

# LIPASES MICROBIANAS NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES FORMADORES DE AROMA<sup>1</sup>

MACEDO, Gabriela, A.<sup>2</sup> & PASTORE, Gláucia, M.<sup>3</sup>

## RESUMO

Foram testadas cinco lipases microbianas produzidas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos-FEA-UNICAMP, quanto à capacidade de catalisar a síntese de ésteres formadores de aroma por esterificação em meio isento de solvente orgânico. A natureza da enzima assim como o tamanho da cadeia dos ácidos afetaram as taxas de conversão obtidas. Os melhores resultados obtidos foram 88 % de conversão na síntese de laurato de isoamila e 72% para propionato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* após 24 horas de incubação, seguido de 82% de conversão na síntese de acetato de isopropila por *Alcaligenes sp* após 24 horas de incubação.

**Palavras chave:** lipases, biocatálise, ésteres, aromas

## SUMMARY

LIPASES BIOCATALYSIS IN THE PRODUCTION OF FLAVOR ESTERS. Five lipases produced at UNICAMP were screened for their ability to synthesize flavor esters by esterification in organic solvent free system. The nature of the enzyme, as well as the chain length of the acyl donor used affected the product yields. Lipase from *Rhizopus sp* and *Alcaligenes sp* gave the best overall yield (88 and 82%).

**Key words:** lipases, biocatalysis, esters, flavor

## 1 — INTRODUÇÃO

Triacil glicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3) ou lipases, são enzimas que catalisam preferencialmente a hidrólise de acilglicerídeos na interface óleo/água (15). As reações hidrolíticas catalisadas por lipases são essencialmente reversíveis, e o potencial destas enzimas na síntese de ésteres tem sido bem documentado (2, 3).

O mercado mundial para compostos de aroma está avaliado em U\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor total do mercado de aditivos alimentares (20).

Devido à complexidade de muitos aromas naturais, tanto em relação à composição como estrutura química individual, a aplicação de métodos biotecnológicos, particularmente enzimáticos, na produção destes produtos tem atraído muita atenção desde a última década. Adicionalmente, aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como "naturais" ou "idênticos ao natural" e portanto são preferidos pelo mercado consumidor. A presença de aromas adiciona valor ao produto, o que significa que o custo da biocatálise passa a ser menos significativo.

Durante os últimos 10-15 anos processos biotecnológicos têm-se estabelecido nas indústrias de aroma para produção de aromatizantes naturais (1, 8).

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes de aromas naturais usados na indústria alimentícia que contribuem na formação e acentuação dos aromas em alimentos. Pode-se citar como exemplos os ésteres butirato de etila e acetato de isoamila que são respectivamente encontrados nos aromas de morango e banana.

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e fragrâncias dos alimentos que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos. São conhecidos muitos ésteres componentes de aromas naturais que têm sido obtidos de fonte natural ou por métodos tradicionais de síntese química, todos resultando em produtos com o preço final muito alto devido ao grau de pureza e estereoespecificidade requeridos. Quando estes ésteres são produzidos por síntese química, não podem ser considerados aromas naturais, sendo portanto, menos valorizados no mercado que outros ésteres obtidos de fontes naturais. Contudo, quando são produzidos ésteres por via biotecnológica, estes podem ser considerados naturais.

O principal objetivo deste trabalho é demonstrar a habilidade das lipases produzidas em escala de laboratório na síntese de ésteres diversos, comparando o desempenho obtido com o alcançado por uma lipase comercial (*Candida rugosa*). Para tanto, utilizar-se-á além de álcoois puros, a mistura chamada óleo fúsel e lipases microbianas isoladas e produzidas no laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, na UNICAMP (16, 17).

O óleo fúsel é um resíduo da indústria alcooleira, constituído de uma mistura de alcóois superiores, etanol, água e outros compostos. Com relação ao volume gerado no processo, são estimadas proporções entre 0,5 a 1% de óleo fúsel para cada litro de álcool produzido. Considerando que, a produção de álcool no país é da ordem de 12 bilhões de litros por ano, o volume de óleo fúsel gerado é de aproximadamente 120 milhões de litro (6).

Apesar de sua composição rica em alcóois superiores a taxa de recuperação deste resíduo é de apenas 0,25% do total produzido no país, ou seja, 30 milhões de litros por ano. Entre os possíveis processos de aproveitamento pode-se citar a sua utilização para a produção de alcóois superiores por destilação fracionada simples ou dupla, dependendo do produto final obtido. Vale lembrar que, atualmente no Estado de São Paulo existe uma unidade de produção de álcool isoamílico a partir de óleo fúsel, no entanto, nem toda a produção de óleo fúsel do Estado é processada (6).

