

INVESTIGACIÓN

Estudio comparativo de la obtención de extractos crudos y semipurificados de lipasa de salvado de arroz

Por A. Bella Cruz y D. Barrera-Arellano

Laboratório de Óleos e Gorduras; DTA/FEA/UNICAMP Caixa Postal 6091, 13.083-970
Campinas SP, Brasil. E-mail: barrera@obelix.unicamp.br

RESUMEN

Estudio comparativo de la obtención de extractos crudos y semi-purificados de lipasa de salvado de arroz.

Los extractos crudos de lipasas de salvado de arroz desengrasado fueron obtenidos con tres diferentes soluciones de extracción: 1 - CaCl_2 0.01M; 2 - Sacarosa 0.6M, KCl 10mM, MgCl_2 1mM, Ditiotreitól 2mM; 3 - Sacarosa 0.4M, Ditiotreitól 2mM. Las variedades estudiadas pH (6.0, 7.0, 8.0) y tiempo de extracción (1h, 2h, 3h). La temperatura de extracción fue de 4 °C. Los extractos obtenidos presentaron diferentes actividades de lipasa siendo el extracto crudo obtenido con CaCl_2 0.01M el que mostró la mayor actividad específica (12.1mU/mg). La purificación parcial de este extracto crudo con acetona y sulfato amónico resultó en fracciones con actividad específica de 50.7mU/mg y 63.5mU/mg respectivamente.

PALABRAS-CLAVE: Enzima - Extracción - Lipasa - Purificación - Salvado de arroz.

SUMMARY

Comparative study of the obtention of crude and semi-purified lipase extracts from rice bran.

Crude lipase extracts from defatted rice bran were obtained using three different extraction solutions: 1 - CaCl_2 0.01M; 2 - Sacarose 0.6M, KCl 10mM, MgCl_2 1mM, Ditiotreitól 2mM and 3 - Sacarose 0.4M, Ditiotreitól 2mM. Factors (variables) studied were pH (6.0, 7.0, 8.0) and extraction time (1h, 2h, 3h). Extraction temperature was 4 °C. The extracts obtained presented different lipase activities, and the crude extract obtained with CaCl_2 0.01M was the one with the highest specific activity (12.1mU/mg). Partial purification of this crude extract with acetone and ammonium sulfate resulted in fractions with specific activities of 50.7mU/mg and 63.5mU/mg, respectively.

KEY-WORDS: Enzyme - Extraction - Lipase - Purification - Rice bran.

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas (triacilglicerol acil-hidrolasa, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles liberando ácidos grasos y glicerol (IUPAC-IUB, 1979).

Sin embargo en presencia de solventes orgánicos o en sistemas anhidros, las lipasas pueden presentar un comportamiento totalmente diferente, catalizando reacciones de esterificación y transesterificación (Berry y Paterson, 1990). Dependiendo de su origen, las lipasas pueden tener un peso molecular variable entre 20 000 y 200.000 Da, con actividad en amplios rangos de pH (4.0 a 9.0) y temperatura (ambiente hasta 70 °C) (Borgström y Brockman, 1984). Con relación a su regioselectividad en substratos acilglicéricos, pueden ser clasificadas en lipasas: 1,3 regioespecíficas, ácido graso específicas y no regio-específicas (Macrae y Hammond, 1987; Castro y Anderson, 1995).

Las lipasas han sido encontradas en muchos tejidos y fluidos de animales (mamíferos) y vegetales, o bien pueden ser producidas por procesos fermentativos utilizando diversas especies de microorganismos (hongos y bacterias). Actualmente, desde el punto de vista económico e industrial, los microorganismos han sido los preferidos como fuentes de lipasas (Mukherjee, 1994; Castro y Anderson, 1995).

Trabajos recientes demuestran que es posible obtener extractos parcialmente purificados de lipasas de plantas por técnicas relativamente simples a partir de materias primas de bajo costo (Mukherjee, 1994; Jachmanián *et al.*, 1995).

