bioquímicos e prevenção de doenças humanas, incluindo o câncer (Ledoux *et al.*, 2005) e doenças coronarianas (Aguedo *et al.*, 2008). Porém, apesar de possuir características desejáveis e de ser amplamente apreciada pelo consumidor, a gordura de leite possui alguns inconvenientes, como riqueza em gorduras saturadas (Shin *et al.*, 2009). O consumo excessivo deste tipo de gordura tem sido associado a doenças cardiovasculares (Rodrigues *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2009). Além, disso, apesar de seu sabor apreciado por grande parte dos consumidores, a manteiga possui baixa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração e é considerada um produto caro, o que tem levado o consumidor a preferir um produto refrigerado mais espalhável e saudável.

A substituição da manteiga pelas margarinas ou cremes vegetais tem levado a indústria a buscar a modificação da gordura do leite, visando ao aumento das alternativas para uso desta matéria-prima (Balcão *et al.*, 1998). Entre os processos considerados, destaca-se a interesterificação, um processo básico para elaboração das “gorduras feitas sob medida” (Rodrigues e Gioielli, 2003). São os denominados lipídeos estruturados (Akoh, 2005), óleos e

gorduras com propriedades nutraceuticas, que podem proporcionar, além das necessidades nutricionais básicas, efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde, como a prevenção e o tratamento de doenças (Silva *et al.*, 2009).

A interesterificação pode ser química ou enzimática. No caso da interesterificação enzimática são empregadas as lipases, enzimas hidrolíticas de grande aplicação industrial em rotas consideradas ambientalmente amigáveis (Alim *et al.*, 2008). No entanto, algumas limitações da via enzimática incluem o preço da enzima e a baixa estabilidade operacional das lipases (Osório *et al.*, 2006). Visando-se contornar estes inconvenientes e favorecer a viabilidade econômica do processo, técnicas de imobilização devem ser empregadas, o que permite a condução de reações com fácil separação de catalisador–produto e o aumento da produtividade (Zanin *et al.*, 2004).

Salienta-se que, entre todas as possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante. O emprego desses biocatalisadores em processos industriais tem sido realizado em diferentes configurações de reatores. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o emprego de reator de leito fluidizado para modificação da gordura do leite por interesterificação com óleo de soja, empregando-se a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte híbrido orgânico-inorgânico polissiloxano-álcool polivinílico (SiO<sub>2</sub>-PVA). Isso porque reatores de leito fluidizado constituem-se em uma alternativa para atenuar problemas apresentados por sistemas como o leito fixo, nos quais há dificuldade de se obter uma boa mistura do meio (Teixeira *et al.*, 2007).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Lipase: o experimento foi efetuado com a lipase microbiana de *Rhizopus oryzae* (Lipase L036P, Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra), preparação comercial de grau alimentício selecionada em trabalho anterior (Paula *et al.*, 2010a).

Matérias primas: gordura de leite obtida a partir de fusão completa de manteiga comercial (Mimosa, sem sal) sob temperatura de 50-65°C em forno de micro-ondas para desfazer a emulsão, seguida de centrifugação e separação da fase aquosa; óleo de soja comercial (Óleo de soja refinado, Sovena Portugal Consumer Goods, S. A), refinado sem tratamento adicional.

