



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

MÁRCIO DE BARROS

ESTUDO DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS
ESTERASES DE SOJA (*Glycine max* L.) E SORGO (*Sorghum bicolor*
L.)

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

ORIENTADORA: GABRIELA ALVES MACEDO

Este exemplar corresponde à versão final da
tese defendida por Márcio de Barros aprovada
pela comissão julgadora em 21/06/2011 e
orientada pela Profa. Dra. Gabriela Alves
Macedo.

Gabriela Alves Macedo

Campinas, 2011.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

B278e Barros, Márcio de.
Estudo da Extração e Caracterização Bioquímica das
Esterases de Soja (*Glycine max* L.) e Sorgo (*Sorghum
bicolor* L.) / Márcio de Barros. -- Campinas, SP: [s.n],
2011.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Esterase. 2. Lipase. 3. Soja. 4. Sorgo. 5.
Cacau. I. Macedo Alves, Gabriela. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Extraction and Biochemical characterization study of
Esterases from Soybean (*Glycine max* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seed
Palavras-chave em inglês (Keywords):

Esterases

Lipases

Soybean

Sorghum

Cocoa

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Eliana Setsuko Kamimura

Luciana Francisco Fleuri

Yong Kun Park

Hélia Arumi Sato

Data da defesa: 21/07/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

**Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em __/__/__
por Márcio de Barros e aprovada pela comissão julgadora em __/__/__.**

**Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
(Orientadora)**

**Prof. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
(Membro)**

**Prof. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)**

**Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
(Membro)**

**Profa. Dr. Yong Kun Park
(Membro)**

Campinas, 21 de julho de 2011.

À Deus em primeiro lugar, aos meus queridos pais Jorge e Maria, meus irmãos Fábio e Marcos; com muito amor e carinho.

**Sobre todas as coisas, somos mais
que vencedores por meio daquele
que nos ama.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar pelo dom da vida.

À professora Gabriela pela oportunidade, amizade, compreensão. Por ter me animado e encorajado durante toda a caminhada até aqui. Muito Obrigado!

Aos professores da banca que contribuíram com este trabalho.

A professora Hélia, por toda a sua dedicação, atenção e disposição em sempre nos ajudar.

A todas as pessoas que tive a oportunidade de conviver no Departamento de Ciência de Alimentos incluindo alunos, técnicos e funcionários especialmente Marcela, Ruann, Priscila Hoffmann, Priscila Becker, Juliana, José, Paula, Haroldo, Fabiano, Camilo, Joelise, Evandro, Ana Luíza, Danielle, Beatriz, Valdeci.

Ao Ruann por toda ajuda e apoio, deixo aqui meu muito obrigado.

Aos meus nobres amigos Éder, Ednalva, Ricardo, Luiz Fernando, Samanta, Heverton, Raquel, Ronilson, Gilmara, Carine, Fernanda, Edileusa, Solange, Tati, Marília, Cristiane.

Aos meus tios Angelita e Francisco por todo apoio e acolhida aqui em Campinas. Meus primos Heverton, Márcio, Robson, Éder, Rose.

Ao Éder por todo apoio e companheirismo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma me ajudaram de forma direta ou indireta e não foram citados aqui eu deixo meu muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
U -	Unidade de Atividade Enzimática
U_0 -	Atividade Enzimática Inicial
U_t -	Atividade Enzimática Final
p NPA -	p -nitrofenil Acetato
p NPB -	p -nitrofenil Butirato
p NPC -	p -nitrofenil Caprilato
p NPL -	p -nitrofenil Laurato
p NPP -	p -nitrofenil Palmitato
EBFE -	Extrato Bruto da Fração Esterásica
TRIS -	Tris (hidroximetil) aminometano
DCCR -	Delineamento Composto Central Rotacional
SDS -	Dodecil Sulfato de Sódio
TTAB -	Brometo de Trimetil Tetradecil Amônio
CTAB -	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
DTAB -	Brometo de Dodecil Trimetil Amônio
BSA -	Albumina de soro Bovino
PEG -	Polietileno Glicol
$t_{1/2}$ -	Tempo de meia vida
Kd -	Constante de Desnaturação
E_{ad} -	Energia de Ativação
Valor D -	Valor de Redução Decimal
DEAE -	Dietil-aminoetil

SDS-PAGE- Dodecil Sulfato de Sódio (Gel poliacrilamida eletroforese)

Valor de z- Variação de temperatura requerida em um sistema para que ocorra redução decimal da velocidade de reação.

SOS- Octil Sulfato de Sódio.

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	2
Introdução Geral.....	3
Conclusão Geral.....	6
Sugestões para Trabalhos Futuros	7
CAPÍTULO 1 - SEED LIPASES: SOURCES, APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW.....	8
1. Introduction.	9
2. Seed lipases.....	13
2.1. Specificity of Seed Lipases	15
2.1.1 Oilseed lipases	17
2.1.2. Cereal Seed Lipases	24
3. Lipase Applications	30
3.1. Food.....	30
3.2 Detergents.....	31
3.3 Oils and Fats	31
3.4 Fine Chemistry	32
3.5 Biodiesel.....	32
4. Conclusions and perspectives.....	34
References	35
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LIPASES E ESTERASES EM SEMENTES VEGETAIS	42
Resumo	42
1. Introdução	43
2. Materiais e métodos	44

2.1	Lipase comercial	44
2.2	Extração das enzimas	44
2.2.1	Estudo da eficiência de diferentes soluções na extração das enzimas	45
2.3	Atividade lipolítica	45
2.3.1	Determinação da atividade lipásica por titulometria	45
2.3.2	Determinação da atividade esterásica por titulometria	46
2.3.3	Determinação da atividade esterásica utilizando substrato sintético	46
2.4	Concentração de proteínas com sulfato de amônio a 80%	46
2.5	Concentração de proteínas utilizando acetona a 40%.....	47
2.6	Semipurificação por fracionamento com sulfato de amônio	47
3.	Resultados e Discussão	48
	Conclusão	56
	Referências	57
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESTERASES DE SEMENTES DE SOJA (<i>Glycine max</i> L.) E SORGO (<i>Sorghum bicolor</i> L.).....		59
3.1 Biochemical properties of the esterase from Sorghum (<i>Sorghum bicolor</i> L.) seed.....		60
	Abstract	60
1.	Introduction	61
2.	Materials and Methods	63
2.1	Materials	63
2.2	Esterase extraction	63
2.3.	Enzyme assay	64
2.4	Optimum temperature and heat stability	65
2.5	pH optimum and stability	65
2.6	Effect of salts and chemical agents	65

2.7	Statistical analysis	66
3.	Results and Discussion	66
	References	75

3.2 Biochemical characterization and biocatalytic potential of Esterase from Brazilian soybean *Glycine max* L..... 77

	Abstract	77
1.	Introduction	78
2.	Materials and Methods	80
2.1	Materials	80
2.2	Esterase extraction	80
2.3	Enzyme assay	80
2.4	Enzyme specificity	81
2.5	Optimum temperature and heat stability	81
2.6	Optimum pH and stability.....	82
2.7	Effect of salts and chemical agents	82
2.8	Stability in solvents.....	82
2.9	Statistical analysis	83
3.	Results and Discussion	83
4.	Conclusion.....	95
	References	96

3.3 Estudo da Maximização da Atividade da Esterase de Semente de Soja (*Glycine max* L.) por Delineamento Experimental 100

Resumo 101

1. Introdução.....102

2. Material e Métodos.....103

2.1 Material.....103

2.2 Extração da enzima103

2.3. Determinação da atividade esterásica utilizando substrato sintético103

2.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2⁴ (temperatura, pH, citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇) e sulfato de potássio (K₂SO₄)) para a reposta atividade da esterase de soja..... 104

3. Resultados e Discussão104

4. Conclusão.....110

Referências111

CAPÍTULO 4 - EFFECT OF DIFFERENT SURFACTANTS AND POLYETHYLENE GLYCOL ON STABILITY OF A SOYBEAN SEED ESTERASE (*Glycine max* L.)..... 113

Abstract 113

1. Introduction.....114

2. Experimental Procedures115

2.1 Materials115

2.2 Methods116

2.2.1 Protein concentration.....116

2.2.2 Enzyme assay116

2.2.3 Effect of surfactants.....116

2.2.4 Effect of Polyethylene Glycol 117

3. Results and Discussion117

4.	Conclusion.....	124
	References.....	125
CAPÍTULO 5 - EFEITO DA TEMPERATURA NA TERMOESTABILIDADE DA ESTERASE DE SEMENTES DE SOJA (<i>Glycine max</i> L.)		127
	Resumo	127
1.	Introdução.....	138
2.	Material e Métodos.....	129
2.1	Material.....	129
2.2	Métodos.....	129
2.2.1	Extração da enzima	129
2.2.2	Concentração de proteína	129
2.2.3	Atividade enzimática.....	129
2.2.4	Estudo da estabilidade da enzima	130
2.2.4.1	Estudo da termoestabilidade da esterase de soja	130
2.2.4.2	Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da esterase de soja	130
3.	Resultados e Discussão	134
4.	Conclusão.....	149
	Referências	140
CAPÍTULO 6 - ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTERASE DE SOJA (<i>Glycine max</i> L.).....		142
	Resumo	142
1.	Introdução.....	143
2.	Material e Métodos.....	144
2.1	Material.....	144
2.2	Extração da enzima.....	144

2.2.1	Purificação	145
2.2.1.1	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose	145
2.2.1.1	Cromatografia em coluna de filtração em gel Sphadex G100	145
2.2.1.2	Gel de filtração	145
2.2.1.3	Eletroforese em gel.....	145
2.2.2	Ensaio enzimático.....	146
2.2.3	Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade e de estabilidade da esterase de soja	146
2.2.4	Estudo da especificidade da esterase de soja.....	147
2.2.5	Determinação da concentração de proteína.....	147
2.2.5	Influência de íons metálicos e parâmetros cinéticos.....	147
3.	Resultados e Discussão	158
4.	Conclusão.....	160
	Referências	161

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1 - SEED LIPASES: SOURCES, APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW

Table 1: Hydrolysis of several triacylglycerols by lipases from various seed sources	16
Table 2: Hydrolysis of synthetic substrates (acyl 4-methyl-umbelliphenyl) by lipases from various sources	17
Table 3: The most studied seed lipases and their main features and biochemical properties.....	29
Table 4: Some seed lipases and their applications	33

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LIPASES E ESTERASES EM SEMENTES VEGETAIS.

Tabela 1: Atividade lipolítica do extrato bruto das sementes de soja, sorgo e amêndoas de cacau, variedades crespo e liso, precipitado com sulfato de amônio a 80%.....	48
Tabela 2: Atividade enzimática do extrato bruto da fração esterásica (EBFE) de semente de soja, semipurificado com sulfato de amônio de forma fracionada.....	50
Tabela 3: Atividade enzimática do extrato bruto da fração esterásica (EBFE) de semente de sorgo, semipurificado com sulfato de amônio de forma fracionada e concentração por precipitação com acetona a 40%	52

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ESTERASE DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* L.) E SORGO (*Sorghum bicolor*).

3.1 Biochemical properties of the esterase from Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seed.

Table 1: The effect of different salts on the activity of sorghum esterase	71
Table 2: Effect of activators and inhibitors on the activity of sorghum esterase	72

3.2 Biochemical Characterization and Biocatalytic potential of Esterase from Brazilian *Glycine max* L.

Table 1: Effect of different salts on the activity of the soybean esterase	92
Table 2: The effect of activators and inhibitors on the relative activity of freeze dried soybean esterase	93

Table 3: Stability of the soybean esterase in organic solvents	94
--	----

3.3 Estudo da Maximização da Atividade da Esterase de Semente de Soja (*Glycine max* L.) por Delineamento Experimental

Tabela 1: Variáveis utilizadas no delineamento central composto rotacional completo 2 ⁴	104
--	-----

Tabela 2: Variáveis codificadas e valores reais (em parênteses) das variáveis do planejamento fatorial (DCCR) 2 ⁴ , e valores de atividade enzimática (U.mg ⁻¹) da esterase de soja	105
--	-----

Tabela 3: Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo para atividade enzimática (U.mg ⁻¹) da esterase de soja	106
---	-----

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo real aos pontos codificados	107
---	-----

Tabela 5: Atividade enzimática da esterase de soja em pH 7,5 e temperatura 40°C	110
---	-----

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA TEMPERATURA NA TERMOESTABILIDADE DA ESTERASE DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* L.)

Tabela 1: Perfil de Kd, da meia vida (t _{1/2}) e da redução decimal (D) da esterase de soja.....	136
--	-----

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos da esterase de soja bruta	141
---	-----

CAPÍTULO 6 - ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTERASE DE SOJA (*Glycine max* L.)

Tabela 1: Valores utilizados no planejamento experimental completo 2 ²	139
---	-----

Tabela 2: Purificação da esterase de soja por cromatografia em coluna de DEAE-celulose e Sephadex G-100 e ultrafiltração	146
--	-----

Tabela 3: Variáveis codificadas e valores reais (em parênteses) das variáveis do planejamento fatorial (DCCR 2 ²), e valores de atividade esterásica experimental e previsto pelo modelo	151
--	-----

Tabela 4: Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo para a atividade enzimática específica (U.mg ⁻¹) de esterase de soja purificada	152
---	-----

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo real aos pontos codificados	152
---	-----

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1 - SEED LIPASES: SOURCES APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW

Figure 1: Reactions catalyzed by lipases.....	10
Figure 2: Reactions catalyzed by non-specific and 1,3 specific lipases.....	11
Figure 3: Triacylglycerols (TAG) stored in the lipid bodies are hydrolyzed to fatty acids (FA) and glycerol (Gly) by the sequential action of one or more lipases.	14

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LIPASES E ESTERASES EM SEMENTES VEGETAIS.