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 23/10/96. Aceito para publicação em 20/05/97.

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup> de Alimentos doutoranda em Ciências de Alimentos - FEA/UNICAMP.

<sup>3</sup> Prof<sup>a</sup> do Depto de Ciências de Alimentos- FEA/UNICAMP - Cx. Postal 6121, Cep 13083-970 Campinas, SP.



Apesar do aproveitamento deste resíduo não atuar diretamente na redução do custo final do álcool etílico, certamente representaria um importante passo no sentido de incrementar a eficiência global da Indústria Alcooleira. Neste sentido, a utilização desta matéria prima, abundante e de baixo custo, como precursor de ésteres aromatizantes para a indústria de alimentos, torna-se bastante atrativa sob os pontos de vista técnico-econômico.

Por se tratar de um subproduto da fermentação alcoólica de carboidratos, a composição dos álcoois superiores pode variar em função da matéria-prima empregada no processo. No trabalho de WELSH *et al.* (21) bem como o de Kyowa e colaboradores (12) foi utilizado óleo fúsel proveniente da fermentação de milho cuja composição média foi de propanol (2,32%), isobutanol (17,8%) e isoamílico (79,7%).

No presente trabalho foi utilizado óleo fúsel proveniente da fermentação de caldo de cana-de-açúcar, fornecido pelas usinas do Estado de São Paulo (6) possuindo a seguinte composição média (em porcentagem em peso): água (15,45%), etanol (13,27%), n-propanol (1,69%), isobutanol (15,18%), n-butanol (0,93%) e isoamílico (51,40%).

## 2 — MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 — Materiais

#### 2.1.1 - Enzimas

As fontes das preparações de lipases utilizadas nos testes foram os respectivos microrganismos: *Geotrichum sp*, *Alcaligenes sp*, *Aspergillus sp* 1068, *Aspergillus sp* 1099, *Rhizopus sp*, isolados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA – UNICAMP e finalmente a lipase comercial I proveniente de *Candida rugosa* da Meito Sangyo, usada como padrão comparativo das reações. As lipases preparadas em escala laboratorial seguiram procedimento padrão para cada tipo de linhagem como descrito em TSUJISAKA *et al.* (19). São preparações obtidas por precipitação com sulfato de amônio do caldo fermentativo dos microrganismos produtores de lipase extracelular. As soluções precipitadas sofreram diálise e finalmente foram liofilizadas e utilizadas desta forma.

A Tabela 1 a seguir refere-se às atividades das preparações enzimáticas empregadas neste trabalho.

TABELA 1. Atividade das preparações enzimáticas.

Enzima	Atividade (U/mg de enzima)
<i>Geotrichum sp</i>	3,60
<i>Alcaligenes sp</i> B	0,60
<i>Aspergillus sp</i> 1068	3,70
<i>Aspergillus sp</i> 1099	1,16
<i>Rhizopus sp</i>	4,16
<i>Candida rugosa</i>	12

#### 2.1.2 - Substratos

Para a síntese dos ésteres foram testados os seguintes alcóois: metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol e isopropanol (Merck), isoamílico e óleo fúsel - CTC (6); com os ácidos: láurico (Henkel), acético e propiônico (Merck).

## 2.2 – Métodos

### 2.2.1 - Determinação da atividade de lipase

A atividade lipolítica das enzimas foi medida como descrito em Macedo & Pastore (16,17), método adaptado de Jensen (11). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

### 2.2.2 - Reações de esterificação

As reações de esterificação foram realizadas em tubos plásticos cilíndricos de 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro com tampa de rosca, selados com Parafilm<sup>®</sup>. O sistema padrão para os testes foi composto por 0,02 moles de ácido graxo para 0,04 moles de álcool, 10 pérolas de vidro e adição de 1% de enzima em relação à massa dos reagentes. Os frascos foram incubados com os substratos por 15 minutos em banho a 40°C antes da adição da enzima. As reações foram realizadas a 40°C em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto, por um período de 24 horas.

