

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

A. V. de Paula¹; G. F. M. Nunes²; H. F. de Castro²; S. Ferreira-Dias³; J. C. dos Santos⁴

¹ Univ Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

² Univ de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química

³ Univ de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia

⁴ Univ de São Paulo, USP, Departamento de Biotecnologia

E-mail para contato: ariela@fcar.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 SiO₂-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/cm²). 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 leite 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 (SiO₂-PVA). Isso porque reatores de leite fluidizado constituem-se em uma alternativa para atenuar problemas apresentados por sistemas como o leite 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 (SiO₂-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 SiO₂-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.

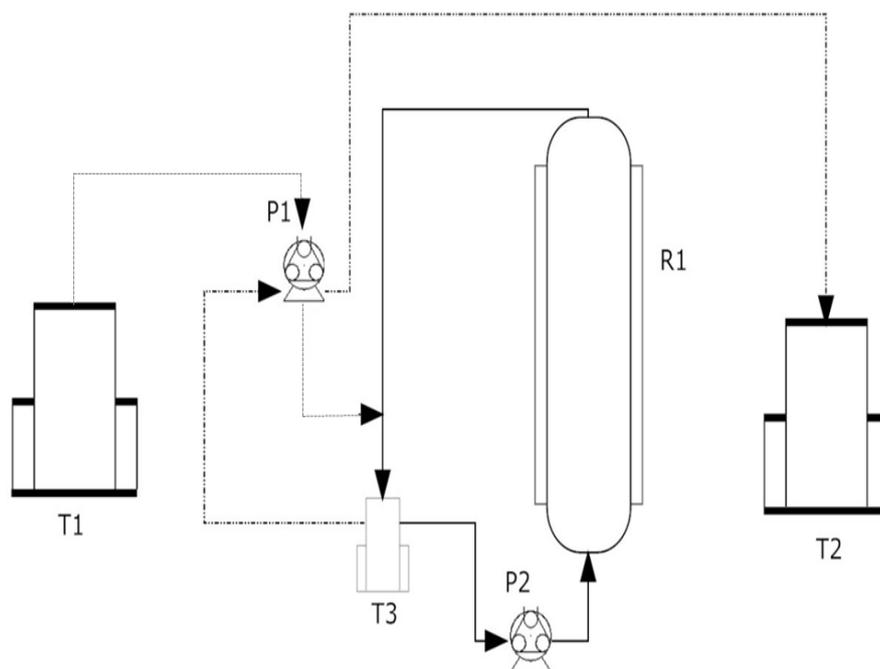


Figura 1 - Fluxograma simplificado do reator de leito fluidizado empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: sistema contínuo, com recirculação. T1. Reservatório de alimentação; T2. Reservatório de produtos; T3. Reservatório para conexões e recirculação; R1. Reator 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).

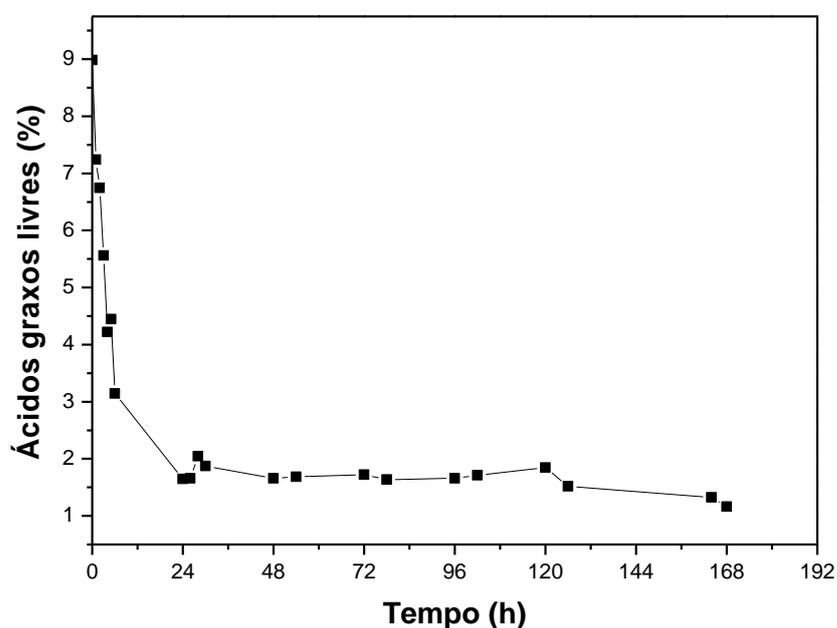


Figura 2 - Teor de ácidos graxos livres (%) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (mistura 65%:35%) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado.

