

Lipases: características e aplicação em alimentos



INTRODUÇÃO

- São esterases que catalisam a hidrólise de ligações éster preferencialmente sobre **substratos insolúveis em água;**
- Catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol;
- Tem papel fundamental no metabolismo de lipídeos dos seres vivos;
- São enzimas produzidas de forma extracelular.

Aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial de lipases têm sido intensivamente estudadas devido a 3 motivos principais:

- 1) Por serem enzimas que apresentam uma forma incomum de ação – são solúveis em água mas catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos;**
- 1) Apresentam grande relevância para a área médica – têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular;**
- 1) São capazes de catalisar reações de síntese e grande estabilidade em solventes orgânicos. Assim, apresentam grandes vantagens em relação a catalisadores convencionais, pois trabalham na temperatura e pressão ambiente.**

Principal função das lipases

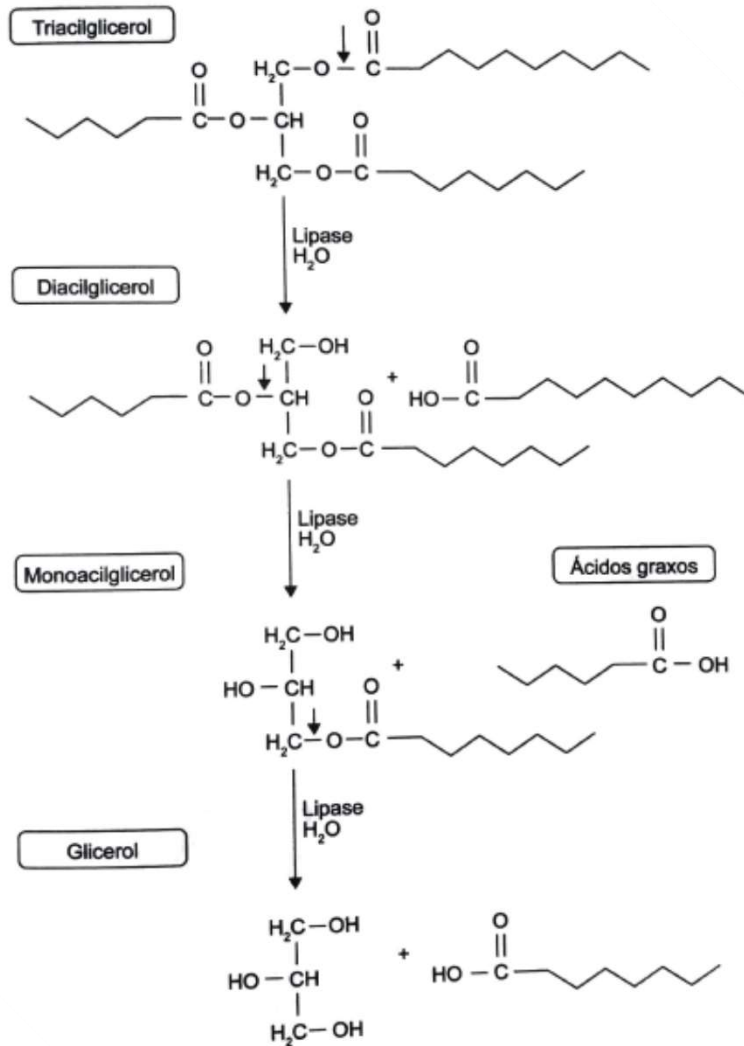


Figura 4.1 Hidrólise de triacilglicerol por lipase.