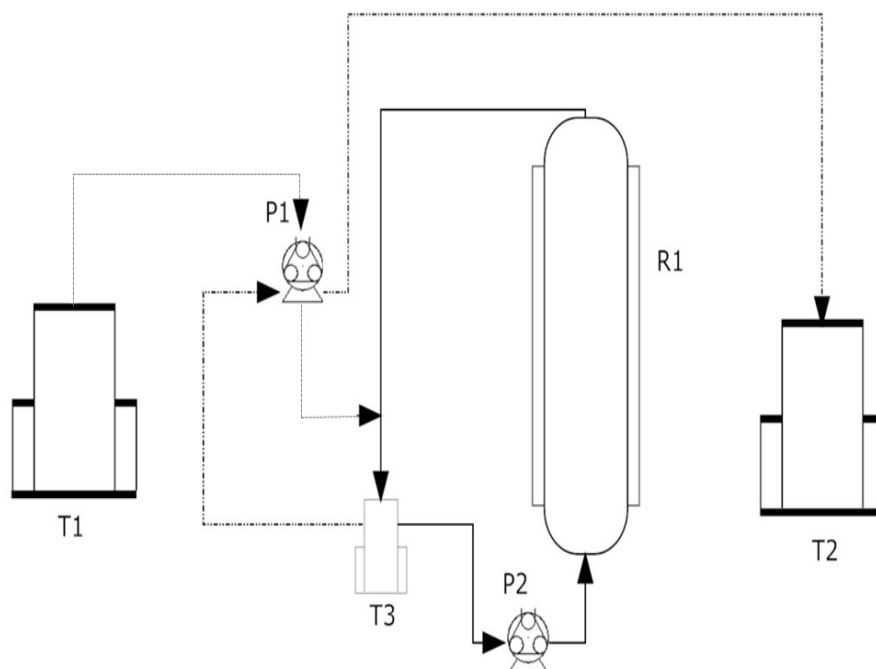
### **2.2 Metodologia**

Obtenção do suporte: O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO<sub>2</sub>-PVA) foi sintetizado pela técnica sol-gel e neutralizado com KOH conforme metodologia descrita por Paula (2012)

Imobilização da lipase: O suporte foi embebido em hexano (1g:10 mL), sendo mantido sob agitação em temperatura ambiente durante 2h. Após este período, o sólido foi decantado e o excesso de hexano removido. Ao suporte foi então adicionada a lipase na proporção de 250 mg de enzima: 1g suporte. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo, com posterior lavagem com hexano.

Dosagem de Atividade Hidrolítica: a atividade enzimática da lipase foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Paula *et al.* (2010a).

Interesterificação em leito fluidizado: o reator de leito fluidizado (altura de 20 cm, diâmetro interno de 2,0 cm) foi operado em modo contínuo, por 7 dias. O meio reacional foi composto de 65% (m/m) de gordura de leite, 35% (m/m) de óleo de soja e a temperatura empregada foi 45 °C. A reação foi catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA (24,5 g), empregando-se tempo espacial de 50 min, vazão de alimentação de 1,6 mL/min e vazão de recirculação de 6,8 mL/min (Paula, 2012). Um esquema do procedimento é apresentado na Figura 1.



**Figura 1** - Fluxograma simplificado do reator de leito fluidizado empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: sistema contínuo, com recirculação. T1. Reservatório de alimentação; T2. Reservatório de produtos; T3. Reservatório para conexões e recirculação; R1. Reator de Coluna; P1. Bomba peristáltica (duplo canal); P2. Bomba peristáltica. (.....) Linha de alimentação; (—) Linha de recirculação; (-----) Linha de produtos.

O progresso da reação foi acompanhado pela determinação do teor de ácidos graxos livres, da composição em triacilgliceróis (TAGs) e da consistência dos produtos interesterificados.

Teor de ácidos graxos livres: o teor de ácidos graxos livres das reações de interesterificação foi determinado de acordo com o método Cd 3d-63 da AOCS (2004).

Quantificação dos triglicerídeos das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: Para a análise de triglicerídeos obtidos nas reações de interesterificação, empregou-se um método de análise por cromatografia gasosa, de acordo com Paula *et al.* (2010b).