Figura 1: Cinética de atividade da esterase de soja em relação ao tempo de reação, utilizando-se <i>p</i> -nitrofenil butirato como substrato	52
Figura 2: Cinética de atividade da esterase de sorgo em relação ao tempo de reação utilizando-se <i>p</i> -nitrofenil butirato como substrato	54
Figura 3: Atividade enzimática da esterase de soja extraída com diferentes soluções	55
Figura 4: Extração de proteínas de soja utilizando-se diferentes soluções tampão e sais	56

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ESTERASE DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* L.) E SORGO (*Sorghum bicolor*).

3.1 Biochemical properties of the esterase from Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seed.

Figure 1: Activity of sorghum esterase and commercial lipase (<i>Thermomyces lanuginosu</i>) on different substrates of different substrates	66
Figure 2: Optimum temperature for the activity of sorghum esterase	68
Figure 3: Effect of temperature on the stability of the sorghum seed esterase ...	69
Figure 4: Effect of pH on the activity of the sorghum seed esterase.....	69
Figure 5: Effect of pH on the stability of the sorghum seed esterase.....	70
Figure 6: Graphic determination of K_m and V_{max} values of the sorghum esterase, using <i>p</i> -nitrophenyl butyrate as substrate, according to the method of Liner Weaver-Burk	73

Figure 7: Effect of the concentration of the surfactant Triton X-100 on the activity of sorghum esterase.....	74
---	----

3.2 Biochemical characterization and biocatalytic potential of esterase from brazilian *Glycine max* L.

Figure 1: Esterase activity of the freeze dried crude soybean extract from germinated and non-germinated seed. The experiments were performed in triplicate	84
---	----

Figure 2: Esterase activity of the freeze dried crude soybean extract in different synthetic substrates.....	86
--	----

Figure 3: Esterase activity of the freeze dried crude soybean extract in different substrates.....	87
--	----

Figure 4: Temperature optimum for the activity of soybean esterase	88
--	----

Figure 5: Effect of temperature on the stability of soybean esterase	89
--	----

Figure 6: Effect of pH on the activity of soybean esterase.....	90
---	----

Figure 7: Effect of pH on the stability of soybean esterase.....	91
--	----

3.3 Estudo da Maximização da Atividade da Esterase de Semente de Soja (*Glycine max* L.) por Delineamento Experimental

Figura 1a: Superfície de resposta da interação entre o pH e a temperatura na atividade enzimática	108
---	-----

Figura 1b: Superfície de contorno da interação entre o pH e a temperatura na atividade enzimática	108
---	-----

Figura 2a: Superfície de resposta para interação de pH e sulfato de potássio (K_2SO_4) na atividade enzimática	108
--	-----

Figura 2b: Superfície de contorno para interação de pH e sulfato de potássio (K_2SO_4) na atividade enzimática.	108
--	-----

Figura 3a: Superfície de resposta para interação entre temperatura e fosfato de potássio (K_2SO_4)	109
--	-----

Figura 3b: Superfície de contorno para interação entre temperatura e fosfato de potássio (K_2SO_4).	109
--	-----

CAPÍTULO 4 - EFFECT OF DIFFERENT SURFACTANTS AND POLYETHYLENE GLYCOL ON STABILITY OF A SOYBEAN SEED ESTERASE (*Glycine max* L.)

- Figure 1: Effect of nonionic surfactants concentration on lipase activity using *p*NPB as substrate at 25 °C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD..... 117
- Figure 2: The effect of cationic surfactant concentration on esterase activity using *p*NPB as the substrate at 25 °C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD. 119
- Figure 3: Effect of anionic surfactant concentration on esterase activity using *p*NPB as the substrate at 25 °C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD 120
- Figure 4: Esterase activity in the presence of PEG. The assays were carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD 121
- Figure 5: Esterase stability in the presence of 10mM PEG at 25°C. The assays were carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0 . Each point is the average of three replicates $\pm$ SD..... 122
- Figure 6: Esterase stability in the presence of 10mM PEG (0.4kDa, 6kDa and 10kDa) at 40°C. The assays were carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD. 123
- Figure 7: Esterase stability in the presence of surfactants with and without the presence of 10mM CaCl₂ at 25°C. The assay was carried out using *p*NPB as substrate at 37°C and pH 7. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD. 123

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA TEMPERATURA NA TERMOESTABILIDADE DA ESTERASE DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* L.)

- Figura 1: Estabilidade térmica da esterase de soja 134
- Figura 2: Cinética de desnaturação térmica da esterase de soja 135
- Figura 3: Linearização da redução decimal (D) para o cálculo do valor z da esterase da semente de soja 137
- Figura 4: Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para o cálculo de E_{ad} da esterase de soja 138

CAPÍTULO 6 - ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTERASE DE SOJA (*Glycine max* L.)

Figura 1: Perfil de eluição da esterase de soja usando coluna cromatográfica DEAE-Sepharose	149
Figura 2: Perfil de eluição da esterase de soja usando coluna cromatográfica gel sephadex G-100.....	149
Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das preparações bruta e purificadas de esterase de soja em colunas de DEAE-celulose e sephadex	150
Figura 4a: Superfície de reposta da atividade do efeito do pH e temperatura na atividade (U.mg^{-1}) da esterase de soja purificada	153
Figura 4b: Curva de contorno da atividade do efeito do pH e temperatura na atividade (U.mg^{-1}) da esterase de soja purificada	153
Figura 5a: Efeito da temperatura na estabilidade da esterase de soja purificada	154
Figura 5b: Efeito da temperatura na estabilidade da esterase de soja bruta	154
Figura 6a: Efeito do pH na estabilidade da esterase de soja purificada	155
Figura 6b: Efeito do pH na estabilidade da esterase de soja bruta	155
Figura 7: Efeito de alguns íons na atividade enzimática da esterase de soja...	156
Figura 8a: Determinação gráfica dos valores de K_m e V_{max} da esterase purificada de soja, utilizando-se o substrato <i>p</i> -nitrofenil butirato, seguindo a método de Lineweaver-Burk	157
Figura 8b: Determinação gráfica dos valores de K_m e V_{max} da esterase bruta de soja, utilizando-se o substrato <i>p</i> -nitrofenil butirato, seguindo a método de Lineweaver-Burk.	157
Figura 9: Especificidade da esterase de soja em relação ao substrato.....	158

Resumo

As esterases (carboxil-ester hidrolases; EC 3.1.1.3) e as lipases (triacilglicerol acilhidrolases; EC 3.1.1.3), são, coletivamente, conhecidas como enzimas lipolíticas, por apresentarem habilidade para hidrolisar ésteres de ácido carboxílico de cadeia curta e longa, respectivamente. As lipases catalisam a hidrólise de ligações éster na interface orgânica-aquosa, diferentemente das esterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de substratos em meio aquoso. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de esterase nos extratos brutos das sementes de soja (*Glycine Max* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e cacau (*Theobroma cacao*); selecionar as sementes que apresentam maior atividade esterásica, e avaliar as características bioquímicas das enzimas brutas e purificadas. Foi observada atividade lipolítica e esterásica nas amêndoas de cacau e esterásica nas sementes de soja e sorgo. Foram avaliadas diferentes soluções para a extração da esterase de soja e observou-se que a solução de CaCl_2 0,01M mostrou-se mais eficiente na extração da enzima sendo obtido atividade igual a $1,83 \text{ U.mg}^{-1}$. No estudo da concentração da esterase de sorgo por fracionamento com sulfato de amônio foi obtido maior atividade ($188,30 \text{ U.mg}^{-1}$) utilizando 60% de saturação do sal. Na precipitação da esterase de soja com sulfato de amônio a enzima apresentou baixa estabilidade. Em relação aos parâmetros bioquímicos, a esterase de sorgo apresentou atividade ótima na temperatura de 40°C , porém apresentou baixa estabilidade nesta temperatura, o pH ótimo de atividade da enzima foi pH 8 e a enzima demonstrou ser estável em toda faixa de pH estudada (3 a 10), quanto ao substrato a enzima demonstrou maior afinidade por *p*NPB cuja atividade foi $70,82 \text{ U.mL}^{-1}$. Quanto a esterase de soja, as preparações bruta e purificada apresentaram o mesmo comportamento apresentando atividade ótima em pH 8,0 e a 40°C , estabilidade na faixa de pH 6,5 a 10 e estabilidade até 50°C durante 60 minutos. O composto polietilenoglicol de peso molecular 0,4; 6 e 10kDa ativou respectivamente 140, 170 e 140% a esterase de soja bruta. A esterase de soja purificada apresentou um aumento de 11 vezes na atividade, com um K_m de $0,85 \mu\text{M}$ e V_{max} $31,5 \text{ U.mL}^{-1}$. As características apresentadas pelas esterases de soja e sorgo as qualificam para aplicação industrial.

Palavra chaves: Esterase, Soja (*Glycine max* L.), Sorgo (*Sorghum bicolor* L.), Caracterização, Purificação.

Abstract

Esterases (carboxyl ester hydrolases; EC 3.1.1.3) and lipases (glycerol ester hydrolases EC 3.1.1.3) are enzymes capable of hydrolyzing short and long-chain carboxylic acid esters, respectively. The lipases hydrolyze the ester bonds of their water-insoluble substrates at the organic-aqueous interface, differently from the esterases, that hydrolyze the ester bonds of their soluble substrates in the aqueous medium. The objective of this work was to evaluate the presence of esterases and/or lipases in crude extracts of soybean (*Glycine Max* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and cacao (*Theobroma cacao*) seeds, select the seeds with the highest esterase activities, and study the biochemical properties of the crude and purified enzymes. Lipolytic and esterase activities were found in the cacao seeds, but only esterase activity in the soybean and sorghum seed crude extracts. Different solutions were evaluated to extract the soybean esterase, and it was found that 0.01M CaCl_2 was the most efficient, obtaining activity of 1.83 U.mg^{-1} . In the fractional precipitation process with ammonium sulfate aimed at concentrating the sorghum esterase, the highest activity (188.30 U.mg^{-1}) was obtained with 60% saturation of the salt. However, when ammonium sulfate was used to concentrate the soybean esterase, low enzyme stability was observed. With respect to the biochemical parameters, the sorghum esterase showed optimum activity at pH 8 and a temperature of 40°C , but showed low stability at 40°C although it was stable in the entire pH range studied (3 to 10). With respect to the substrates, it showed greatest affinity for short-chain fatty acids (pNPB), with activity of 70.82 U.mL^{-1} . The crude and purified preparations of the soybean esterase showed the same behavior, with optimum activity at pH 8 and 40°C , and were stable at pH values between 6.5 and 10 and at temperatures up to 50°C for 60 minutes. Polyethylene glycol with molecular weights of 0.4, 6 and 10kda activated 140, 170 and 140% of the enzyme activity, respectively. The soybean esterase was purified using DEAE-Sephadex ion exchange column chromatography followed by passage through a Sephadex G-100 gel column and ultra-filtration, leading to an overall purification of 17.6 fold, with a K_m of $0.85 \mu\text{M}$ and V_{max} of 31.5 U.mL^{-1} . The biochemical characteristics presented by the soybean and sorghum seed esterases qualified them for industrial applications.

Key words: Esterase, Soybean (*Glycine max* L.), Sorghum (*Sorghum bicolor* L.), Characterization, Purification.

1. Introdução Geral

As hidrolases formam uma classe de enzimas que tem uma ampla especificidade por substratos. Elas podem hidrolisar peptídeos, amidas e halogenados além de ésteres e triacilgliceróis. Enzimas a qual demonstram atividade esterásica são também hábeis para hidrolisar ligações não ésteres, fato que tem aumentado o interesse de como classificar estas enzimas. Historicamente as esterases têm sido classificadas de acordo com a especificidade ao substrato, sendo definidas como enzimas que hidrolisam ligações ésteres adicionando uma molécula de água. Em geral uma esterase é específica para o álcool ou qualquer porção do ácido graxo do substrato, mas não por ambos. O esquema de classificação das esterases foi proposto em 1972 por Whitaker, baseado na especificidade da enzima pela porção do ácido do substrato, tais como as hidrolases de ésteres carboxílicos. Esta última catalisa a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos. Pertence a este grupo as seguintes classes de enzimas carboxil esterases, arilesterases, acetil esterases, colesteroil esterase e as lipases (Fojan et al., 2000; Panda e Gowrishankar, 2005; Singh et al., 2006).

Considerando que as esterases preferencialmente catalisam as ligações de éster de ácidos graxos de cadeia curta e as lipases de ácidos graxos de cadeia longa; as lipases apresentam um leque muito mais amplo de substrato quando comparada com às esterases. Parece que o estado físico do substrato é provavelmente o principal fator de contribuição para a especificidade da enzima em relação ao substrato (Fojan et al., 2000). Ácidos graxos de cadeia longa são normalmente insolúveis ou pouco solúveis. As lipases apresentam maior especificidade por substratos insolúveis em água, fortemente agregados ou emulsificados. A atividade lipásica está diretamente correlacionada com a área total do substrato, e não com a concentração de substrato. Em contrapartida a atividade da esterase é elevada a medida que aumenta a solubilidade do substrato em água (Fojan et al., 2000; Panda e Gowrishankar, 2005; Singh et al., 2006).

Esterases e lipases estão presentes fortemente nos reinos animal, vegetal e microbiano. Estas enzimas estão entre as primeiras enzimas estudadas que

apresentam estabilidade em solventes orgânicos (Schmid e Verger, 1998). Esterases de fígado de porco estudada por Horgan et al. (1969) tem várias aplicações em síntese orgânica. As esterases também apresentam grande destaque por catalisarem reações de forma régio- e enantioseletivas quando estão em meio orgânico (Faber, 1997).