Reações de síntese ↓ atividade de água

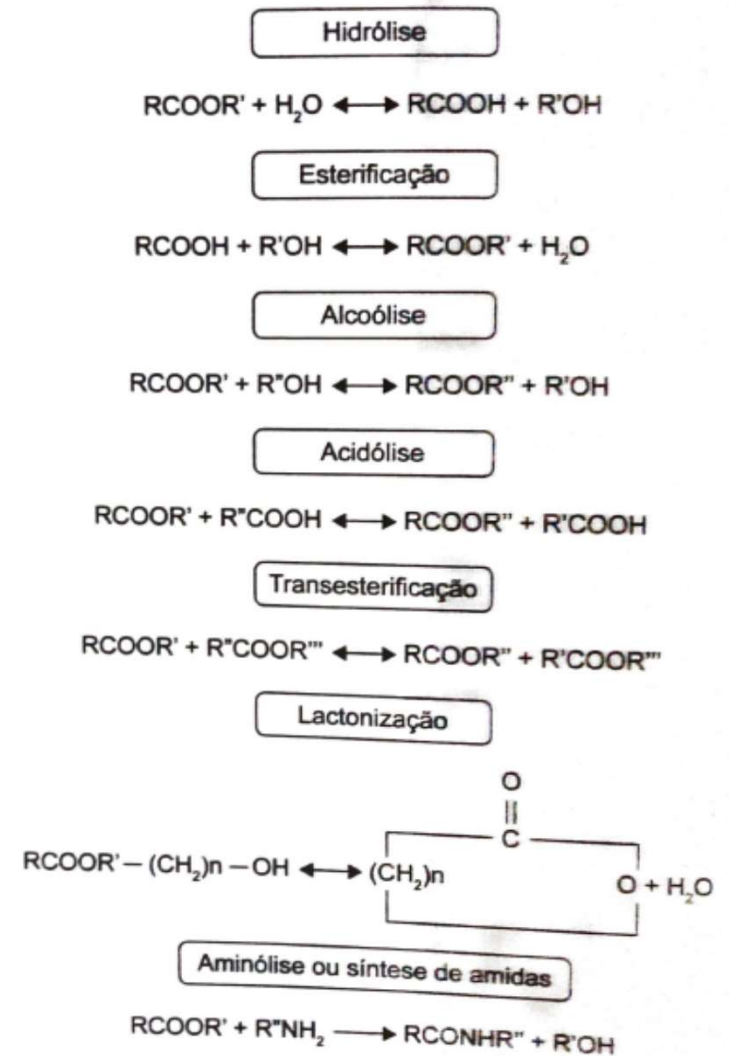


Figura 4.2 Reações catalisadas por lipases.

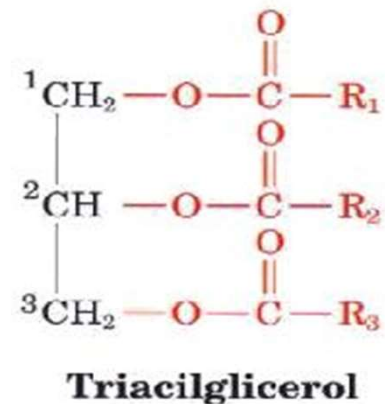
Características gerais e modo de ação

- **São enzimas pertencentes ao grupo das serinas proteases;**
- **São enzimas ricas em cisteína;**
- **Sua atividade é muito aumentada quando situada na interface polar/apolar.**

Classificação das lipases

1) Regiosseletividade

- **Lipases 1 (3) – específicas:** hidrolisam ésteres nas posições 1 (3) dos triacilgliceróis;
 - * Resta 2-monoacilgliceróis;
 - * O 2-monoacilgliceróis tendem a sofrer isomerização e o ácido graxo migra espontaneamente para as posições 1 ou 3, permitindo a hidrólise.
- **Lipases não específicas:** hidrolisam igualmente ligações éster nas posições 1(3) e 2 do triacilglicerol.



2) Seletividade de substrato

- **Propriedade de reconhecer um tipo de ácido graxo e hidrolisar as ligações nas quais ele está envolvido.**
 - * **Em relação ao tamanho da cadeia: ác. graxos de cadeia curta (até 10 C), média (12 e 14 C), longa (acima de 16 C) e muito longa (acima de 22 C);**
 - * **Em relação ao grau de insaturação do ác. Graxo: saturado, mono, di- ou poli-insaturado;**
 - * **Algumas lipases apresentam seletividade negativa, hidrolisando ligações éster envolvendo todos os ácidos graxos, exceto alguns. Em geral, ác. Graxos poli-insaturados como EPA, DHA e o ácido γ -linolênico não são reconhecidos por diversas lipases.**

3) Enantiosseletividade

- **Propriedade de reagir com um determinado isômero do substrato exclusivamente ou mais rapidamente do que com outros isômeros da mesma substância.**

Tabela 4.1 Seletividade de lipases de diferentes fontes.