En el caso del grano de arroz, que posee un potente sistema de lipasas, la mayor parte de esta actividad esta localizada en las capas externas del grano, o sea en el salvado. Este hecho convierte al salvado en una excelente materia prima para la obtención de lipasas, visto que se trata de un subproducto de bajo valor económico y de gran disponibilidad.

Las lipasas del salvado de arroz han sido estudiadas, principalmente con el propósito de determinar su mecanismo de acción, así como sus características físico-químicas (Funatsu *et al.*, 1971, Aizono *et al.*, 1971; 1973; 1976; Shastri y Raghavendra Rao, 1976, Fujiki *et al.*, 1978; Takano, 1993).

Tres tipos principales de lipasas han sido descritas (Funatsu *et al.*, 1971; Aizono *et al.*, 1971; 1976). La lipasa I activada por iones Ca^{++} a baja concentra-

ción ($5 \times 10^{-4} \text{M}$). La lipasa II con peso molecular de 33000 Da, formada de varias sub-unidades unidas por enlaces disulfuro (Fujiki *et al.*, 1978). Ambas lipasas muestran actividad óptima a pH entre 7.5 y 8.0, hidrolizando triacilglicérol de cadena corta o larga, incluyendo trioleína, aceites de arroz, oliva y coco, sin embargo, su actividad es muy superior sobre substratos de cadena corta ($\text{C}_2 - \text{C}_6$) (Borgström y Brockman, 1984). Otros tipos de lipasas como fosfolipasas A₁, A₂, B, C y D (Takano, 1993), galactolipasas (Matsuda y Hirayama, 1979) y esterases (Tsuzuki *et al.*, 1994), también han sido aisladas a partir del salvado de arroz.

La obtención de extractos de lipasas crudos ha sido propuesta por diversos investigadores, donde tres métodos han sido descritos para este propósito (Funatsu *et al.*, 1971; Lin y Hang, 1983; Hills y Mukherjee, 1990) y muestran diferencias considerables entre ellos, no solamente en el proceso (solución y condiciones de extracción) sino principalmente con respecto a su actividad y rendimiento. En este trabajo se realizó un estudio comparativo de los métodos para obtención de extractos crudo y semi-purificado de lipasas de salvado de arroz, con el objetivo de determinar su eficiencia.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El salvado de arroz, recién procesado, fue gentilmente cedido por «Máquina São José» Campinas, SP, Brasil. La composición centesimal del salvado fue determinada siguiendo los métodos: humedad (AACC, 1983 n.º 44-19), proteína bruta (AACC, 1983 n.º 46-12, factor 6.25), cenizas (AOAC, 1980 n.º 923.03), fibra bruta (AACC, 1983 n.º 33-10), extracto etéreo (AOAC, 1984 n.º 27.004) y acidez del aceite (AOCS, 1993 n.º Ca 5a-40).

Obtención del extracto crudo: El salvado de arroz fue desengrasado en un extractor Soxhlet con éter de petróleo, en proporción salvado/solvente 1:6. El extracto crudo de lipasas fue obtenido utilizando los métodos descritos por: 1- Funatsu *et al.*, (1971), con solución de CaCl_2 0.01M; 2- Lin y Huang (1983) con solución de sacarosa 0.6M, KCl 10mM, MgCl_2 1mM, ditiotreitol 2mM y 3- Hills y Mukherjee (1990) con solución de sacarosa 0.4M, ditiotreitol 2mM, usando en todos los casos una relación salvado desengrasado/solución de 1:8. Las variables estudiadas fueron: pH (6.0, 7.0 y 8.0) con tampones McIlvaine y tiempo de extracción (1h, 2h y 3h) con agitación constante de 200 rpm y temperatura de 4 °C. Las suspensiones resultantes fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos (extracto crudo) fueron evaluados con respecto a su actividad lipasa.