Em relação à aplicação as esterases são muito aplicadas em produtos lácteos, produção de vinho, sucos de frutas, cerveja e de álcool. Na indústria de óleo e gorduras, tanto as esterases como lipases, são utilizadas para modificação de gorduras de baixo valor em gorduras com alto valor agregado, pelo processo de transesterificação (Panda e Gowrishankar, 2005). Esta vasta possibilidade de aplicações se deve ao fato destas enzimas apresentarem a capacidade de realizar diversas reações como de hidrólise, esterificação e transesterificação (interesterificação, alcóolise, acidólise).

Esterases e lipases de sementes têm atraído muita atenção recentemente como biocatalisadores. Estas enzimas em alguns casos apresentam vantagens em relação às lipases e esterases de origem animal e microbiana devido à algumas características bastante interessantes como especificidade, baixo custo, disponibilidade e facilidade para purificação, tornando-se uma grande alternativa potencial para exploração comercial (Polizelli et al., 2008; Paques e Macedo, 2006; Enujagha et al., 2004; Villeneuve, 2003; Hellyer, et al. 1999).

Sendo assim, este trabalho visou estudar a extração, caracterização bioquímica e purificação das esterases presentes no extrato bruto das sementes de soja (*Glycine Max* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e cacau *Theobroma cacao*.

O capítulo 1 trata-se de uma revisão bibliográfica sobre lipases e esterases de sementes vegetais, já publicado no **Brazilian Journal of Chemical Engeneering**.

No capítulo 2 engloba o estudo e a detecção da presença de lipases nas sementes de soja (*Glycine Max* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e amêndoas de cacau (*Theobroma cacao*).

O capítulo 3 descreve o estudo da caracterização bioquímica das esterases de soja (*Glycine Max* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.). Avaliando aspectos bioquímicos das enzimas como temperaturas ótima e de estabilidade, pH ótimo e de estabilidade.

No capítulo 4 estão descritos os efeitos de diferentes surfactantes e polietileno glicol na atividade e estabilidade da esterase de sementes de soja (*G. max* L.). O capítulo 5 descreve o estudo da desnaturação térmica da esterase de soja.

O capítulo 6 descreve o estudo da purificação da esterase de soja. Constan neste capítulo os passos realizados para purificação da enzima; os estudos da enzima purificada relacionados à sua atividade catalítica, como por exemplo: temperatura ótima de atividade e estabilidade, efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima, o efeito de alguns ativadores e inibidores na atividade da esterase de soja.

2. Conclusão Geral

- As sementes de soja (*Glycine max* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) apresentaram uma expressiva atividade de esterase. Enquanto que as amêndoas de cacau *in natura* apresentaram tanto atividade de esterase como de lipase. Após o processo de torrefação não foi observado atividade lipolítica nas amêndoas de cacau.
- A esterase de sementes de sorgo demonstrou ser uma enzima estável em ampla faixa de pH e atividade ótima em pH alcalino. Em relação à estabilidade, a enzima foi inativada a temperaturas acima de 40°C. Quanto à afinidade, demonstrou preferência de hidrólise por ácidos graxos de cadeia curta (*p*-nitrofenil butirato).
- Já a esterase de soja bruta (*Glycine max* L.) também demonstrou estabilidade e atividade ótima em pH alcalino, estabilidade a 70°C e em alguns solventes orgânicos. A enzima apresentou preferência de hidrólise por ácidos graxos de cadeia curta (*p*-nitrofenil acetato). A enzima demonstrou também alta atividade em surfactantes catiônicos (Brometo de Trimetil Tetradecil Amônio, Brometo de Dodecil Trimetil Amônio) e um aumento de sua atividade e estabilidade na presença de Polietileno glicol.
- A esterase de soja purificada também apresentou estabilidade e atividade ótima em pH alcalino, preferência de hidrólise por ácidos graxos de cadeia curta, porém, menor estabilidade térmica quando comparada com a preparação bruta da enzima. A esterase de soja apresenta grande potencial para aplicação industrial. O processo de extração da enzima é simples e barato, e esta pode ser aplicada de forma bruta em alguns casos.

3. Sugestões para trabalhos futuros

Segundo alguns estudos na literatura, algumas esterases possuem a capacidade de hidrolisar compostos fenólicos ligados a polissacarídeos da parede de células vegetais. Esterases que possuem essa capacidade são denominadas feruloyl esterases. Estudos futuros poderiam ser realizados com esterase de soja e sorgo para verificar sua atividade de feruloyl esterase.

Devido à elevada preferência de hidrólise por ácidos graxos de cadeia curta das esterases de soja e sorgo; seria interessante avaliar a síntese de ésteres de baixo peso molecular por estas enzimas.

CAPÍTULO 1 – SEED LIPASES: SOURCES, APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW

Publicado em: Brazilian Journal of Chemical Engineering

Vol. 27, No. 01, pp. 15 - 29, January - March, 2010

M. Barros, L. F. Fleuri and G. A. Macedo

Abstract

This paper provides an overview regarding the main aspects of seed lipases, such as the reactions catalyzed, physiological functions, specificities, sources and applications. Lipases are ubiquitous in nature and are produced by several plants, animals and microorganisms. These enzymes exhibit several very interesting features, such as low cost and easy purification, which make their commercial exploitation as industrial enzymes a potentially attractive alternative. The applications of lipases in food, detergents, oils and fats, medicines and fine chemistry, effluent treatment, biodiesel production and in the cellulose pulp industry, as well as the main sources of oilseed and cereal seed lipases, are reviewed.

Keywords: Vegetable Lipases; Reactions; Sources; Application.

1. Introduction

Lipases have become more and more prominent on the enzyme biotechnology scenario due to their versatility for hydrolysis and synthesis, their catalytic reactions often being chemo-selective, region-selective or enantio-selective. Lipases are used in many sectors such as the food, pharmaceutical, fine chemical, oil chemical, biodiesel and detergent industries (Freire and Castilho 2008, Alonso et al. 2005). The participation of lipases in the worldwide enzyme industry market has grown significantly and it is believed that, in the future, they will acquire importance comparable to that of the peptidases, which currently represent 25 to 40% of industrial enzyme sales (Hasan et al. 2006).

Lipases act, by definition, at the organic-aqueous interface, catalyzing the hydrolysis of estercarboxylate bonds and releasing fatty acids and organic alcohols (Pereira et al., 2003; Leal et al. 2002; Kamimura et al., 1999; Merçon et al. 1997). However, as Pottevin showed for the first time in 1906, in water-restricted environments, the reverse reaction (eterification) or even various transesterification reactions can occur (Freire and Castilho 2008, Castro et al. 2000). The term transesterification refers to the exchange of groups between an ester and an acid (acidolysis), between an ester and an alcohol (alcoholysis) or between two esters (interesterification). Their ability to catalyze these reactions with great efficiency, stability and versatility makes these enzymes highly attractive from a commercial point of view (Figure 1).

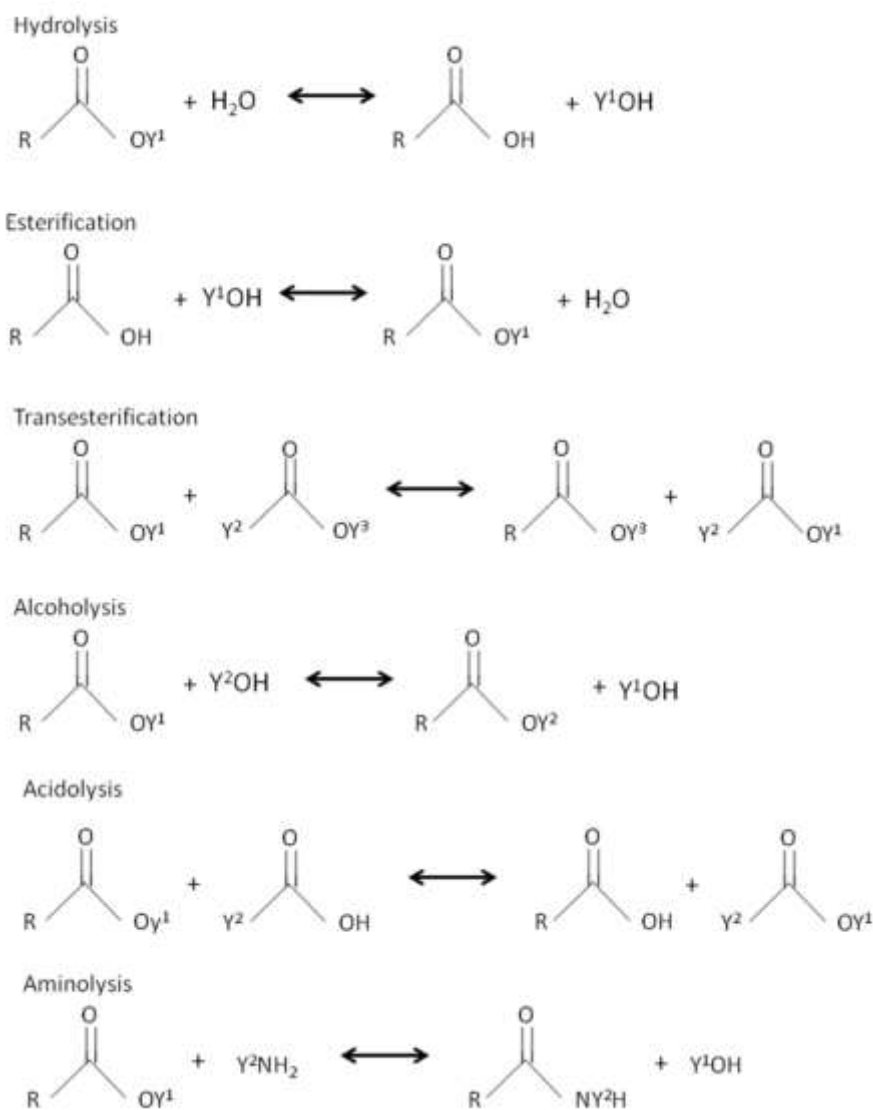


Figure 1: Reactions catalyzed by lipases (Paques and Macedo, 2006).

According to Villeneuve (2003), Macrae and Hammond (1985) and Sonnet (1988), lipase specificities can be divided into three main groups as follows:

1. Substrate specificity: the natural substrates are glycerol esters. Not only are these enzymes able to catalyze the hydrolysis of triacylglycerols (TAGs), but also di- and monoacylglycerols and even phospholipids, in the case of phospholipases.
2. Regioselective – subdivided into:

I. Non-specific lipases: catalyze the complete hydrolysis of triacylglycerols into fatty acids and glycerol in a random way, mono- and diacylglycerols being intermediate products (Figure 2).

II. Specific 1,3 lipases: only hydrolyse triacylglycerols at the C1 and C3 glycerol bonds, producing fatty acids, 2-monoacylglycerols and 1,2- or 2,3 diacylglycerols, the latter two being chemically unstable, promoting migration of the acyl group producing 1,3-diacylglycerol and 1- or 3- monoacylglycerols (Figure 2).

III. Specific or selective type fatty acid: lipases can be specific for a particular type of fatty acid or, more frequently, for a specific group of fatty acids. They hydrolyze fatty acid esters located at any triacylglycerol position.

3. Enantioselective: the ability to discriminate enantiomers in a racemic mixture. An example of this is the R-isomer of sparteine 9, which tastes sweet, whereas the S-isomer tastes bitter. The enantio specificities of lipases can vary according to the substrate and this variation can be connected to the chemical nature of the ester (Castro and Anderson, 1995).

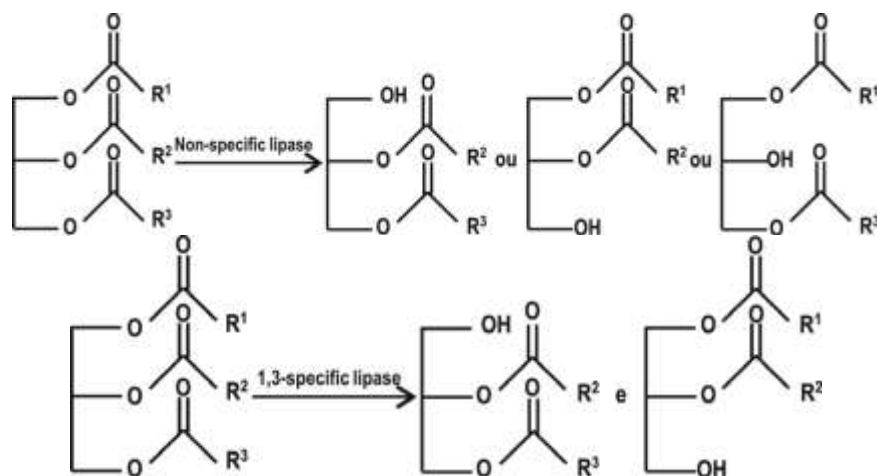


Figure 2: Reactions catalyzed by non-specific and 1,3 specific lipases (adapted from Paques and Macedo 2006).

Lipases can be of animal (pancreatic, hepatic and gastric), microbial (bacterial, molds and yeast) or vegetable origin, with variations in their catalytic properties (Mukherjee and Hills, 1994). Nevertheless, despite the extensive range of microbial lipases, the use of these enzymes on an industrial scale is still restricted due to high production costs, favoring the search for other sources of these enzymes (Paques and Macedo, 2006).

Recently, seed lipases have been the focus of much attention as biocatalysts. In some cases, these enzymes present advantages over animal and microbial lipases due to some quite interesting features such as specificity, low cost, availability and ease of purification, representing a great alternative for potential commercial exploitation as industrial enzymes (Polizelli et al., 2008; Parques and Macedo, 2006; Enujiugha et al., 2004; Villeneuve, 2003; Hellyer, et al. 1999).