### 2.2.3 - Análise do teor de ácido graxo residual

Foram retiradas alíquotas e dissolvidas em 10 mL de etanol com 0,1% de fenolftaleína e tituladas contra KOH 0,5 N (7,10). A porcentagem residual de ácidos graxos livres foi calculada pela fórmula :

$$\% \text{AGR} = V \times N \times \text{PM} / 10 \times W$$

Onde:

V = volume gasto de KOH na titulação;

N = normalidade da solução de KOH utilizada;

PM = peso molecular do ácido graxo titulado;

W = peso da alíquota titulada.

## 3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores percentuais da síntese de ésteres de ácido acético, ácido láurico e ácido propiônico obtidos por esterificação direta catalisada pelas lipases de *Geotrichum sp*, *Alcaligenes sp*, *Aspergillus sp* L 1068 e L 1099, *Rhizopus sp* e *Candida rugosa* estão dispostos nas Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente, tendo sido as porcentagens de esterificação calculadas por titulação do ácido residual no meio reacional, como descrito nos trabalhos de IWAI *et al.* (10) e GANDHI *et al.* (7).

### 3.1 – Ésteres de ácido acético

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos nas reações de síntese com o ácido acético. As lipases estudadas se mostraram hábeis em catalisar a esterificação de alcóois primários com ácido acético. Os melhores resultados foram obtidos com a enzima de *Candida rugosa* (comercial) na síntese de acetato de propila com 99% e conversão após 8 horas de reação (dados não expostos), com a lipase de *Geotrichum sp*, na síntese de acetato de butila com 80% de conversão após 24 horas de reação e finalmente, com a lipase de *Alcaligenes sp* na síntese de acetato de isopropila com 82 % de conversão após 24 horas de reação. É inte-



ressante observar ainda que foi obtida uma taxa de conversão acima de 70% por todas as lipases testadas na esterificação com o isopentanol e o óleo fúsel.

**TABELA 1.** Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido acético por lipases de diferentes fontes após 24 horas de reação.

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação							
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Isopropanol	Isobutanol	Isoamílico	Ó. fúsel
<i>Geotrichum</i> sp 72	60	70	74	80	76		81	75
<i>Alcaligenes</i> sp 74	57	72	75	79	82		75	73
<i>Aspergillus</i> sp 1068 72	54	75	70	65	70		65	76
<i>Aspergillus</i> s 1099 73	61	62	69	72	68		73	75
<i>Rhizopus</i> sp 73	56	60	65	70	72		63	76
<i>Candida rugosa</i> (com.) 74	45	57	66	70	65		73	74

Grande parte da literatura disponível na área de síntese de acetatos por catálise enzimática relata o meio reacional com solventes orgânicos. LANGRAND *et al.* (14) encontraram 80% e 23% de conversão na síntese de acetato de isoamila (isopentanol) usando lipase de *Mucor miehei* (Gist-Brocades) e *Aspergillus* (Rohm) respectivamente. Na síntese de acetato de geraniol a maior conversão foi de 14% pelas lipases de *Mucor miehei* (Gist-Brocades) e *P. cyclopium* b (SNEA). As reações foram realizadas em presença de n-heptano no meio reacional.

IWAI *et al.* (10) não observaram qualquer reação entre ácido acético e geraniol com lipases purificadas de *A. niger*, *R. delemar*, *G. candidum* e *P. cyclopium*.

Taxas de conversão de 16 e 84% foram observadas após 8 e 48 horas de reação com lipase de *P. fragi* purificada e modificada em PEG, na síntese de acetato de isoamila e geraniol na concentração de 0,1 M por NISHIO *et al.* (18).

GILLIES *et al.* (9) produziram vários ésteres em heptano, com a lipase imobilizada de *C. cylindracea* após 24 horas de reação, obtendo 24 e 25 % de conversão molar de acetato de isobutanol e isoamila respectivamente.

### 3.2 – Ésteres de ácido láurico

A Tabela 3 apresenta os dados obtidos nas reações com o ácido láurico. A idéia da utilização do ácido láurico como substrato surgiu do fato de este ácido poder ser obtido com abundância e a baixo custo em nosso país, proveniente do óleo de babaçú. Ésteres de ácido láurico como os etil, butil e isoamil lauratos são produzidos e comercializados como compostos acentuadores de aromas de frutas na Europa.

Os melhores resultados obtidos nas sínteses com o ácido láurico foram 88% de conversão na obtenção de laurato de isoamila e cerca de 80% de conversão na síntese de butil laurato após 24 horas de reação pela lipase de *Rhizopus* sp. Vale ressaltar que a especificidade desta lipase por ácido láurico é uma característica muito importan-

te que deve ser explorada mais intensamente. Existe pouca literatura disponível na síntese de ésteres de ácido láurico por catálise enzimática. GILLIES *et al.* (9) obtiveram 52 % de conversão na síntese de etil laurato em heptano após 24 horas de reação com lipase de *C. cylindracea*.