Actividad enzimática: La actividad de la lipasa fue determinada utilizando el sustrato sintético p-ni-

trofenilaurato (Dodecanoic acid 4-nitrophenyl ester)(SIGMA). El medio de reacción consistía en 1.9 mL de reactivo (concentración de 0.847mg/mL en solución de McIlvaine 0.05M a pH = 8.0) y 0.1 mL de extracto crudo (solución de enzima). El sistema de reacción fue inmediatamente incubado a 35 °C por 30 minutos en baño agitador a 200 oscilaciones por minuto. La reacción fue interrumpida agregando 4 mL de acetona, seguido de centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue separado y el p-nitrofenol liberado durante la reacción (de color amarillo) fue cuantificado en un espectrofotómetro a 410 nm con ayuda de una curva de calibrado (Palmiano y Juliano, 1973; Pastore, 1992).

Purificación del extracto crudo de lipasa: El salvado de arroz desengrasado (1 kg) fue extraído con una solución de cloruro de calcio (4L) 0.01M a pH 8.0, y temperatura controlada a 4 °C, con agitación constante de 200 oscilaciones durante un período de 2 horas. La suspensión fue centrifugada durante 20 minutos a 5000 rpm y 4 °C. El extracto crudo (sobrenadante) obtenido fue dividido en dos porciones tratadas como sigue:

a) Purificación con acetona (Ncube *et al.*, 1993): Al extracto crudo fueron adicionadas pequeñas porciones de acetona a -20 °C hasta alcanzar 60% (v/v) con agitación constante durante 30 minutos en baño de hielo. El precipitado formado fue separado por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos y temperatura de 4 °C, y el exceso de acetona fue retirado por evaporación a presión reducida (Ncube *et al.*, 1993). El extracto proteico semi-purificado (fracción acetona) fue pulverizado en un mortero.

b) Purificación con sulfato amónico (Funatsu *et al.*, 1971): Al extracto crudo le fue adicionado sulfato amónico hasta una saturación del 60%, con agitación constante. El precipitado formado fue separado por centrifugación (10.000 rpm x 15 minutos) y se le adicionó una cantidad mínima de solución de CaCl_2 0.001M seguido de diálisis a 4 °C por 48 horas. El extracto proteico semi-purificado (fracción sulfato amónico) fue liofilizado y pulverizado en un mortero.

Contenido proteico: El contenido proteico de los extractos semi-purificados fue determinado por el método de Lowry descrito en Kresze (1988), utilizando albúmina de suero bovino, como patrón proteico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición centesimal del salvado de arroz

Los resultados de composición obtenidos (Tabla I), fueron comparables a los valores encontrados por otros autores (Saunders, 1990; Luh *et al.*, 1991).

Tabla I
Composición centesimal del salvado de arroz

Componente	Contenido (%) (*)
Humedad	9.43
Proteína	16.32
Extracto etéreo	14.46
Fibra bruta	13.28
Cenizas	8.06

(*) Media representativa de tres repeticiones.

3.2. Obtención del extracto crudo

Efecto del pH

En la Tabla II se muestra el efecto de diferentes valores de pH utilizados durante el proceso de extracción sobre la actividad hidrolítica de los extractos crudos de lipasa, obtenidos con las soluciones 1, 2 y 3.

Las soluciones de extracción 1 y 3, presentaron los mejores resultados de actividad lipasa a pH 8.0, mientras que el extracto preparado con la solución 2, mostró actividad máxima a pH 6.0, aunque a pH 8.0 su actividad no es despreciable.

Tabla II
Efecto del pH y tiempo de extracción sobre la actividad hidrolítica de extractos crudos de salvado de arroz

Experimento n.º	pH	Tiempo (horas)	Actividad Lipasa (mU) (*)		
			Solución 1	Solución 2	Solución 3
1	6,0	1	29	128	43
2	6,0	2	134	141	50
3	6,0	3	81	65	76
4	7,0	1	106	94	81
5	7,0	2	115	99	94
6	7,0	3	71	74	115
7	8,0	1	157	94	116
8	8,0	2	178	132	144
9	8,0	3	90	82	169

(*) Media representativa de tres repeticiones.

U = 1 µmol de nitrofenol liberado por minuto por mL de extracto durante la reacción.
mU = U/1000

1.- CaCl₂ 0.01M (Funatsu *et al.*, 1971);
2.- Sacarosa 0.6M, KCl 10 mM, MgCl₂ 1mM, ditiotreitol 2 mM (Lin y Huang, 1983) y
3.- Sacarosa 0.4M, ditiotreitol 2mM) (Hills y Mukherjee, 1990).