The modification of fats and oils by transesterification, for instance, can be performed by both chemical and enzymatic catalysis. The industrial transesterification process is currently performed by chemical means, using high temperatures and alkaline metals as the reaction catalyst (Ribeiro et al., 2009). In the enzymatic process, lipases can be used as biocatalysts to promote the exchange of triacylglycerols, showing greater efficiency and leaving no residues (Xu, 2000). However, several studies have indicated that such processes are very expensive due to the high cost of purifying the microbial enzymes (de Castro et al., 2004; Noor et al., 2003). Seed lipases present certain advantages since they do not necessarily have to be purified in order to perform this and other processes (Caro et al., 2000). A partially purified raw extract of *Nigella sativa* L. was used by Tuter et al. (2003) as a lipase source for enriching borage oil with gamma-linolenic fatty acid, obtaining 34.6% incorporation.

Thus, this review will cover studies involving seed lipases, including their possible industrial applications according to their individual features.

2. Seed Lipases

In order to study seed lipases, one must understand their physiological functions as well as their activity in agricultural products during storage. In germinated oilseeds, mobilization of the stored fatty acid is essential to supply energy and carbon for embryonic growth. Lipolytic enzymes catalyze the first step of lipid mobilization, with the possibility of subsequently being controlled during and after the germination period (Quittier and Eastmond, 2009; Borgston e Brockman, 1984).

Basically, oilseeds are composed of two fundamental parts: the husk or tegument and the kernel. The tegument or husk is the external layer of the seed covering the kernel, the latter being considered the main part of the seed. The kernel has two parts: the embryo or germ that will form the new plant when the seed germinates; and the albumin or endosperm, which stores the reserve nutrients that will feed the plant in the first stages of development.

Grains generally contain proteins and, depending on the plant species, starch or triacylglycerols as energy reserve sources. In the mobilization of these three major nutrient reserves during germination, they are hydrolyzed specifically by proteases, amylases and lipases, respectively. Many researchers have investigated seed lipase at the height of its activity during grain germination (Hellyer et al., 1999; Paques and Macedo, 2006).

From 20% to 50% of the dry weight of oilseeds is basically stored triacylglycerols. During the germination period, the triacylglycerols stored in “oil bodies” or “oleosomes” are quickly used up in the production of energy for the synthesis of the sugars, amino acids (mainly asparagine, aspartate, glutamine and glutamate) and carbon chains required for embryonic growth (Quittier and Eastmond, 2009; Ejedegba et al., 2007; Borek, et al., 2006; Huang et al. 1988).

Figure 3 shows the hydrolysis of seed triacylglycerol to free fatty acids and glycerol by the action of one or more lipases. The glycerol formed is phosphorylated and subjected to glycogenesis after its conversion to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) (Quettier et al. 2008). The free fatty acids

are transported into the peroxisome, where they are activated into acetyl-CoA and initiate β -oxidation. The acetyl-CoA produced by β -oxidation enters the glyoxylate cycle and subsequently takes part in gluconeogenesis to produce the sugar required by the embryo as an energy source during germination (Quettier and Eastmond, 2009).

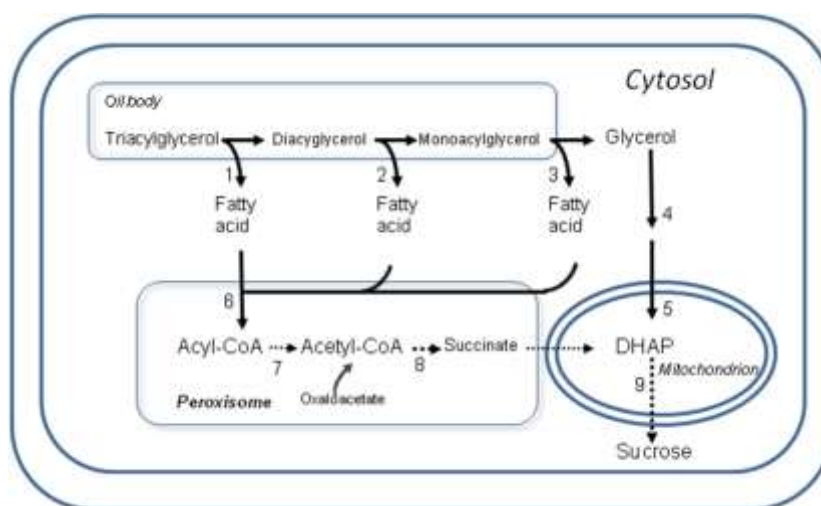


Figure 3: Triacylglycerols (TAG) stored in the lipid bodies are hydrolyzed to fatty acids (FA) and glycerol (Gly) by the sequential action of one or more lipases (1,2,3). Gly is converted to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) by the action of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (4) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (5). The FAs are transported into the peroxisome, where they are activated into acyl-CoAs (6) and enter the β -oxidation spiral (7). Acetyl-CoA condenses with oxaloacetate (OAA) to form succinate (8). Succinate and DHAP are converted to sugars such as sucrose by gluconeogenesis (9) (Adapted from Quittier and Eastmond, 2009).

In most cases, lipolytic activity is not observed in the non-germinated seeds, but only in post germinated seeds (Hassanien and Mukherjee, 1986; Villeneuve, 2003). Also, depending on the plant, the lipases may be located in the lipid bodies or in other sub-cellular compartments. In seeds in which the lipase is found in sub-cellular compartments, the enzyme may be free or associated with organelles. In seeds in which the lipase is in sub-cellular compartments that are not lipid bodies, the enzymes will have contact with the lipid body membranes during catalysis (Eastmond, 2004).

2.1 Specificity of Seed Lipases

With some exceptions, oilseed lipases are generally more active with triacylglycerols containing short chain fatty acids. Commonly used substrates include commercially produced plant oils with unknown purity and non-specific polluting agents, triacylglycerols with short chain fatty acids such as acetic and butyric acids, saturated and non-saturated acylglycerols and fluorescent substrates with molecular structures composed of monoesters (Borgston and Borckman, 1984; Enujiagha et al., 2004).

According to Hellyer et al. (1999), seed lipases show selectivity for the dominant fatty acids in the seed. For example, castor bean lipases show selectivity for triricinolein; palm tree lipase for tricaproin or trilaurein; elm lipase for tricaproin and *Vermonia sp.* lipase for trivernolein. Other seed lipases can quickly hydrolyze a great variety of fatty acids, such as canola and pinus seed lipases. Canola seed lipase usually presents activity with most lipids, but discriminates fatty acids with *cis*-4 or *cis*-6 double-bonds. Tables 1 and 2 show the hydrolysis of several triacylglycerols and of synthetic 4-methylumbelliphenyl substrates, respectively, by seed lipases.

Table 1: Hydrolysis of several triacylglycerols by lipases from various seed sources

		Relative activity (%)							
Triacylglycerols		Castor Bean	Corn	Rapessed	Rapessed (erucid acid increased)	Elm	Mustard	Palm	Pinus
Tricaproin	C10:0	43	27	89	-	100	-	100	74
Trilaurein	C12:0	60	0	31	-	4	-	60	78
Trimyristin	C14:0	26	0	92	-	3	-	15	89
Tripalmitin	C16:0	46	0	27	51	0	39	35	85
Triestearin	C18:0	62	0	36	89	0	40	-	103
Triolein	C18:1	55	38	44	138	4	96	-	96
Trilinolein	C18:2	57	100	89	116	6	89	-	100
Trilinolenin	C18:3	100	0	83	-	0	-	-	114
Tribehenin	C22:0	-	0	16	-	0	-	-	83
Trierucin	C22:1	36	45	100	100	0	100	-	-
Triarachidin		-	-	-	-	-	-	-	60

Table 1 shows that the seed lipases evaluated had greater activity for the triacylglycerols containing the fatty acids found in higher percentages in the nutrient reserve tissue of that seed. Such affinity is of great physiological significance for the seed (Quettier and Eastmond, 2009; Hellyer et al., 1999; Hammer and Murphy, 1993).

Corn lipase, for instance, presented greater activity with the triacylglycerols containing oleic and linolenic acids, which are the main constituents of corn oil. Similarly, elm lipase showed a high level of specificity and activity for tricaprin, and less than 10% of activity with the other triacylglycerols studied. This specificity level is even greater than that of palm seed lipase for caproic acid, which represents a greater percentage of the storage triacylglycerols of this seed (Lin, 1986; Hammer and Murphy, 1993).

With synthetic substrates, lipases are found to present the same pattern they present with natural substrates (Table 2). Lipases from corn, canola and elm seeds were more active with 4-methylumbelliferyl oleate, whereas the lipase from pinus seed was more active with 4-methyl-umbelliferyl laurate, showing no connection with fatty acid chain size, since it presented high laurate and oleate activities and low stearate activity (Lin, 1986; Hammer and Murphy, 1993).

Table 2: Hydrolysis of synthetic substrates (acyl 4-methyl-umbelliphenyl) by lipases from various sources.

Substrate (4-methyl- umbelliferyl)	Relative Activity (%)			
	Corn	Canola	Elm	Pinus
Laureate	32	35	169	100
Palmitate	12	4	29	28
Estearin	5	44	53	6
Oleate	100	100	100	81
Elaidic	-	-	-	51

2.1.1 Oilseed Lipases

Genuine lipases are those that hydrolyze fatty acids bonded to their respective triacylglycerols. In vegetables, they are present in oleaginous seeds (oilseeds) and other cereal seeds. During the germination period of oilseeds, the lipid reserve is rapidly used up in the production of energy for embryonic growth. During this period, lipolytic activity is very high and, depending on the plant species, the lipase may be located in the membrane of the lipid bodies or in other cellular compartments (Borgston and Borckman, 1984).

The following are the most widely studied oilseed grains with respect to lipase extraction and characterization: beans (Enujiugha et al., 2004); sunflower seeds (Sagiroglu and Arabaci, 2005; Sadeghipour and Bhatla, 2003); linseed (Sammour, 2005); peanuts (Huang and Moriau, 1978) and cotton seeds (Rakhimov et al., 1970), although lipases from other oilseed sources are currently being investigated. Some of these studies and the characteristics of the oilseed lipases, such as those from beans, sunflower seeds, canola, Barbados nut, lupin, linseed, coconut, French peanut, almond, laurel and black cumin, are described and discussed in this review.

Bean Lipases

Bean lipases are well known and characterized. They are generally more active at pH levels close to neutrality, with an optimum temperature of 30°C and specificity for short and medium chain fatty acids. Enujiugha et al. (2004) studied the lipolytic activity of Africa bean seeds (*Pentaclethra macrophylla* Benth) and the enzyme showed greater activity with oils containing short chain fatty acids, especially coconut oil. The optimum temperature of the lipase was 30°C, but at 80°C it still showed lipolytic activity, indicating that it is a heat stable enzyme. The optimum pH was close to neutrality. The authors also observed the effects of different salts on enzymatic activity and found that the presence of Ca^{2+} salts enhanced the activity at 64%, whereas sodium chloride and mercury chloride inhibited the activity at 36% and 28.55%, respectively. The addition of EDTA caused inhibition of 28% of the activity.

French bean lipase was studied by Kermash and Van de Voort (1986), who investigated the effects of pH, calcium concentration and the addition of emulsifying agents. The results showed that the enzyme presented greater activity at pH 7.0 and that the addition of calcium had an inhibitory effect, whereas the addition of the emulsifier Tween-20 resulted in a four-fold increase in enzyme activity. The specificity of the French bean lipase was compared to that of pancreatic lipase using as substrates triacetin, olive oil and French bean oil. The raw French bean lipase showed greater activity than pancreatic lipase in all these substrates, the highest activity being detected with triacetin.

Castor beans contain a lipase with some peculiar characteristics. The enzyme showed optimum activity at a pH close to 4.5 and was inactivated at pH values above 6.0 at a temperature of 30°C. This acid lipase exhibited specificity for short and medium chain fatty acids and also for non-saturated ones. In addition, it showed some regioselectivity for fatty acids at the positions *sn*-1 and *sn*-2 (Eastmond, 2004).

Tüter (1998) studied castor bean lipase as a biocatalyst in esterification reactions. The author evaluated parameters such as incubation time, pH, enzyme

concentration and the glycerol to fatty acid molar ratio. The best reaction conditions were found to be 4 hours at pH 4.0 with 20% of enzyme extract and a 5:1 glycerol to fatty acid molar ratio. According to the author, this enzyme shows good prospects for industrial use.

Sunflower Seed Lipases (*Heliantus annuus* L.)

The reduction in stored lipids during the germination of sunflower seeds was studied by establishing a correlation with the seed proteins (Sadeghipour and Bhatla, 2003). The results showed that seeds growing in the sunlight showed greater lipolytic activity and a concomitant expressive increase in proteins with molecular weights of 40-50 kDa.

Sagiroglu and Arabaci (2005) studied the physical-chemical properties of purified sunflower seed lipase (*Heliantus annuus* L.). The researchers observed that the monomeric lipase usually presented a molecular weight of 22 kDa and a pI of 8.0, and showed behavior similar to that of a typical lipase, with a K_m of 1.33 mM and V_{max} of 555 U.mg⁻¹. It showed a preference for triacylglycerols with mono-unsaturated fatty acids, a high temperature of 50°C and a high pH value of 7.5. Enzyme stability was also evaluated during grain storage, and it was shown that the lipolytic activity was preserved in a temperature range from 35 to 50°C with an alkaline pH value for a period of about four months.

Canola Lipases (*Brassica napus* L.)

Sana et al. (2004) evaluated the physicalchemical properties of germinated canola seed lipase (*Brassica napus* L.) purified by chromatography in a column packed with Sephadex G-50, DEAE and CM-cellulose. Using triolein as the substrate, the highest activity was found at pH 7 with a temperature of 37°C. In the presence of Ca²⁺ and Bi³⁺ ions, the lipolytic activity was found to increase by 165% and 124%, respectively. Fe³⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ and Cu²⁺ ions inhibited the lipolytic activity and Al³⁺ and Pb²⁺ ions had no influence on the hydrolysis activity.