Fonte da lipase	Seletividade de substrato	Regiosseletividade
Pancreática	C>M,L	1,3
Pré-gástrica	C,M>>L	1,3
<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
<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 sp.</i>	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. Reproduzida de Xu, 2000.

Fontes de lipases e principais características

♦ Lipases animais

- **A lipase pancreática suína é a lipase de uso comercial mais estudada;**
- **Trata-se de uma enzima 1(3)- específica;**
- **Preferência por ácidos graxos de cadeia curta;**
- **pH ótimo de atuação entre 7,0 e 9,0.**

◆ Lipases microbianas

► Origem fúngica

- *Candida antarctica* foi isolada do lago Vanda, na Antártica, de alta salinidade e coberto de gelo;
- Produz duas isoformas de lipases, chamadas A e B (ou CaL A e CaL B);
- Preferência por ácidos graxos de cadeia curta;
- pH ótimo de atuação entre 7,0 e 9,0.

Tabela 4.2 Comparação entre CaL A e CaL B.

Característica	CaL A	CaL B
Massa molecular (kDa)	45	33
Ponto isoelétrico (pI)	7,5	6,0
pH ótimo	7,0	7,0
Atividade específica (U/mg)	420	435
Termoestabilidade a 70°C	100	15
Estabilidade ao pH	6,0 a 9,0	7,0 a 10,0
Ativação na interface	Sim (baixa)	Não

Adaptada de Kirk; Christensen, 2002.

- Outras espécies de *Candida* (*C. cylindracea* e *C. rugosa*) também são boas produtoras de lipases inespecíficas;
- Entre os fungos filamentosos, os gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor* e *Aspergillus* são produtores de lipases 1(3) específicas (ác. Graxos até 12 carbonos);
- Destes o *Rhizomucor miehei* é o de maior aplicação industrial;
- Utilizado para hidrolisar gorduras animais e óleos vegetais;
- Atualmente esta enzima é comercializada na forma livre ou imobilizada, sob o nome comercial de **Lipozyme®**



- Uma lipase fúngica de considerável interesse é a produzida por *Geotrichum candidum*;
- Essa enzima é conhecida como lipase cis-9-ácido graxo específica;
- Apresenta grande seletividade por ácidos graxos contendo uma **insaturação entre os carbonos 9 e 10**, como os ácidos oleico e linoleico.



► Origem bacteriana

- Diversos gêneros de bactérias já foram estudados por produzirem lipases;
- *Burkholderia cepacia*: sua lipase está disponível em forma livre immobilizada em diferentes suportes e comercializada pela empresa japonesa Amano.

Tabela 4.3 Características de algumas lipases bacterianas.

Linhagem	Massa molecular (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	33	8,5	65
<i>Enterococcus faecium</i>	19	10,8	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	8,0	45
<i>Bacillus stratosphericus</i>	19	9,0	35
<i>Streptomyces lividans</i>	31	8,0	50
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	23	10	40
<i>Bacillus pumilus</i>	27	8,0	45
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	50	9,0	65
<i>Yersinia enterocolitica</i>	34	9,0	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	9,0 a 10,0	40
<i>Colwellia psychrerythraea</i>	34	7,0	25
<i>Bacillus pumilus</i>	62	6,0	60
<i>Acinetobacter baylyi</i>	30	8,0	60
<i>Spirulina platensis</i>	45	6,5	45
<i>Pseudomonas gessardii</i>	92	5,0	30

Javed et al., 2018.