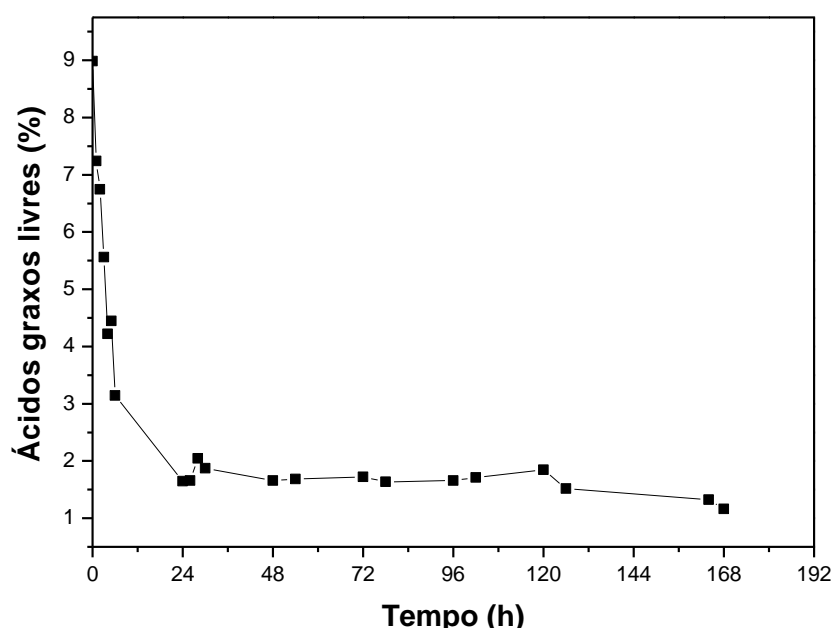
Grau de interesterificação (GI, %): o grau de interesterificação das reações entre gordura de leite e óleo de soja foi calculado de acordo Paula (2012).

Consistência: a consistência das matérias primas e dos produtos interesterificados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Paula (2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Ácidos graxos livres

Com relação ao teor de ácidos graxos livres (%), os resultados apresentados na Figura 2 mostram que, inicialmente, foram atingidos valores em torno de 9% nas primeiras horas de reação. Após este período, a acidez diminuiu, mantendo-se praticamente constante até o final da reação, com uma média obtida após o tempo de operação de 24h de  $1,65 \pm 0,22$  % (valor médio  $\pm$  desvio padrão).



**Figura 2** - Teor de ácidos graxos livres (%) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (mistura 65%:35%) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado.

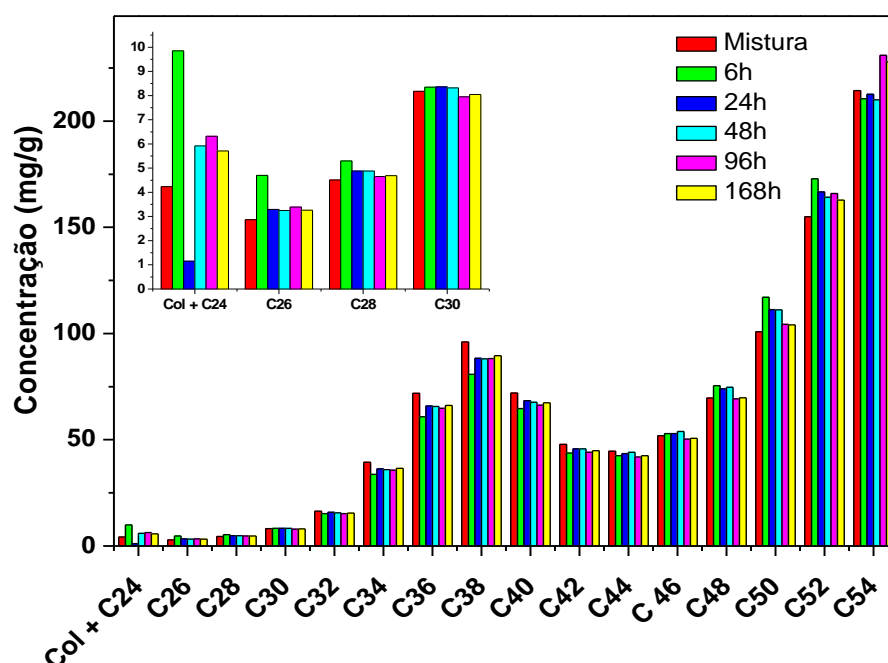
A presença de quantidades elevadas de ácidos graxos no início da reação, provavelmente tenha sido ocasionada pela presença de água no derivado imobilizado (aproximadamente 10% em

massa). Em nível molecular, a interesterificação é uma sequência de hidrólise e reesterificação dos TAGs (Willis e Marangoni, 2008). Portanto, na presença de água, a hidrólise pode ser favorecida, gerando acúmulo de ácidos graxos no meio reacional.