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 C₂₄-C₃₀ e C₄₆-C₅₂ aumentou, nas primeiras 6h de reação, diminuindo e mantendo-se praticamente constante após este período. A concentração dos TAGs C₃₂-C₄₄ 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 C₅₄, 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.

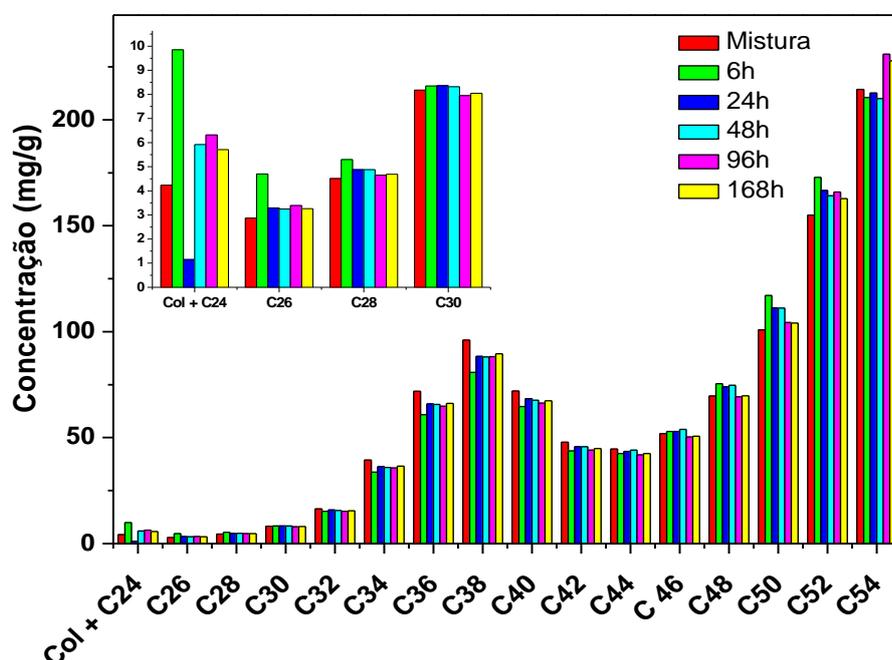


Figura 3 - Perfil de concentração de triglicerídeos obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (mistura 65%:35%) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fluidizado (Col = colesterol).

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 (200-800 gf/cm^2). A mistura inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) possuía consistência de $1002,43 \pm 44,65 \text{ gf}/\text{cm}^2$.

A consistência dos produtos interesterificados apresentou valor médio de $478,02 \pm 71,78 \text{ gf}/\text{cm}^2$, 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).

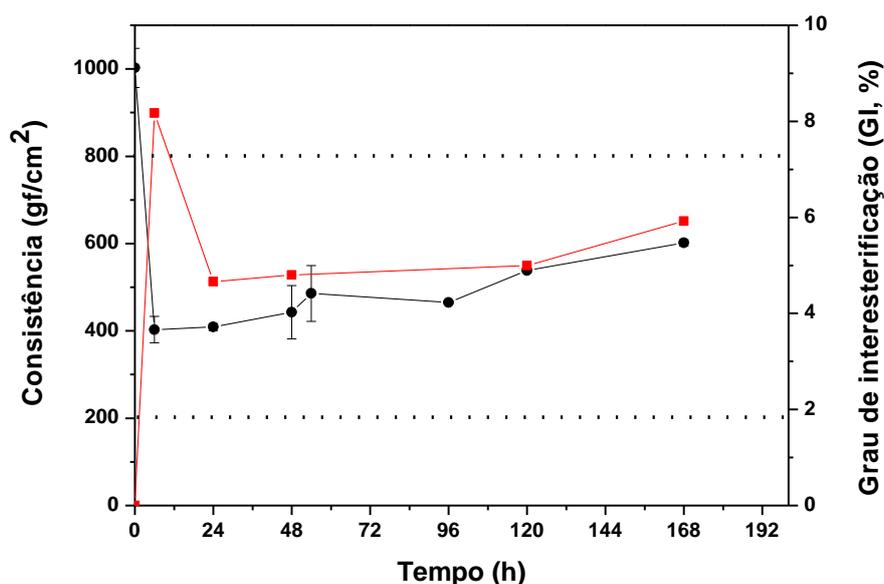


Figura 4 - Consistência (gf/cm^2 , ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA, em reator de leito fluidizado.

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 SiO₂-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 ₂ -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: AOSC 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.