► **Origem vegetal**

- **Não são comercializadas lipases vegetais de aplicação industrial;**
- **Porém as fontes mais estudadas para estas lipases são as sementes de leguminosas.**

IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

♦ Rancidez hidrolítica

- As lipases são responsáveis por um tipo de deterioração de alimentos, conhecido como **rancidez hidrolítica**;
- Consiste na hidrólise de triacilgliceróis do alimento com a formação de **ácidos graxos livres**;
- Quando **voláteis os ácidos graxos** geram odor desagradável de ranço;
- Muito comum em laticínios, pois o leite possui lipases nativas e sua gordura apresenta quantidades consideráveis dos ácidos **butírico (4:0)**, **caproico (6:0)** e **caprílico (8:0)**;
- Estes ácidos são de baixo peso molecular, portanto voláteis, e com **odor considerado desagradável**.

- **Produtos de origem vegetal (óleos, grãos, farinhas e farelos) também podem se deteriorar em função de lipases nativas;**
- **Por apresentarem ácidos graxos de alta massa, e não voláteis, o aroma de ranço não é percebido;**
- **No entanto, a presença de altos teores de ácidos graxos livres (alta acidez) é considerada muito indesejável;**
- **Ácidos graxos livres tendem a ser mais suscetíveis a oxidação, acelerando o processo de peroxidação lipídica;**
- **Além disto, óleos com alta acidez, apresentam menor ponto de fumaça;**
- **Necessário branqueamento para inativação térmica de lipases;**

APLICAÇÃO INDUSTRIAL

♦ Panificação

- **A introdução de lipases em massa de pão se deu por volta dos anos de 1990;**
- **A liberação de acilgliceróis parciais (mono- e diacilgliceróis), com propriedades emulsificantes;**
- **A presença de emulsificantes promove o aumento da capacidade de retenção de ar da massa (produto mais fofo) e miolo mais branco;**
- **Há também aumento da capacidade de retenção de água o que retarda a retrogradação;**
- **Certos acilgliceróis apresentam atividade antimicrobiana;**

◆ Produção de óleos e gorduras estruturadas

- São produtos que contêm triacilgliceróis sintetizados artificialmente com o objetivo de alterar as concentrações relativas de seus ácidos graxos constituintes, assim como a posição no esqueleto do glicerol;
- A obtenção de triacilgliceróis estruturados é feito por interesterificação química ou enzimática entre dois diferentes óleos ou entre óleos e ácidos graxos;
- A síntese química apresenta várias desvantagens (**subprodutos de cor escura e odor indesejado**).

► Uso nutricional

- A absorção de ácidos graxos pelo intestino humano levaram a conclusão que ácidos graxos de cadeia longa são mais prontamente absorvidos na forma de **2-monoacilgliceróis**;
- Óleos com fins terapêuticos devem conter os **ácidos graxos essenciais (ou outros desejáveis)** na posição 2;
- Uma vez que a lipase pancreática humana é uma lipase 1,3-específica;
- Com base nesses conhecimentos, diversos produtos vêm sendo desenvolvidos e alguns já estão no mercado de certos países.

♦ Substitutos da gordura do leite humano

- As chamadas fórmulas infantis são produtos que visam **substituir o leite humano** quando a amamentação não é possível;
- Até pouco tempo atrás os lipídeos constituintes deste tipos de fórmulas eram provenientes do **leite de ruminantes** ou **óleos vegetais**;
- Além de apresentarem composição em ácido graxos distinta daquela do leite humano, a posição desses ácidos graxos no esqueleto do glicerol era totalmente diferente;
- **Ácido palmítico**, por exemplo, sempre se encontra na **posição 2** e **ácido oleico** nas posições **1 e 3**.



◆ **Lipídeos com baixo valor energético**

Esse tipo de alimento vem sendo desenvolvido recentemente, como uma forma de fornecer produtos de menor valor calórico, para redução da obesidade.