Lin et al. (1986) studied the activity of canola lipase in different substrates. The enzyme showed high activity when acting on trierucic, tripalmitate and 4-methyl-umbeliferol oleate.

Liaquat and Apenten (2000) studied the formation of low molecular weight esters in an organic medium composed of hexane, using enzymes precipitated from different vegetable seeds by ammonium sulphate. Direct esterification of acetic, butyric and caproic acid by ethanol, butanol, isobutanol or (Z)-3-hexen-1-ol was also carried out. Of the grain lipases studied (wheat, linseed, barley and canola), canola seed lipase showed the highest degree of flavor formation, producing (Z)-3-hexen-1-yl butyrate and (Z)-3-hexen-1-yl caproate with an efficiency of about 96%.

Barbados Nut Lipases (*Jatropha curcas* L.)

Seed lipases from *Jatropha curcas* L., also known as Barbados nut, were studied by Abigor et al. (2002). The lipase was partially purified using a combination of ammonia sulphate precipitation and ultrafiltration. The enzyme showed high activity in triolein at a high pH of 7.5 and temperature of 37°C. The authors observed that the addition of Fe^{2+} (15mM) inhibited 90% of the enzymatic activity, whereas the addition of Ca^{2+} increased it by 130% and that of Mg^{2+} by 30%.

Staubmann et al. (1999) also studied Barbados nut seeds and found two esterases (JEA and JEB) and a lipase (JL). They only observed lipolytic activity in the grain during the germination period, reaching a maximum 4 days after germination. All three enzymes (precipitated by ethanol and purified by gel filtration) presented optimum activity at an alkaline pH of about 8.0. Using *p*-nitrophenyl butyrate as the substrate, JEA showed a value for K_m of 0.02 mM and V_{max} of 0.26 $\mu\text{mol. mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, and under the same conditions, JEB showed a value for K_m of 0.07 mM and V_{max} of 0.24 $\mu\text{mol. mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Both esterases hydrolyzed tributyrin, nitrophenyl esters up to a chain length of C4 and naphthylesters up to a chain length of C6. As for JL, it hydrolyzed short and long

chain triacylglycerols and gave above 80% triacylglycerol conversion in transesterification reactions.

Lupin Lipases (*Lupinus luteus* L.)

Borek et al. (2006) observed the lipolytic activity of seed lipases from lupin (*Lupinus luteus* L.) cultivated *in vitro* in a medium with and without sugars. They observed increasing lipolytic activity up to a maximum of 96h of incubation under both conditions. The authors also showed that seeds cultivated in a medium without sugar produced greater lipolytic activity than seeds cultivated in a medium with sugars. The lipids stored in the seed are for use as energy reserves and also for carbohydrate synthesis. Thus, seeds cultivated in a medium without sugars require lipids to obtain carbohydrates, which, in turn, require lipases to release the lipids.

Sanz and Olias (1990) studied the physicochemical properties of lipases from non-germinated lupine seeds. The results showed that the lipase presented optimum activity at a pH of about 5.0 and temperature of 45°C. The lipolytic activity increased in the presence of potassium (10mM), calcium (1mM) and magnesium (1mM) ions and the enzyme showed greater specificity for fatty acids at positions 1 and 2 of the lupine seed oil triacylglycerols, and was more active with saturated than unsaturated fatty acids.

Linseed Lipases (*Linum usitatissimum* L.)

Sammour (2005) studied linseed lipases (*Linum usitatissimum* L., “Giza 5”) and the results showed that this was an acid lipase with an optimum pH of 4.5. This enzyme was particularly active between 36 and 84 h after seed germination and only showed low lipolytic activity in non-germinated grains. It was active with a large variety of triacylglycerols, especially C18:n, but was not active with mono and diacylglycerols. In specificity terms, the linseed lipase was similar to those of the canola and Barbados nut seeds.

Coconut Lipases (*Cocos nucifera* linn)

Ejedegba et al. (2007) studied the physicochemical characteristics of semi-purified coconut lipases extracted with acetone. Four substrates were used to evaluate the enzymatic activity: triolein, tripalmitin, olive oil and coconut oil. The lipase showed a greater affinity for coconut oil, with an optimum pH of 8.5 and optimum temperature range of 35-40°C in triolein. The researchers also observed a greater affinity of this enzyme for long chain fatty acids at positions *sn-1* and *sn-3*.

French Peanut Lipase (*Panchira aquatica Bombacaceae*)

The recently discovered *Panchira aquatica* lipase was studied by the researchers Polizelli et al. (2008) with respect to the physical-chemical characteristics of the purified enzyme. The lipase showed maximum activity at 40°C and pH 8.0 for an incubation period of 90 min. Concerning temperature stability, in the range from 4 a 50°C, it retained approximately 47% of its original activity for 3h. An increase in enzymatic activity was observed in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, and inhibition in the presence of Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Al^{3+} ions. The enzyme was stable in the presence of organic solvents, and gave a K_m of 1.63 mM and V_{max} of 37.3 $\mu\text{mol mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ using p-nitrophenylacetate as the substrate. It showed an affinity for short chain fatty acids.

Almond Lipase (*Amygdalus communis* L.)

Almond seed lipases (Yesiloglu and Baskurt, 2008) presented optimum activity at a pH value of about 8.5. The enzyme, semi purified with ammonium sulfate, showed similar behavior to the other lipases with K_m and V_{max} values of, respectively, 25 mM and 113.63 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ using tributyrin as the substrate. It showed good hydrolysis activity with all the substrates studied (olive oil, corn, soybean, sunflower seed, almond, tributyrin and triolein). With respect to temperature, the lipase was stable between 20°C and 90°C, and stood out for having an optimum activity at 65°C in soybean oil. Its activity in soybean oil was increased by the addition of Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Ba^{2+} salts, but was strongly

inhibited by Mg^{2+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} salts. The enzyme retained its activity after six months storage at $-20^{\circ}C$.

Laurel Lipases (*Laurus nobilis* L.)

The laurel (*Laurus nobilis* L.) is a tree of the genus *Laurus*, from the botanical family Lauraceae or Laurel, originally from the Mediterranean area. The laurel seed lipase was isolated and characterized by Isbilir et al. (2008), and the seed oil itself used to determine all the characteristics. The optimum pH value was 8.0, but it was stable in the pH range from 7.0 to 10.0. The optimum temperature was $50^{\circ}C$, but it retained 68% of its activity after 1 h at $68^{\circ}C$. Unlike most other lipases, this enzyme presented significantly higher activity not only with Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, but also with Co^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} ions.

Black-Cumin Lipases (*Nigella sativa*)

Dandik and Aksoy (1996) studied some applications of the seed lipase from black-cumin, a plant from Southeast Asia, with respect to its use in oleochemical reactions. The esterification of oleic acid with ethanol was evaluated without removal of the water from the medium. Greater ester production was observed at $45^{\circ}C$ using a proportion of 1:1.5 methanol:oleic acid and 50% of pressed seed in relation to the total weight of the reagents. The esterification of glycerol with oleic acid was also studied without removal of the water, using different substrate proportions. The highest conversion of oleic acid was obtained with a glycerol to oleic acid molar ratio of 4:1 at $45^{\circ}C$, giving a product containing 31.2% of monolein, 37.3% of diolein, 15.7% of triolein and 15.8% of oleic acid.

Akova and Ustun (2000) evaluated the adsorption of the *Nigella sativa* lipase onto Celite at different pH values. They observed that adsorption increased from 14.4 to 24.3mg.g⁻¹ as the pH was reduced from 8.0 to 5.0, and that pH 6 was the optimum pH value for activity. Thus, the authors established a pH value of 6.0 as the best for adsorption, and, under this condition, the best for activity as well. The *Nigella sativa* seed lipase was also studied by Tuter et al. (2003). The seed

lipases were partially purified and then applied in transesterification and esterification reactions in the presence of different organic solvents. The experiments showed that the performance of the vegetable lipase was similar to that of microbial lipases, demonstrating its great potential for industrial applications.

2.1.2 Cereal Seed Lipases

Cereal grains contain from 2 to 10% of lipids, depending on the species and variety, and about 80 to 90% of the triacylglycerol fatty acids are oleic and linoleic (Hilditch and Williams, 1964). Lipids are normally located in the embryo (germ) and aleurone layer (the bran, which includes the pericarp, testa and part of the endosperm). Lipolytic activity is present in different parts of cereal grains. Many researchers have focused their studies on these enzymes due to the process of rancidification that can occur during grain storage. The physiological function and exact location of these enzymes in the tissues are still important aspects to be discovered (Borgston and Borckman, 1984).

Some studies and the characteristics of cereal seed lipases such as rice, wheat, corn, oat, barley and sorghum are described and discussed below.

Rice Lipases (*Oryza sativa*)

Most of the lipolytic activity in rice is found in the bran (Borgston and Borckman, 1984). A heat stable lipase was identified in rice and purified by chromatography using Octyl-Sepharose. The enzyme is a glycoprotein with a molecular weight of 9.4 kDa and has shown optimum activity at 80°C and pH 11.0, using triolein as the substrate. The enzyme shows both phospholipase and hydrolysis activities, preferably at position *sn*-2 of phosphatidylcholine, although apparently it does not show positional specificity with triacylglycerols. Diisopropylfluorophosphate inhibited both the lipase and phospholipase activities (Bhardwaj et al., 2001).

Wheat Lipases (*Triticum aestivum* L.)

Wheat germ lipase, originally described by Singer and Hofstee (1948), is commercially available. Some authors have classified wheat lipase as an esterase, but Korneeva et al. (2008), Jing et al. (2003) and Kapranchikov et al. (2004) carried out their studies using triolein as the substrate, and showed good activity.

Rose and Pike (2006) determined the lipolytic activities of both wheat and wheat bran. Lipase activity in wheat bran ranged from 2.17 to 9.42 U/g, and in whole kernel wheat from 1.05 to 3.54 U/g. Optimal olive oil and water concentrations were 0.4 to 0.8 mL and 0.15 to 0.20 mL per g of defatted sample, respectively. Optimal incubation temperature was 40°C, and incubation times of up to 8h were linear. The authors observed that the lipolytic activity was highly related to the pool of free fatty acids in the stored wheat.

Purified wheat lipase (143 ± 2 kDa) showed optimum activity at alkaline pH values close to 8.0 and at 37°C. The enzyme maintained 20% of its activity after incubation at temperatures from 60 to 90°C for an hour at pH 8.0 (Kapranchikov et al., 2004). Similar results were reported by Jing et al. (2003) in their study using microemulsions with triolein as the substrate. They found a K_m of $76 \pm 4 \mu\text{mol/L}$ and a V_{max} of $59 \pm 2 \mu\text{mol/mL.h}$.

The active enzyme site was studied by Korneeva et al. (2008) using the Dixon method. The lipase was inactivated by diethylpyrocarbonate and dicyclohexylcarbodiimide, suggesting that the active enzyme site contained an aspartame, carboxylic or glutamic acid group and a histidine imidazole group. Other tests demonstrated that apparently the OH group of serine had an important function in the catalytic action of the enzyme.

Corn Lipases (*Zea mays* L.)

Lipolytic activity in corn grains was only observed two days after seed germination, and started to decrease along with the decrease in total stored lipids. The peak in lipolytic activity was about 5-6 days after germination. This enzyme

shows much greater activity with triolein than with mono and diolein. Huang et al. (1988) and Lin et al. (1986) observed that corn seed lipase showed higher activity with triacylglycerols that contained linoleic and oleic acids.

Liaquat and Apenten (2000) studied the synthesis of esters with different molecular weights by seed lipases precipitated with ammonium sulfate, in a medium containing organic solvents. Corn lipase showed better activity with short chain fatty acids in the following order: acetic (2C) > butyric (4C) > caproic acids (6C), in an organic medium using isopentanol and 72 h of reaction time. Zhong et al. (2007) studied recombinant dog lipase expressed in transgenic corn seed. Of the different surfactants evaluated, the enzyme showed greater stability in Tween 80 at a concentration of 0.01% (w/w) and pH 5.5. This study showed the possibility of genetically modifying the seeds, aiming at changing or increasing the lipolytic activity.

Oat Lipases (*Avena fatua*)

Oat lipase, partially purified by ion change chromatography, was studied by Mohamed et al. (2000). Four isoenzymes, EI, EII, EIII and EIV, were separated by chromatography. The enzymes EII and EIII presented K_m values of 0.52 and 0.38 mM, respectively; optimum activity at pH 9.0 and half the maximum activity at pH values of 8.5, 10 and 10.5; and optimum activity at 75°C and 65°C, respectively. The enzymes were heat stable, EII retaining 39% and EIII 23% of their activity at 90°C. The enzymes were stimulated in the presence of Ba^{2+} and Ca^{2+} ions, but inhibited by Mn^{2+} and Zn^{2+} ions. Resistance to high temperatures and activity at alkaline pH values are important properties for possible industrial applications.

Barley Lipases (*Hordeum vulgare*)

Kubicka et al. (2000) identified lipase in germinated barley grains. The lipolytic activity was measured using glycerol tributyrates as substrate at pH 8.0. The authors found maximum activity two days after seed germination, followed by a decrease in activity, concomitantly with a decrease in stored lipids. Liaquat and

Apenten (2000) evaluated the performance of barley lipase in ester hydrolyses in an organic medium containing (Z)-3-hexen-1-ol. They observed that the enzyme showed greater activity in the medium containing acetic acid (2C) as the substrate.

Sesame Lipases (*Sesamum indicum* L.)