### 3.2. Composição em triglicerídeos (TAGs)

Ao longo da reação, foram coletadas amostras para análise da composição em triglicerídeos (TAGs). Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações, plotou-se um gráfico com os valores de concentração dos triglicerídeos na mistura reacional inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) e dos produtos interesterificados obtidos em diferentes tempos reacionais. Estes resultados são apresentados na Figura 3.

A análise da Figura 3 revela que a concentração dos TAGs C<sub>24</sub>-C<sub>30</sub> e C<sub>46</sub>-C<sub>52</sub> aumentou, nas primeiras 6h de reação, diminuindo e mantendo-se praticamente constante após este período. A concentração dos TAGs C<sub>32</sub>-C<sub>44</sub> apresentou comportamento inverso: diminuiu em relação à mistura reacional, nas primeiras 6h, aumentando e mantendo-se praticamente constante até o final da reação. Com relação ao TAG C<sub>54</sub>, este sofreu uma diminuição da concentração em relação à mistura inicial, até o tempo de 48h de reação, aumentando e mantendo-se constante até 168h. A partir da concentração em TAGs, foram calculados os valores de grau de interesterificação.



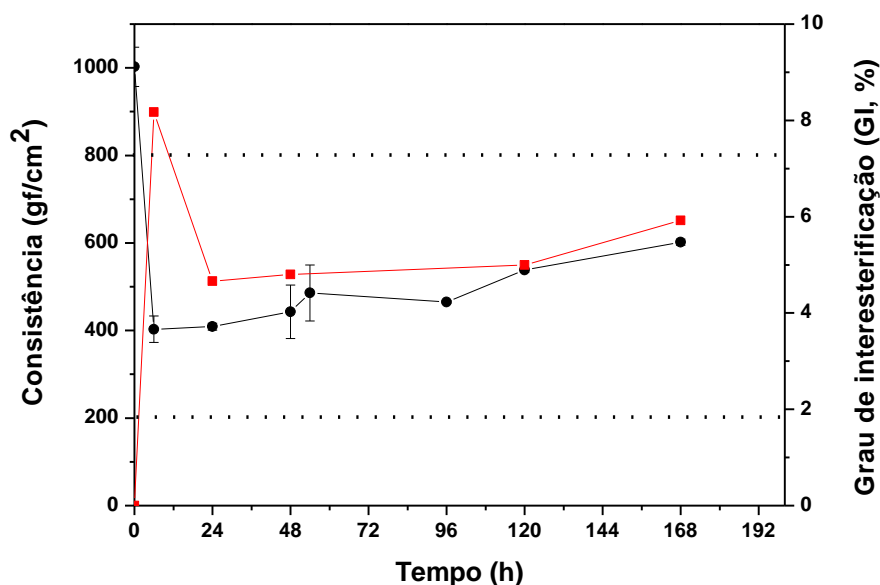
**Figura 3** - Perfil de concentração de triglicerídeos obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (mistura 65%:35%) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA, em reator de leito fluidizado (Col = colesterol).

### 3.3. Grau de interesterificação e consistência

Os resultados de grau de interesterificação (GI), comparados aos valores de consistência dos produtos interesterificados (valor médio  $\pm$  desvio padrão), são apresentados na Figura 4. Observa-se que em 6h de reação obteve-se um GI de 8,17%. De maneira geral, após este período, o GI diminuiu, variando de 4,5 a 6%, sendo o valor médio de  $5,10 \pm 0,57\%$  (valor médio  $\pm$  desvio padrão).

Com relação à consistência, os resultados revelam que todos os produtos interesterificados, a partir de 6h de reação, atingiram valores de consistência dentro da faixa ideal ( $200\text{-}800 \text{ gf/cm}^2$ ). A mistura inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) possuía consistência de  $1002,43 \pm 44,65 \text{ gf/cm}^2$ .