Efecto del tiempo

El efecto del tiempo de extracción sobre la actividad, también puede ser observado en la Tabla II. Las soluciones 1 y 2 presentaron mejores resultados en

un tiempo de extracción de 2 horas, siendo que la solución 3 muestra una curva creciente de actividad, hasta la tercera hora en todos los valores de pH probados. La actividad máxima con la solución 3 fue alcanzada a pH 8.0, con un tiempo de extracción de 3 horas, pero este resultado de actividad no es superior al obtenido con la solución 1 a pH 8.0 y 2 horas de extracción.

Los resultados presentados en la Tabla II son bastante diferentes, hecho ya esperado, por tratarse de soluciones de composición distinta, consecuentemente, es lógico que respondan de modo diferente a las condiciones del medio. La solución de extracción 1, fue la que presentó los mejores resultados de actividad lipasa, con máximo (178mU a pH 8.0 y tiempo de extracción de 2 horas, existiendo una diferencia significativa (5%) con respecto a la solución 3 con 3 horas de extracción, donde la actividad lipasa fue de 169mU. Funatsu *et al.*, (1971), encontró resultados semejantes para pH 6.0, con el mismo tiempo (2 horas).

3.3. Rendimiento de extracción y actividad lipasa

En la Tabla III están resumidos los resultados de rendimiento, actividad hidrolítica total y específica y contenido de proteína de los extractos obtenidos con la solución de CaCl₂ 0.01M. Se observa un aumento en la actividad específica, debido a los procesos de purificación, de 4.2 y 5.2 veces para los procesos con acetona y sulfato amónico respectivamente.

Los resultados de actividad específica de la lipasa para el extracto crudo y la fracción de sulfato amónico fueron similares a los publicados por Funatsu *et al.*, (1971) y Aizono *et al.*, (1976).

Tabla III
Contenido de proteína, actividad de lipasa total, específica y rendimiento del extracto bruto obtenido con una solución de CaCl₂ 0,01M y de sus fracciones semipurificadas

Extracto	Proteína Total (mg) (*)	Actividad Total (U) (*)	Actividad Específica (mU/mg)	Rendimiento (%)
Bruto	73920,0	896,0	12,1	100
Fracción Acetona	14667,6	743,9	50,7	83
Fracción Sulfato Amónico	11146,8	707,8	63,5	79

(*) Media representativa de tres repeticiones.

U = 1 µmol de nitrofenol liberado por minuto por mL de extracto la reacción.
mU = U/1000

De los resultados observados, se puede concluir que la manera más eficiente de producir un extracto semi-purificado de lipasas de salvado de arroz es utilizando una solución de CaCl₂ 0.01M para la obtención del extracto crudo, seguido de su purifica-