The lipase of germinated sesame seed was studied by Wanasundara et al. (2001). The authors evaluated the lipolytic activity for 10 days after germination and found maximum activity four days after germination. The enzyme showed an affinity for short chain fatty acids at a temperature of 38°C.

Sorghum Lipase (*Sorghum bicolor* L.)

Burukutu is an alcoholic drink produced with germinated sorghum seed, dried in the sun without removing the germ, ground and suspended in water for simultaneous saccharification and fermentation (Kun, 1997). Uvere and Orji (2002) evaluated the lipolytic activity during sorghum malting and fermentation (red and white varieties) for the production of *Burukutu*. The 5-day malt was fermented for 48h to produce *Burukutu*, and the lipolytic activity was observed during this period. The pH of the fermentation medium decreased from 5.33 to 3.88 and from 5.35 to 3.85, for the red and white seed malts, respectively. During fermentation, the red malt enzyme showed greater activity in a shorter time than the white malt enzyme.

Sorghum was also studied by some researchers as an alternative to barley malt replacement. Nwanguma et al. (1996) detected lipolytic activity in non-germinated sorghum seeds during grain malting and mashing. The authors observed a slight decrease in enzyme activity during steeping for 24 hours, but it increased several fold in the course of germination. Between 24 and 60% of the lipolytic activity was retained after cooking at 48°C, but no activity was found after mashing at 65°C. About 68% of the lipase activity of 72 h old malt was detected in the plumule, while 29% and 3% were in the endosperm and radical, respectively.

No study was carried out to characterize the physical-chemical properties of the lipase present in sorghum grains; only the presence of lipolytic activity was determined. Since sorghum grains are being used to obtain products of great value, studies should be carried out to characterize the enzyme and its possible inhibitors in order to obtain products with better sensory quality.

A summary of the most widely studied seed lipases, their main physical and chemical features and their applications are shown in Table 3.

Table 3: The most studied seed lipases and their main features and biochemical properties.

Lipase source	Optimum pH	Optimum Temperature	Ativator	Inhibitor	Substrate	Positional especificity	Application
Africa bean seeds (<i>Pentaclethra macrophylla</i> Benth)	7	30°C	Ca ²⁺	EDTA	Coconut oil Olive oil, Triacetin, oil		Hydrolysis
French bean seed (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	7	35°C	Tween-20	Ca ²⁺	french bean		Hydrolysis
Castor bean seed (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	4,5	30°C	Ca ²⁺	p-Chloromercuribenzoic acid	p-nitrophenyl butyrate	sn-1 and sn-2	Esterification
Repressed seed (<i>Brassica napus</i> L.)	7	37°C	Bi ³⁺ e Ca ²⁺	Fe ³⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ and Cu ²⁺	Olive oil		Esterification, Transesterification
Barbados Nut (<i>Jatropha curcas</i> L.)	7,5	37°C	Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Fe ²⁺	Olive oil		Hydrolysis
Lupin seed (<i>Lupinus luteus</i> L.)	5	45°C	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ e K ²⁺		Lupin oil	sn-1 and sn-2	Hydrolysis
French Peanut (<i>Panchira aquatica Bombacaceae</i>)	8	40°C	Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Hg ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ and Al ³⁺	p-nitrophenyl acetato		Hydrolysis
Almond seed (<i>Amygdalus communis</i> L.)	8,5	65°C	Ca ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ and Ba ²⁺	Mg ²⁺ , Cu ²⁺ and Ni ²⁺	soybean oil		Hydrolysis
Laurel seed (<i>Laurus nobilis</i> L.)	8	50°C	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ and Fe ²⁺		Laurel oil		Hydrolysis
Black-Cumin seed (<i>Nigella sativa</i>)	6	45°C			olive oil		Esterification, Transesterification
Rice seed (<i>Oryza sativa</i>)	11	80°C			olive oil	position sn-2	Hydrolysis
Wheat seed (<i>Triticum aestivum</i> L.)	8	37°C			Triolein		Hydrolysis, Estetrification
Oat seed (<i>Avena fatua</i>)	9	65 and 75°C	Ba ²⁺ and Ca ²⁺	Mn ²⁺ and Zn ²⁺	p-nitrophenyl palmitatate		Hydrolysis
Coconut seed (<i>Cocos nucifera</i> linn)	8,5	30 - 40°C			Olive oil	sn-1 and sn-3	Hydrolysis

*Commercial Lipase

3. Lipase Applications

The versatility of lipases in catalyzing different kinds of reactions associated with their different specificities endows these enzymes with an important and vast application potential (Gandhi, 1997; Sharma et al., 2001; Pastore et al., 2003; Enujiugha et al., 2004; Hansan et al., 2006; Parques et al., 2006; Freire and Castilho, 2008; Yesiloglu and Baskurt, 2008; Isibilar et al., 2008; Polizelli et al., 2008). Lipases are excellent alternatives for classic chemical syntheses with industrial applications, such as in foods, detergents, oleochemicals, pharmaceuticals, fine chemistry, cosmetics and fragrances, paper pulp, leather, biosensors and lipid-rich wastewater treatment (Gandhi, 1997; Paques et al., 2006; Freire and Castilho, 2008).

3.1 Food

Lipases are employed in food manufacturing to liberate fatty acids into food products by selective hydrolysis of the fats and oils present in many kinds of food. Depending on the carbon chain length and on the degree of unsaturation, the fatty acid obtained provides the food with flavors, colors and unusual smells, playing an important role in the physicochemical, organoleptic and nutritional properties of many products (Gandhi, 1997; Sharma et al., 2001; Freire and Castilho, 2008).

Wheat, barley, corn and canola seed lipases were used to produce low molecular weight esters in an organic environment (Liaquat and Apent, 2000). The authors observed that the crude lipase extracts from each of these seeds were efficient for the synthesis of esters. Germinated canola seed lipase showed better performance with respect to the synthesis of esters when compared with the other enzymes analyzed. (Z)-hexen-1-yl butyrate and (Z)- 3-hexen-1-yl caproate were obtained in about 96% yield, and butyl butyrate, isopentyl butyrate, butylcaproate and isopentyl caproate in 80% yield. Canola seed lipases presented about a 63% yield for ethyl acetate and butyl acetate, whereas barley and corn seed lipases only

presented 40% yield. Thus, the crude, semi-purified canola extract is an excellent alternative for the production of esters in an organic environment

3.2 Detergents

The use of lipases as functional compounds in the formulation of detergents is responsible for the sale of about 1,000 tons of lipases every year, or about 32% of the total lipase sales (Sharma et al., 2001). The main features necessary are stability under the conditions of washing (pH between 10.0 and 11.0 and temperatures between 30°C and 60°C), resistance to the other components of the formulation (such as alkyl-benzenesulphonates and proteases) and low substrate specificity, i.e., an ability to hydrolyze fats with various compositions.

Rice (*Oryza sativa*) and oat (*Avena fatua*) seed lipases present suitable features for their use in detergents (Table 3). They are stable at alkaline pH values and at temperatures of about 60°C.

3.3 Oils and Fats

Lipases show a wide range of applications in oil chemical industries. Their usage reduces expenses with energy and minimizes the heat degradation of compounds in comparison to traditional chemical processes (Freire and Castilho, 2008).

Tuter et al. (2003) used *Nigella sativa* L. seed lipases to enrich borage oil with gamma-linolenic acid. The best result was obtained in an experiment carried out with 330 U/g of semi-purified freeze dried seed extract and 200 U/g of freeze-dried seed and oil.

Tuter et al. (1998) used castor bean lipase as the biocatalyst in the esterification of fatty acids and glycerol. The enzyme showed optimal efficiency in the formation of new tri-, di- and monoglycerols, presenting great potential for the production of triacylglycerols of interest.

3.4 Fine Chemistry

The pharmaceutical and fine chemical industries have long used lipases in their productive processes. Lipase regio-, enantio-, and chemoselectivity features allow their use for the resolution of racemic mixtures and the removal of some compounds. In general, these enzymes show excellent stability in the presence of organic solvents, in which the substrates are soluble (Jaeger and Eggert, 2002; Gotor-Fernández et al., 2006).

Xia et al. (2009) used wheat germ lipase for the kinetic resolution of secondary alcohols. The following alcohols were used: (*R.S*)-1-phenylethanol (*rac*-1a), (*R.S*)-2-chloro-1-phenylethanol (*rac*-1b), (*R.S*)-1-(3-chlorophenyl) ethanol (*rac*-1c), (*R.S*)-1-(4-chlorophenyl) ethanol (*rac*-1d), (*R.S*)-2-octanol (*rac*-1e), (*R.S*)-2-butanol (*rac*-1f) and (*R.S*)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol (*rac*-1g). The wheat lipase showed high kinetic resolution for aryl sec-alcohol and a relatively low conversion ratio with aliphatic alcohols such as 2-octanol and 2-butanol. Furthermore the wheat lipase showed high enantioselectivity for aryl sec-alcohol, especially for 1-phenylethanol, as compared to 2-octanol and 2-butanol. The authors reported the possibility of using wheat lipase in chiral syntheses, combined with other lipases.

3.5 Biodiesel

The use of lipase in biodiesel production has shown promising results in recent years. Using the enzymatic route, the by-product glycerol can easily be removed without the requirement of a complex separation process. In addition, oil-free fatty acids, which can be used as the raw material, are also completely converted into alkyl esters (Fukuda et al., 2001).

The choice of the best enzyme sources and optimization of the medium conditions, such as the substrate and solvent concentrations (Park e Mori, 2008) or the absence of solvents (Du et al., 2006), the temperature, water content, free fatty acid level, acyl migration and viscosity of the reaction medium in the bioreactor determine the success of the process.

Donato et al. (2008) suggested the production of methyl and ethyl esters using several esterification processes after the hydrolysis of different oils by vegetable lipases. According to these researchers, fatty acids can be obtained from the hydrolysis of palm oil by crushed castor beans; the hydrolysis of palm oil by an acetone extract from castor beans; the hydrolysis of pine seed oil by crushed castor beans and the hydrolysis of palm oil by the lipases present in the fruit itself. Every vegetable extract presents lipolytic activity, which can be applied in the production of fatty acids from the triacylglycerols obtained from a variety of sources, considering that the fatty material can be esterified by methanol or ethanol for biodiesel production.

Research in this field is still in progress due to the flexibility of the enzymes and the high cost of commercialization (Guan et al., 2009). The main studies focus on the relationship between the enzymatic production of biodiesel and the productivity of the biofuel manufacturing process (Nielsen et al., 2008).

Table 4 presents a summary of the applications and yields of the seed lipases mentioned above.

Table 4: Some seed lipases and their applications

Lipase Source	Application	Yield (%)	Authors
Barley seed (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	Production of low molecular weight esters	40	Liaquat and Apent, 2000
Maize seed (<i>Zea mays</i> L.)	Production of low molecular weight esters	40	Liaquat and Apent, 2000
Linseed (<i>Linum usitatissimum</i>)	Production of low molecular weight esters	63	Liaquat and Apent, 2000
Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	Production of low molecular weight esters	96	Liaquat and Apent, 2000
Black-Cumin seed (<i>Nigella sativa</i> L.)	Synthesis of structured lipids	31	Tuter et al. (2003)
Castor bean seed (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Synthesis of structured lipids	53	Tuter et al. (1998)
Wheat germ seed (<i>Triticum</i> sp)	Esterification	99	Xia et al. (2009)
Vernonia seed (<i>Vernonia galamensis</i>)	Hydrolysis of oils	80	Ncube and Read (1995)
Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	Esterification	98	Jchmanián and Mukhrjee (1996)
Black-Cumin seed (<i>Nigella sativa</i> L.)	Synthesis of structured lipids	81	Dandik and Aksoy (1996)

4. Conclusions and perspectives

Lipases are currently important as biocatalysts. A great number of articles have been published, especially concerning synthesis reactions, emphasizing the importance of lipases. The search for new lipases must be continuous and interesting seed sources must be well explored, since they may present different biochemical properties with respect to the reactions of hydrolysis and synthesis. There are a huge number of new seed sources for possible lipase exploitation. In the authors' laboratory, lipases from *Jatropha curcas*, castor bean, sorghum seed and soybean have been exploited for different reactions, achieving very promising results. Seed lipase sources can represent a cheaper and faster way to produce these important biocatalysts.

REFERENCES

- Abigor R. D., Uadia P. O., Foglia T. A., Haas M. J., Scott K. and Savary B. J., Partial Purification and Properties of Lipase From Germinating Seeds of *Jatropha curcas* L., Journal of the American Oil chemist's Society, 79, No. 11, 1123 (2002).
- Akova, A. and Ustung G., Activity and Adsorption of Lipase from *Nigella sativa* Seeds on Celite at Different pH values, Biotechnology Letters, 22, No. 5, 355 (2000).
- Alonso F. O. M., Oliveria E. B. L., Dellamora-Ortiz G. M. and Pereira-Meirelles F. V., Improvement of Lipase Production at Different Stirring Speeds and Oxygen Levels, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 22, No. 1, 9 (2005).
- Bhardwaj K., Raju A. and Rajasekharan R., Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A new member of the (Phospho) lipase family, Plant Physiology, 127, No. 4, 1728 (2001).
- Borek S., Ratajczak W., Ratajczak L., Ultrastructural and Enzymatic Research on the Role of Sucrose in Mobilization Storage Lipids in Germinating Yellow Lupine Seeds, Plant Science, 170, No. 3, 441 (2006).
- Borgston, B. and Brockman H. L., Lipases. Amsterdam, Elsevier (1984).
- Caro Y., Villeneuve P., Pina M., Reynes M. and Graille J., Lipase Activity and Fatty acid Type selectivities of Plant Extracts in Hydrolysis and Interesterification, Journal of the American Oil Chemists' Society, 77, No. 4, 350 (2000).
- Castro H. F., Oliveira P. C. and Pereira E. B., Influence of Substrate Partition Coefficient on the Performance of Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate by Alcoholysis, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17, No. 4-7, 1(2000).
- Dandik, L. and Aksoy A., Applications of *Nigella sativa* Seed Lipase in Oleochemical Reactions, Enzyme and Microbial Technology, 19, No. 4, 277 (1996).
- De Castro H. F., Mendes, A. A. Santos, J. C. and Lima, C.A, Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação, Química Nova, 27, No. 1, 146 (2004).
- Du D., Sato M., Mori M. and Park E. Y., Repeated Production of Fatty Acid Methyl Ester With Activated Bleaching Earth in Solvent-free System, Process Biochemistry, 41, No. 8, 1849 (2006).