**TABELA 3.** Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido láurico por lipases de diferentes fontes após 24 horas de reação.

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação							
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Isopropanol	Isobutanol	Isoamílico	Ó. fúsel
<i>Geotrichum</i> sp 55	20	29	34	44	36		46	40
<i>Alcaligenes</i> sp 61	22	26	45	35	40		36	46
<i>Aspergillus</i> sp 1068 61	30	30	37	42	40		50	43
<i>Aspergillus</i> s 1099 59	18	30	40	43	49		47	48
<i>Rhizopus</i> sp 61	11	29	22	82	23		82	88
<i>Candida rugosa</i> (com.) 60	28	31	40	72	40		54	63

GANDHI *et al.* (7) estudaram a síntese de butil laurato obtendo 60% de conversão nas seguintes condições: 0,1 mol de ácido láurico, 0,2 mol de n butanol, 250 mg de Lipozyme (Novo) , 41°C após 8 horas de reação.

A idéia da utilização do ácido láurico como substrato surgiu do fato de este ácido poder ser obtido com abundância e a baixo custo em nosso país, proveniente do óleo de babaçú. Ésteres de ácido láurico como os etil, butil e isoamil lauratos são produzidos e comercializados como compostos acentuadores de aromas de frutas na Europa.

Os melhores resultados obtidos nas sínteses com o ácido láurico foram 88% de conversão na obtenção de laurato de isoamila e cerca de 80% de conversão na síntese de butil laurato após 24 horas de reação pela lipase de *Rhizopus* sp. Vale ressaltar que a especificidade desta lipase por ácido láurico é uma característica muito importante que deve ser explorada mais intensamente. Existe pouca literatura disponível na síntese de ésteres de ácido láurico por catálise enzimática. GILLIES *et al.* (9) obtiveram 52% de conversão na síntese de etil laurato em heptano após 24 horas de reação com lipase de *C. cylindracea*.

GANDHI *et al.* (7) estudaram a síntese de butil laurato obtendo 60% de conversão nas seguintes condições: 0,1 mol de ácido láurico, 0,2 mol de n butanol, 250 mg de Lipozyme (Novo) , 41°C após 8 horas de reação.

### 3.3 – Ésteres Propiônicos

A Tabela 4 apresenta os dados obtidos nas reações de síntese com o ácido propiônico. As lipases de *Geotrichum* sp, *Alcaligenes* sp, *Aspergillus* sp L 1099, *Rhizopus* sp e *Cândida rugosa* mostraram fatores de conversão ao redor de 60 %, com exceção marcante na presença de metanol e etanol onde os valores foram inferiores. A síntese com ácido propiônico parece ser favorecida na presença de álcoois com cadeia carbônica superior a C3, independente da fonte



da enzima. Este é um aspecto que deve ser estudado mais a fundo.

**TABELA 4.** Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido propiônico por lipases de diferentes fontes após 24 horas de reação.

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação							
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Isopropanol	Isobutanol	Isoamílico	Ó. fúsel
<i>Geotrichum</i> sp	46	52	61	65	60		70	68
<i>Alcaligenes</i> sp 68	48	55	58	66	59		66	66
<i>Aspergillus</i> sp 1068 54	43	52	65	60	65		60	69
<i>Aspergillus</i> s 1099 66	47	53	63	63	61		64	65
<i>Rhizopus</i> sp 70	52	59	63	69	64		68	72
<i>Candida rugosa</i> (com.) 65	52	48	55	64	56		65	67

LANGRAND *et al.* (14) obtiveram cerca de 80 % de conversão na síntese de propionato de isoamila com lipase de *Mucor miehei* após 1 hora de reação, com lipase de *Aspergillus* após 18 horas de reação e com lipase de *Candida rugosa* após 1 hora de reação. A síntese foi realizada em 5 ml de heptano contendo 0,25 M de álcool e 0,25 M de ácido com 0,2% (p/v) de água e 0,25 g de lipase, a 37°C.

#### 4 — CONCLUSÕES

Como já mencionado anteriormente, grande parte da literatura disponível sobre a obtenção de ésteres formadores de aroma por catálise enzimática versa sobre sistemas em meio orgânico.