▶ **Triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeias média e longa**

- **A maior parte dos óleos e gorduras alimentares é rica em ácidos graxos de cadeia longa (> 16 C), cujo metabolismo é lento e tendem a serem armazenados no tecido adiposo;**
- **Ácidos graxos de cadeia media (< teor calórico) são mais hidrofílicos e são rapidamente metabolizados no fígado;**
- **No entanto a produção de lipídeos ricos apenas em ác. graxos de cadeia media gera deficiência em ác. graxos essenciais (18:2 ω 6);**
- **Produção de lipídeos por interesterificação de cadeia media com lipídeos com cadeia longa (MLM, MML, LML e LLM).**

► **Triacilgliceróis contendo ác. graxos de cadeias muito curta ou muito longa**

- **Esses ácidos graxos fornecem valor energético reduzido ou por serem de peso molecular muito baixo (entre 2 e 4 C);**
- **Ou por serem muito pouco absorvidos pelo intestino (acima de 22 C).**

► Diacilgliceróis

- De acordo com a literatura científica, óleos ricos em diacilgliceróis (DAG), reduzem a deposição de gordura no tecido adiposo e auxiliam na redução do peso corpóreo de uma forma geral;
- Esse produto pode ser obtido por esterificação entre ácidos graxos e glicerol (lipase 1,3 – específica) ou por glicerólise.



► Uso tecnológico (Manteiga de cacau)

- A manteiga de cacau é constituída principalmente pelos seguintes triacilgliceróis: POP (15 a 20%), POS (35 a 40%) e SOS (25 a 30%); (P=ácido palmítico; O=ácido oleico; S=ácido esteárico)
- Quantidade de manteiga de cacau é insuficiente para atender o mercado mundial.

► Uso tecnológico (Produção de margarina)

- Produção de margarinas livres de ácidos graxos *trans* (↓ HDL ↑ LDL);
- Insteresterificação de óleos (ex. Óleo soja natural e óleo soja totalmente hidrogenado).



◆ Produção de outros ingredientes

► Modificação de compostos bioativos

- **Esterificação de compostos fenólicos** para aumentar a hidrofobicidade, e assim possibilitar a sua aplicação em óleos e gorduras como inibidores da peroxidação lipídica;
- **Estereificação de fitoesteróis**, para assim se possibilitar uma maior absorção.

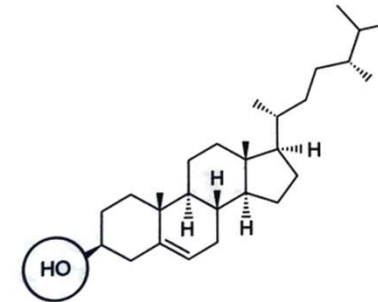
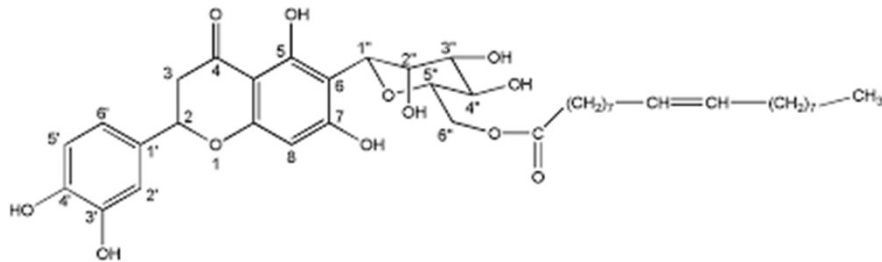


Figura 4.7 Estrutura do campesterol. No destaque, a hidroxila que sofre esterificação com ácidos graxos.

► Gordura de leite lipolisada

- **Esse produto é utilizado como flavorizante em aromas de manteiga para margarina e pipocas, aroma de queijo etc.;**
- **É produzido a partir de leite concentrado ou de manteiga clarificada;**

► Maturação acelerada de queijos

- É considerada uma das mais antigas aplicações de lipases exógenas em alimentos;
- Baseia-se no uso de lipases animais (**lipase pré-gástrica de cabrito: queijo parmesão**) ou lipases microbianas (em geral **fúngicas: *Penicillium roquefortii*, *P. camembertii***), e de inóculo microbiano;
- As lipases liberam ácidos graxos que dão **sabor e o aroma específico** dos diferentes queijos;
- **Reduz significativamente o tempo de maturação.**



Obrigado