Donato A. G. A., Antunes O. A. C., Freire D. M. G., Lago R. C. A., Cavalcanti E. D. C. and Sousa J. S., Produção de Ácidos Graxos Catalisada por Lipases Não Purificadas de Sementes ou Frutos Vegetais para Subseqüente Esterificação por Catálise Ácida. PI 0603824-7 A (2008).

Eastmond, P. J., Cloning and Characterization of the Acid lipase From Castor Beans, The Journal of Biological Chemistry, 279, No. 44, 45540 (2004).

Ejedegba B. O., Onyeneke E. C. and Oviasogie P. O., Characteristics of Lipase Isolated from Coconut (*Cocos nucifera* linn) Seed Under Different Nutrient Treatments, African Journal of Biotechnology, 6, No. 6, 723 (2007).

Enujiugha V. N., Thani F. A., Sanni T. M. and Abigor R. D., Lipase Activity in Dormant Seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth), Food Chemistry, 88, No. 3, 405 (2004).

Freire, G. D. M. and Castilho F. L., Lipases em Biocatálise. In: Bon et al. (org). Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado. Rio de Janeiro, Interciência (2008).

Fukuda H., Kondo A. and Nodo H., Biodiesel Fuel Production by Transesterification oil, Journal of Bioscience and Bioengineering, 92, No. 5, 405 (2001).

Gandhi, N. G., Application of Lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74, No. 6, 621 (1997).

Guan G., Sakurai N., and Kusakabe K., Synthesis of Biodiesel from Sunflower Oil at Room Temperature in the Presence of Various Cosolvents. Chemical Engineering Journal, 146, No. 2, 302 (2009).

Gotor-Fernández V., Brieva R. and Gotor V., Lipases: Useful Biocatalysts for the Preparation of Pharmaceuticals, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 40, No. 3-4, 111 (2006).

Hammer, M. F. and Murphy J. B., Lipase Activity and in vivo Triacylglycerol Utilization, Annual Review of Ecology and Systematics, 24, No. 3, 69 (1993).

Hasan F., Shah A. A. and Hameed A., Industrial Applications of Microbial Lipases, Enzyme Microbial and Technology, 39, No. 2, 235 (2006).

Hassaniem, F. R. and Mukhrjee K. D., Isolation of Lipase from Germinating Oilseeds for Biotechnological Processes, Journal of the American Oil Chemists' Society, 63, No. 7, 893 (1986).

Hellyer S. A., Chandler I. C. and Bosley J. A., Can the Fatty Acid Selectivity of Plant Lipases be Predicted from the Composition of the Seed Triglyceride?, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1440, No. 2-3, 215 (1999).

Hilditch T. P. and Williams P. N., *The Chemical Constitution of Natural Fats*. Chapman and Hall, London (1964).

Huang A. H. C., Lin Y. H., Wang S. M., Characteristics and Biosynthesis of Seed Lipases in Maize and Other Plant Species, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, No. 6, 897 (1988).

Huang, A. C. and Moreau R. A., Lipases in the Storage Tissues of Peanut and Other Oil Seeds During Germination, *Planta*, 141, No. 1, 111 (1978).

Isbilir S. S., Ozcan M. H. and Yagar H., Some Biochemical Properties of Lipase from Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.) Seeds, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, No. 3, 227 (2008).

Jachmanián I. and Mukherjee K. D., Esterification and Interesterification Reactions Catalyzed by Acetone Power from Germinating Rapeseed, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, No. 11, (1996).

Jaeger K. E. and Eggert T., Lipases for Biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, No. 4, 390 (2002)

Jing F., An X. and Shen W., The Characteristics of Hydrolysis of Triolein Catalyzed by Wheat Germ Lipase in Water-in-oil Microemulsions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 24-25, No. 3, 43 (2003).

Kapranchikov V. S., Zhrebtssov N. A. and Papova T. N., Purification and Characterization of Lipase from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germ, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, No. 1, 84 (2004).

Kermasha. S. and Van de Voort F. R., Characterization of French Bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase, *Canadian Intitute of Food Science and Technology*, 19, No. 1, 23 (1986).

Kamimura E. S., Mendieta O., Sato H. H., Pastore G. and Maugeri F., Production of Lipase from *Geotrichum* sp and Adsorption Studies on Affinity Resin, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16, No. 2, 103 (1999).

Korneeva O. S., Popova T. N., Kaprochikov V. S. and Montana E. A., Identification of Catalytically Active Groups of Wheat (*Triticum aestivum*) Germ Lipase, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, No. 4, 349 (2008).

Kubicka E., Grabska J., Jedrychowski L. and Czyz B., Changes of Specific Activity of Lipase and Lipoxygenase During Germination of Wheat and Barley, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 51, No. 4, 301 (2000).

Kun, O. S. M., Chemical Changes a Nutritive Values of Burukutu (a Nigeria beverage), *Nahrung*, 41, No. 6, 375 (1997).

Leal M. C. M., Cammarota M. C., Freire D. M. G. and Sant'Anna Jr., G. L., Hydrolytic Enzymes as Coadjuvants in the Anaerobic Treatment of Dairy Wastewaters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19, No. 2, 175 (2002).

Liaquat, M. and Apenten R. K. O. Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters Using Plant Seedling Lipases in Organic Media, *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, 65, No. 2, 295 (2000).

Lin Y. H., Yu C. and Huang A. H., Substrate Specificities of Lipase from Corn and Other Seeds, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 244, No. 1, 346 (1986).

Macrae A. R. and Hammond R. C., Present and Future Applications of Lipases, *Biotechnology Genetics and Engineering Review*, 3, 193 (1985).

Merçon F., Erbes V. L., Sant'Anna Jr G. L. and Nobrega R., Lipase Immobilized Reactor Applied to Babassu Oil Hydrolysis, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 14, No. 1, (1997).

Mohamed M., Mohamed T. M., Mohamed S. A. and Fahmy A. S., Distribution of Lipases in the Gramineae. Partial Purification and Characterization of Esterase from *Avena fatua*, *Bioresource Technology*, 73, No. 3, 227 (2000).

Ncube I. and Read J. S. Evaluation of *Vernonia galamensis* (acetone power) for Use in Biotechnology, *Industrial Crops and Products*, 3, No. 4, 285 (1995).

Nielsen P. M., Brask J. and Fjerbaek L., Enzymatic Biodiesel Production: Technical and Economical Considerations, *European Journal Science Technology*, 110, No. 8, 692 (2008).

Noor I. M., Hasan M. and Ramachandran, K. B., Effect of Operating Variables on the Hydrolysis Rate of Palm Oil by Lipase, *Process Biochemistry*, 39, No. 13 (2003).

Nwanguma B. C., Eze M. O. and Ezengwa O. O., Changes in Activity of Sorghum Lipase Malting and Mashing, *Journal of Institute of Brewing*, 102, No. 1, 39 (1996).

Paques, F. W. and Macedo G. A., Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A review, *Química Nova*, 29, No. 1, 93 (2006).

Pastore M. G., Costa V. S. and Koblitz M. G. B., Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp., *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, No. 2, 135 (2003).

Park E. Y. and Mori M., Kinetic Study of Esterification of Rapessed Oil Contained in Waste Activated Bleaching Earth Using *Candida rugosa* Lipase in Organic Solvent System, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37, No. 1-6, 95 (2008).

Pereira E. P., Zanin G. M. and Castro H. F., Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reactions, *Journal, Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, No. 4, 343 (2003).

Polizelli P. P., Tiera M. J. and Bonilla-Rodriguez G. O., Effect of Surfactants and Polyethylene Glycol on the Activity and Stability of a Lipase from Oilseeds of *Pachira aquatica*, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, No. 8, 749 (2008).

Quettier, A. L. and Eastmond, P. J., Storage Oil Hydrolysis During Early Seedling Growth, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 485 (2009).

Quettier A. L., Shaw E. and Eastmond P. J., Sugar-dependents Encodes a Mitochondrial FAD-dependent Glyceol-3-phosphate Dehydrogenase, Which is Required for Glycerol Catabolism and Post-germinative Seedling Growth in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 148, No. 1, 519 (2008).

Rakhimov M. M., Dzhanbaeva N. R. and Yuldashev P. K., Specificity the Lipase of Cottonseed, *Chemical of the Natural Compounds*, 6, No. 5, 616 (1970).

Ribeiro, A. P. B., Basso, R. C., Grimaldi, R. Gioielli, L. A., Santos, A. O. dos, Cardoso, L. P. and Gonçalves, L. A. G., Influence of Chemical Interesterification on Thermal Behavior, Microstructure, Polymorphism and Crystallization Properties of Canola Oil and Fully Hydrogenate Cottonseed Oil Blends, *Food Research International*, 42, 1153 (2009).

Rose, D. J. and Pike O. A., A Simple Method to Measure Lipase Activity in Wheat and Wheat Bran as an Estimation of Storage Quality, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 83, No. 5, 415 (2006).

Sadeghipour H. R. and Bhatla S. C., Light-enhanced Oil Body Mobilization in Sunflower Seedlings Accompanies Faster Protease Action on Oleosins, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, No. 4, 309 (2003).

Sagiroglu A. and Arabaci N., Purification and Characterization of Lipase from Sunflower Seed, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, No. 1, 37 (2005).

Sammaour, R. H., Purification and Partial Characterization of an Acid Lipase in Germinating Lipidbody Linseedlings, *Turkish Journal of Botany*, 29, No. 3, 177(2005).

Sana N. K., Hossin I., Haque E. M. and Shaha R. K., Identification, Purification and Characterization of Lipase from Germinating Oil Seeds (*Brassica napus* L.), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, No. 2, 246 (2004).

Sanz, L. C. and Olias J. M. Characterization of Lupin Seed Lipase, *Food Chemistry*, 37, No. 3, 221 (1990).

Sharma R, Chisti Y, Banerjee U. C., Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases, *Biotechnology Advances*, 19, No. 8, 627 (2001).

Singer T. P. and Hofstee B. H. J., Studies on Wheat Germ Lipase. In: *Methods of Estimation, Purification, and General Properties of the Enzyme*, *Archives of Biochemistry*, 18, No. 2, 229 (1948).

Staubmann R., Ncube I., Gübitz G. M., Steiner W. and Read J. S., Esterase and Lipase Activity in *Jatropha curcas* L. seeds, *Journal of Biotechnology*, 75, 117 (1999).

Sonnet P. E., Lipase Selectivities, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, No. 6, 900 (1988).

Tamalampudi S., Talukder M. R., Hama S., Numata T, Kondo A. and Fukuda, H., Enzymatic production of Biodiesel from *Jatropha* oil: A Comparative Study of Immobilized-whole Cell and Commercial Lipases as a Biocatalyst, *Biochemical Engineering Journal*, 39, No. 1, 185 (2008).

Tuter M., Secundo F., Riva S., Aksoy H. A. and Ustun, G., Partial Purification of *Nigella sativa* L. Seed Lipase and Its Application in Transesterification Reactions, *Journal of American Oils Chemists' Society*, 80, No. 1, 43 (2003).

Tüter M., Castor Bean Lipase as a Biocatalyst in the Esterification of Fatty Acids to Glycerol, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75, No. 3, 417 (1998).

Uvere, P. O. and Orji G. S., Lipase Activities During Malting and Fermentation of Sorghum for Burukutu Production, *Journal of the Institute of Brewing*, 108, No. 2, 256 (2002).

Villeneuve, P., Plant Lipases and Their Applications in Oils and Fats Modification, European Journal of Lipid Science and Technology, 105, No. 6, 308 (2003).

Xia X., Wang Y. H., Yang B. and Wang X., Wheat Germ Lipase Catalyzed Kinetic Resolution of Secondary Alcohols in Non-aqueous Media, Biotechnology Letter, 31, 83(2009).

Xu, X., Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Reactions: a Review, European Journal of Lipid Science and Technology, 3, 287 (2000).

Zhong Q., Xu L., Zhang C. and Glatz C. E., Purification of Recombinant Aprotinin from Transgenic Corn Germ Fraction Using Ion Exchange and Hydrophobic Interaction Chromatography, Applied Microbiology and Biotechnology, 76, No. 3, 607 (2007).

Yesiloglu, Y. and Baskurt L., Partial Purification and Characterization of Almond Seed Lipase, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 38, No. 4, 397 (2008).

Wanasundara P. K. P. D., Wansudara U. N. and Shahidi F., Lipolytic Activity of Enzymes from Germinating Seeds of Sesame (*Sesamum indicum* L.), Journal of Food Lipids, 8, 75 (2001).

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LIPASES E ESTERASES EM SEMENTES VEGETAIS.