Este trabalho visa dentre outros objetivos, produzir ésteres de interesse para a indústria de alimentos. Sendo assim, procurou-se desenvolver a metodologia sem a utilização de solventes orgânicos que podem encarecer o processo de produção pela dificuldade de detoxificação dos produtos, descarte e reciclagem dos solventes pela indústria. Além deste aspecto, as lipases utilizadas neste estudo são preparações brutas de lipases microbianas produzidas por microrganismos isolados no Brasil, sendo portanto objeto de exclusivos resultados, em toda a literatura. As taxas de conversão obtidas para as 5 preparações de lipase indicam potencialidade em catalisar a síntese de ésteres de diferentes ácidos e alcóois nas condições testadas.

Os dados obtidos indicam a necessidade de continuidade deste trabalho no sentido de investigar-se a otimização dos parâmetros de reação, bem como a busca do aprimoramento da metodologia de análise dos ésteres obtidos.

Nestes experimentos iniciais ainda não ficou clara a real influência do tamanho da cadeia carbônica dos substratos nas taxas de conversão obtidas por cada uma das lipases testadas, pode-se contudo, fazer algumas observações. De modo geral, as lipases parecem catalisar com mais eficiência as reações com o aumento da cadeia carbônica dos álcoois. Por outro lado, a influência dos ácidos parece realmente estar associada, em alguns casos, à especifici-

dade hidrolítica de algumas lipases. No caso da lipase de *Geotrichum* sp, que hidrolisa preferencialmente lipídeos com ácidos graxos de cadeia longa e insaturada, pode-se observar que as taxas de conversão obtidas foram baixas com ácido láurico, que também não é bom substrato para hidrólise. Com a lipase de *Rhizopus* sp, que hidrolisa preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta e saturada (principalmente derivados do ácido láurico), pode-se observar ótimas taxas de conversão com o ácido láurico.

Finalmente pode-se concluir que há potencial de emprego dessas lipases na produção de ésteres de aroma. Estudos estão sendo realizados, no sentido de explorar o universo de atuação dessas lipases na síntese de ésteres de aroma. Estão sendo investigados também os parâmetros ótimos da reação de esterificação na produção de um tipo de éster por uma das lipases testadas; os dados estarão publicados oportunamente.

#### 5 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) An Industrial Research Perspective - Biotechnology and Flavor Development. **Food Technology**, abril, p. 108-125, 1986.
- (2) BROCKMAN, H.L.; MOMSEN, W.E.; TSUJITA, T.. Lipid-lipid complexes: Properties and Effects on Lipase Binding to Surfaces. **Journal American Oil Chemists Soc.**, v. 65, n.6, p.891-896, 1988.
- (3) CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A.. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.
- (4) CLAON, P.A. & AKOH, C.C.; Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane. **Biotechnology Letters**, v.15, n.12, p. 1211-1216, 1993.
- (5) CLAON, P.A. & AKOH, C.C.; Lipase-catalyzed synthesis of primary terpenyl acetates by transesterification: Study of reaction parameters. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.2349-2352, 1994.
- (6) CTC- Centro de Tecnologia Copersucar, Piracicaba, sp.1996.
- (7) GANDHI, N.N.; SAWANT, S.B.; JOSHI, B.J. Studies on the Lipozyme-Catalyzed Synthesis of Butyl Laurate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 1-12, 1995.
- (8) GATFIELD, I.L.; HOLZMINDEN, G.R. Enzymatic and microbial generation of flavors. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.5-14, 1995.
- (9) GILLIES, B.; YAMAZAKI, H.; ARMSTRONG, D.W. Production of flavor esters by immobilized Lipase. **Biotechnology Letters**, v.9, n.10, p.709-714, 1987.
- (10) IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. **Agr. Biol. Chem.** 44, p. 2731-2732, 1980.
- (11) JENSEN, R.G.; Detection and determination of lipase activity from various sources. **Lipids**, v.18, n.9. p.650-657, 1983.
- (12) KYOWA, H. Fermented fruit-like flavor production by treating oil and lipid and fusel oil with lipase. **Patente Japanese** - 91- 08186, 1991.
- (13) LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J.. Lipase catalyzed formation of flavour esters. **Biotechnology Letters**, v.10, n.8, p.549-554, 1988.
- (14) LANGRAND, G.; RONDOTT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J.. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnology Letters**, v. 12, n.8, p.581-586, 1990.