ción parcial con sulfato amónico. Cabe resaltar que la fracción acetona presenta actividad específica inferior que a la de sulfato amónico, pero la técnica para su obtención es más rápida y menos laboriosa, siendo una alternativa viable si otros factores, además de la actividad, son considerados en la obtención de extractos de lipasas para utilización como biocatalizadores en reacciones de hidrólisis y/o esterificación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aizono, Y., Funatsu, M., Hayashi, K., Inamasu, M. y Yamaguchi, M. (1971).—«Biochemical studies rice bran lipase-Part II».—Agric. Biol. Chem. **35**, 1973-1979.
- Aizono, Y., Funatsu, M., Sugano, M., Hayashi, K. y Fujiki, Y. (1973).—«Enzymatic properties of rice bran lipase».—Agric. Biol. Chem. **37**, 2031-2036.
- Aizono, Y., Funatsu, M., Fujiki, Y. y Watanabe, M. (1976).—«Purification and characterization of rice bran lipase II».—Agric. Biol. Chem. **40**, 317-324.
- AACC (1983).—Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 8th ed., St. Paul, MN.
- AOAC (1980).—Official and Recommended Practices of the Association Official Analytical Chemists., Champaign.
- AOAC (1984).—Official and Recommended Practices of the Association Official Analytical Chemists., Champaign.
- AOCS (1993).—Official and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. Champaign.
- Berry, D.R. y Paterson, A. (1990).—«Enzymes in the Food Industry» en «Enzyme Chemistry - Impact and Applications» 2nd Ed., pp. 340-342.—C.J. Suckling (Ed.) Chapman and Hall, London.
- Borgström, B. y Brockman, H.L. (1984).—«Lipases».—Eselvier, Amsterdam.
- Castro, H.F. y Anderson, W.A. (1995).—«Fine chemicals by biotransformation using lipases».—Química Nova **18**, 544-554.
- Fujiki, Y., Aizono, Y. y Funatsu, M. (1978).—«Chemical properties of major subunit of rice bran lipase».—Agric. Biol. Chem. **42**, 599-606.
- Funatsu, M., Aizono, Y., Hayashi, K., Watanabe, M. y Eto, M. (1971).—«Biochemical studies on rice bran lipase - Part I».—Agric. Biol. Chem. **35**, 734-742.
- Hills, M.J. y Mukherjee, K.D. (1990).—«Triacylglycerol lipase from rape (*Brassica napus* L.) suitable for biotechnological purposes».—Applied Biochemistry and Biotechnology **26**, 1-10.
- IUPAC-IUB (1979).—Commission on nomenclature, Enzyme nomenclature Academic Press, NY, pp. 6-19.
- Jachmanián, I., Grompone, M.A. y Mukherjee, K.D. (1995).—«Lipase from germinating rapeseed as biocatalyst in hydrolysis and esterification reactions» en «Proceedings of Latin American Congress and Exhibit on Fats & Oils Processing, 25-28/09/1995».—D. Barrera-Arellano, M.A.B.R.D'Arce y L.A.G Gonçalves (Eds.), Unicamp, Campinas.
- Kresze, G. B. (1988).—«Methods for Protein Determination» en «Methods of Enzymatic Analysis» 3rd ed. Vol. 2.—H. U. Bergmeyer (Ed.).—VCH Publishers, Weinheim.
- Lin, Y. H. y Huang, A. H. C. (1983).—«Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedling».—Arch. Biochem. Biophys. **225**, 360-369.
- Luh, B. S., Barber, S. y Barber, C. B. (1991).—«Rice Bran» vol. 2, 2nd pp. 313-362.—Van Nostrand Reinhold, New York.
- Macrae, A. R. y Hammond, R. C. (1987).—«Present and future application of lipase». Biotechnology Letters, **9**, 601-604.
- Matsuda, H. y Hirayama, O. (1979).—«Purification of galactolipase from rice bran by affinity chromatography on palmitolated gauze».—Agric. Biol. Chem. **43**, 463-469.
- Mukherjee, K. D., (1994).—«Plant lipases and their application in lipid biotransformations».—Prog. Lipid Res. **33**, 165-174.
- Ncube, I., Adlercreutz, P. y Read, J. (1993).—«Purification of rape seedling lipase and its use in organic media».—Biotechnol. Appl. Biochem, **17**, 327-336.
- Palmiano, E.P. y Juliano, B.O. (1973).—«Change in the activity of some hydrolases, peroxidases and catalases in the rice seed during germination».—Plant. Physiol. **52**, 274-277.
- Pastore, G.M. (1992).—«Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática».—Tese, UNICAMP, Campinas.
- Saunders, R.M. (1990).—«The properties of rice bran as a foodstuff».—Cereal Foods World **35**, 632-636.
- Shastry, B.S. y Raghavendra Rao, M. (1976).—«Chemical studies on rice bran lipase».—Cereal Chem. **53**, 190.
- Takano, K. (1993).—«Mechanism of lipid hydrolysis in rice bran».—Cereal Foods World **38**, 695-698.
- Tsuzuki, W., Kasumimoto, H., Kobayashi, S. y Suzuki, T. (1994).—«Esterase activity and free fatty acid accumulation in the bran of selected rice cultivars».—Cereal Chemistry. **71**, 162-165.

Recibido: Enero 1998
Aceptado: Septiembre 1998