A consistência dos produtos interesterificados apresentou valor médio de  $478,02 \pm 71,78 \text{ gf/cm}^2$ , o que representa porcentagem de redução média de  $52,31 \pm 7,16\%$ , em relação à consistência da mistura inicial. Este valor é considerado adequado para um produto com plasticidade e espalhabilidade adequadas, sob temperatura de refrigeração (Ribeiro *et al.*, 2009).



**Figura 4** - Consistência ( $\text{gf/cm}^2$ , ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em  $\text{SiO}_2$ -PVA, em reator de leito fluidizado.

A reação foi mantida por 7 dias e, após o término, efetuou-se a dosagem da atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada, para se calcular o tempo de meia vida e avaliar sua

estabilidade operacional (Paula, 2012). Após a reação, o biocatalisador manteve 73% de sua atividade hidrolítica inicial, o que resultou em um tempo de meia vida de 16 dias.

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelam que a lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA representa um biocatalisador com elevado potencial para modificação da gordura de leite empregando-se reator de leite fluidizado, uma vez que permitiu a obtenção de um produto interesterificado com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro.

## 6. NOMENCLATURA

Col	Colesterol
GI	Grau de Interesterificação
L036P	Lipase L036P
SiO <sub>2</sub> -PVA	Polissiloxano-Álcool Polivinílico
TAG	Triglicerídeo

## 7. REFERÊNCIAS

- AGUEDO, M.; HANON, E.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; LOGNAY, G.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J. P.; BLECKER, C. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oils through enzymatic interesterification. *J. Agr. Food Chem.*, v. 56, p. 1757-1765, 2008.
- AKOH, C. C. Structured and Specialty Lipids. In AKOH, C. C; LAI, O. M. *Healthful Lipids*. United States of America: AOCS PRESS, 2005. 762 p.
- ALIM, M. A.; LEE, J. H.; SHIN, J. A.; LEE, Y. J.; CHOI, M. S.; AKOH, C. C.; LEE, K. T. Lipase-catalyzed production of solid fat stock from fractionated rice bran oil, palm stearin, and conjugated linoleic acid by response surface methodology. *Food Chem.*, v. 106, p. 712-719, 2008.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. AOCS Press, 2004. 5th Edition.
- BALCÃO, V. M.; KEMPPINEM, A.; MALCATA, F. X.; KALO, P. J. Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: Process and product characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 75, p. 1347-1358, 1998.
- LEDOUX, M.; CHARDIGN, J-M.; DARBOIS, M.; SOUSTRE, Y.; SÉBÉDIO, J-L.; LALOUX, L. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *J. Food Compos. Anal.*, v. 18, p. 409-425, 2005.



- O'BRIEN, R. D. Fats and oils: Formulating and processing for applications. 2 ed. Florida: CRC Press, 2009.
- OSÓRIO, N. M.; FONNSECA, M. M.; FERREIRA-DIAS, S. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 108, p. 545-553, 2006.
- PAULA, A. V. Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.
- PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SILVA, J. L.; CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 160, p. 1146 - 1156, 2010a.
- PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; FREITAS, L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2010b, in press.
- RIBEIRO, A.P. B.; BASSO, R. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Instrumental methods for the evaluation of interesterified fats. *Food Anal. Methods*, v. 2, p. 282-302, 2009.
- RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Res. Int.*, v. 36, p. 149-159, 2003.
- RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A.; ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. *Ciência Tecnol. Alimentos*, v. 23, p. 226-233, 2003.
- SHIN, J. A.; AKOH, C. C.; LEE, K. T. Production and physicochemical properties of functional - butterfat through enzymatic interesterification in a continuous reactor. *J. Agri. Food Chem.*, v. 57, n. 3, p. 888-900, 2009.
- TEIXEIRA, J. A.; FONSECA, M. M.; VICENTE, A. Geometria e modos de operação. Em: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações. Lisboa: Lidel, 2007.
- WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Enzymatic Interesterification. In: AKOH, C. C. and MIN, D. B. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. Florida: CRC Press, 2008. Cap. 30. p. 807. ISBN 978-1-4200-4663-2.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (ed.) Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p.35-85.