Resumo

As esterases e as lipases são enzimas lipolíticas cuja diferença encontra-se na especificidade. As esterases apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia curta, enquanto que as lipases por ácidos graxos de cadeia longa. Enzimas lipolíticas têm sido estudadas em sementes vegetais uma vez que estas apresentam grande potencial para aplicação industrial. Este trabalho teve por objetivo principal avaliar a presença de enzimas lipolíticas em sementes de soja (*Glycine max* L), cacau (*Theobroma cacao* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.). O extrato bruto da semente de cacau apresentou atividade tanto de esterase como de lipase, porém os extratos de soja e sorgo apresentaram somente atividade de esterase. O processo de precipitação fracionado demonstrou que a concentração de sulfato de amônio a 60% foi suficiente para concentração da esterase de sorgo (188,30 U.mg⁻¹). Já para esterase de soja o extrato bruto sem adição do sal demonstrou maior valor de atividade (3,54 U.mg⁻¹), indicando que o sal não é eficiente para concentração da enzima. A solução de CaCl₂ a 0,01M demonstrou ser mais eficiente para extração da esterase de soja tanto observando o valor de atividade (1,83 U.mg⁻¹) quanto em relação ao teor de proteínas (42 mg.mL⁻¹).

Palavras chave: Soja (*Glycine max* L), Cacau (*Theobroma cacao* L.), Sorgo (*Sorghum bicolor* L.), lipase, esterase.

1. Introdução

Esterase (carboxil-ester hidrolases; EC 3.1.1.3) e lipase (triacilglicerol acilhidrolases; EC 3.1.1.3) são enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar ésteres de ácido carboxílico de cadeia curta e longa, respectivamente. A fundamental diferença das esterases para as lipases é a sua habilidade em agir sobre substratos solúveis. Esterases agem em moléculas solúveis de éster de ácidos carboxílicos, e as lipases atuam sobre ácidos carboxílicos de cadeia longa. Por longo tempo as lipases foram consideradas como uma especial categoria de esterases, as quais são altamente eficientes em hidrolisar moléculas agregadas em água (tais como uma emulsão ou solução micelar) (Panda e Gowrishankar, 2005; Singh, et al., 2006). Estudos de cristalografia realizados por Brzozowski et al. (1991) com a lipase de *Rhizomucor miehei* demonstraram que quando a enzima está na interface óleo/água, apresenta uma mudança conformacional em sua estrutura deixando-a mais acessível ao substrato.

Esterases e lipases estão amplamente distribuídas na natureza principalmente em sementes. Durante o período germinativo da semente observa-se um aumento da atividade das esterases e lipases presentes no tecido de reserva, pois é neste período que a demanda de energia aumenta. (Barros and Macedo, 2010).

Atividade lipolítica tem sido determinada em diversos tipos de sementes como feijão (Enujiugha et al., 2004); sementes de girassol (Sagiroglu e Arabaci, 2005; Sadeghipour e Bhatla, 2003); linhaça (Sammour, 2005); amendoim (Huang e Moriau, 1978), sementes de algodão (Rakhimov et al., 1970), trigo (Rose e Pike 2006) e arroz (Bhardwaj et al., 2001).

O estudo de enzimas lipolíticas de sementes tem crescido recentemente; uma vez que estas podem representar uma alternativa para aplicação industrial, como também ser um problema tecnológico. Lipase de gérmen de trigo, por exemplo, já é utilizada comercialmente. Por outro lado, algumas indústrias de chocolate têm encontrado problemas com lipases, que podem estar presentes na amêndoa do cacau. Um dos problemas observados por lipases na indústria de

chocolate, é a presença do gosto de ranço no produto, causado por ácidos graxos de cadeia curta livres, liberados por ação de lipases.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de lipase e/ou esterase em sementes de soja (*Glycine max* L), cacau (*Theobroma cacao* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

2. Materiais e métodos

Os grãos de soja (*Glycine Max* L.) utilizados neste estudo foram fornecidos pela **VITAO** indústria brasileira. Os grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. variedade vassoura) estudados foram fornecidos pela **Polinutri** Indústria de Alimentos LTDA. E as amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) estudadas foram das variedades crepe e liso oriundas do estado da Bahia, *in natura* e após torrefação.

2.1 Lipase comercial

A lipase comercial utilizada neste trabalho foi a Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus*, lote: LA35015602 (Novozymes). A concentração utilizada nos testes foi de 2mg/mL.

2.2 Extração das enzimas das sementes

As enzimas foram extraídas utilizando o método descrito por Aizono et al. (1973) modificado por Kermasha e van de Voort (1986). Uma líquota de 150 gramas (em peso seco) de semente foi triturada e a farinha obtida foi ressuspensa em uma solução contendo $1 \times 10^{-3} \text{M}$ de CaCl_2 e $5 \times 10^{-3} \text{M}$ de EDTA (1:3, w/v) e homogeneizada em liquidificador a 4°C por 3 minutos. A amostra foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL, agitado mecanicamente a 5°C por 30 minutos, e então, submetida à ultra-som (125W a 200W) por 1 minuto para a liberação da enzima ligada. A suspensão resultante foi centrifugada a $2000 \times g$ por 45 minutos a 5°C , para retirada dos resíduos suspensos. O sobrenadante foi usado como extrato enzimático bruto de esterase e lipase e armazenado congelado. A atividade esterásica e lipolítica do sobrenadante foram determinadas conforme descrito nos itens 2.3.1 e 2.3.2 respectivamente.

2.2.1 Estudo da eficiência de diferentes soluções na extração das enzimas.

Foi avaliada a eficiência de diferentes soluções na extração da esterase de sementes de soja. Amostras de 150 gramas (em peso seco) de sementes de soja foram trituradas em liquidificador e a farinha obtida foi ressuspensa em 550mL das seguintes soluções: CaCl_2 0,01M; tampão fosfato pH 7 + EDTA 0,01M; EDTA 0,01M + CaCl_2 0,01M; tampão fosfato pH7,0 + CaCl_2 0,01M. As amostras foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL, agitado mecanicamente a 5°C por 30 minutos, e então, submetida a ultra-som (125W a 200W) por 1 minuto para a liberação da enzima ligada. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 2000xg por 45 minutos a 5°C, para retirada dos resíduos suspensos. Os sobrenadantes resultantes foram liofilizados e as amostras de pó obtidas a partir das diferentes soluções foram mantidas em freezer a -18°C. Foi determinada a atividade esterásica e o teor de proteínas a partir do pó liofilizado. A atividade esterásica foi determinada conforme descrito no item 2.3.2 e 2.3.3.

2.3 Atividade lipolítica

2.3.1 Determinação da atividade lipásica por titulometria.

A atividade lipolítica do extrato semipurificado foi realizada em um sistema composto por 5mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e solução 7% de goma arábica, na proporção de 25% de óleo para 75% de goma (v:v); 2mL de tampão Fosfato 0,1M pH 7,0 e 1 mL de solução enzimática na concentração de 100mg.mL^{-1} de enzima. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada com adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1, v:v) e os ácidos graxos liberados titulados com solução de KOH 0,5N usando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar $1\mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto nas condições descritas (Paques et al. 2008).

2.3.2 Determinação de atividade esterásica por titulometria.

A atividade esterásica foi determinada utilizando 1mL do substrato triacetina, 7 mL de solução tampão fosfato 0,1M; pH7,0 e 1 mL do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 30 minutos em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada com adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1 v:v) e os ácidos graxos liberados titulados com solução de KOH 0,5N usando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade esterásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas (Paques et al., 2008).

2.3.3 Determinação da atividade esterásica utilizando substrato sintético

A atividade lipolítica do extrato bruto enzimático de sorgo e soja foi determinada espectrofotometricamente pela hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB). Foram adicionados 0,07 mL do sobrenadante do extrato bruto a 3,43 mL de uma solução contendo 1,12 mM de (*p*NPB), tampão fosfato 50mM, pH 7,0 triton X-100 0,2% (v:v) e tetrahidrofurano 0,43 M. As leituras de absorbância foram realizadas após 5, 15 e 30 minutos de reação a 405 nm. Uma unidade de atividade esterásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto por mL do sobrenadante, sob as condições especificadas. Foi preparada uma curva padrão, utilizando diferentes concentrações de *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) para ser utilizada na determinação da atividade enzimática (Pio e Macedo, 2007).

2.4 Concentração de proteínas com sulfato de amônio a 80%

Foi adicionado aos extratos brutos enzimáticos obtidos conforme o item 2.2, sulfato de amônio até a saturação de 80% (p/v) sob agitação, lenta e constante a 5°C. A mistura permaneceu por 10 horas a 4°C para total precipitação das proteínas. Após o período de decantação a mistura foi centrifugada a 10.000rpm por 40 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em pequenas quantidades de solução de CaCl₂ a 1X10⁻³M e dialisado também contra solução de CaCl₂ 1x10⁻³

³M, até total eliminação do sulfato de amônio. Ao término da diálise, o extrato obtido foi liofilizado e o pó obtido foi conservado em local protegido da luz e da umidade à temperatura de 0°C.

2.5 Concentração de proteínas utilizando acetona a 40%

Foi adicionado aos extratos brutos enzimáticos obtidos conforme o item 2.2, acetona à -18°C até a concentração de 40% (v/v) sob agitação lenta e constante. As misturas permaneceram por 10 horas a 4°C para total precipitação das proteínas. Após o período, as amostras foram centrifugadas a 2000xg sob refrigeração a 5°C por 40 min., para separação do precipitado. Os precipitados foram coletados, espalhados em uma placa de vidro, e colocados para evaporação do restante da acetona em geladeira a 4°C. Após o período, as amostras de pó cetônico foram coletadas e mantidas à -18°C, para posterior avaliação da atividade lipolítica.

2.6 Semipurificação fracionada com sulfato de amônio

Aos extratos brutos oriundos de sementes de soja e sorgo obtidos de acordo com o item 2.2, em ensaios distintos, foi adicionado sulfato de amônio até atingir a concentração de 20% (p/v) sob agitação constante e lenta. As misturas permaneceram por 7 horas a 4°C para total precipitação das proteínas. Após o período de decantação as misturas foram centrifugadas a 2000xg. por 40 min. a 4°C. Aos sobrenadantes foram adicionados sulfato de amônio para elevar a concentração a 40, 60, e 80% em ensaios distintos. Novamente, foi misturado, deixado em repouso e centrifugado nas mesmas condições detalhadas anteriormente. Os precipitados foram ressuspensos em pequenas quantidades de água destilada e dialisados contra solução de CaCl₂ a 1X10⁻³M até ausência de sulfato de amônio. Após o término da diálise foi medida a atividade esterásica.

3. Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os valores de atividade lipolítica relativa do extrato bruto das sementes de soja, sorgo e amêndoa de cacau (variedades crespo e liso), precipitado com sulfato de amônio a 80%, em diferentes substratos.

Tabela 1: Atividade lipolítica do extrato bruto das sementes de soja, sorgo e amêndoas de cacau, variedades crespo e liso, precipitado com sulfato de amônio a 80%.

Atividade Relativa (%)							
Variedades							
Substrato	Crespo	Liso	Crespo (após torrefação)	Liso após Torrefação	Soja	Sorgo	Lipase* comercial
Triacetina	82	100	-	-	100	100	8
Trioleína	100	33	-	-	-	-	100
Manteiga de cacau	12	-	-	-	-	-	89

* Lipase comercial (Novozyme) concentração 2mg/mL.

Observando a Tabela 1, nota-se que as enzimas lipolíticas das amêndoas de cacau apresentaram diferentes comportamentos. A enzima lipolítica da variedade de amêndoa de cacau crespa apresentou maior atividade em trioleína, enquanto que a da variedade de amêndoa de cacau lisa apresentou maior atividade em triacetina. Quando as amêndoas de cacau passaram pelo processo de torrefação, não foi mais observada atividade lipolítica, indicando que o processo inativou as enzimas.

As enzimas lipolíticas das sementes de soja e sorgo apresentaram atividade somente em triacetina. Segundo Enujiagha et al. (2004) e Borgston e Borckman (1984) geralmente as enzimas lipolíticas de sementes apresentam maior afinidade por ácidos graxos saturados de cadeia curta como acético, butírico e substratos fluorescentes com estrutura molecular de monoésteres. Segundo Borgston e Borckman (1984); Panda e Gowrishankar (2005); Singh, et al., (2006) enzimas lipolíticas que apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia

curta são classificadas como esterases. Desnuelle (1972) relata em seu trabalho que algumas lipases podem ter atividade esterásica, o que foi observado com a lipase de cacau de ambas as variedades.

Dentre as sementes avaliadas, foram escolhidos os grãos de soja e sorgo para um estudo mais aprofundado de suas enzimas lipolíticas. Com perspectiva de aplicação industrial dessas, uma vez que grãos de soja e sorgo são produzidos em abundância no Brasil, e foram os grãos que apresentaram maior atividade enzimática.

3.1 Estudo da semipurificação da esterase do extrato bruto de soja

A semipurificação, independente da fonte enzimática, tem por objetivo concentrar o conteúdo de proteínas, favorecendo o aumento da atividade enzimática, e possibilitando, assim, melhorar o estudo das propriedades físico-químicas da mesma. O procedimento de semipurificação pode ser realizado por meio de evaporadores a vácuo, por precipitação ou por ultrafiltração. A precipitação é uma forma simples de concentração da enzima que pode ser efetuada por adição de sais, solventes orgânicos, soluções de polímeros ou por alteração do pH (Bom et al., 2008). A forma que foi utilizada para precipitação da enzima, dependerá principalmente das características do meio a qual esta se encontra.

A precipitação com sulfato de amônio baseia-se na teoria do “salting out” onde é adicionada ao extrato de interesse uma grande quantidade de sal, deixando o meio com elevada força iônica. Dessa forma, as moléculas de água interagem mais fortemente com íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação inter-proteínas se tornam mais forte, diminuindo a solubilidade da mesma em meio aquoso, e, conseqüentemente ocorre à precipitação de proteínas (Lima et al. 2008). O sulfato de amônio é bastante utilizado como agente precipitante de proteínas, porém alguns estudos revelam que a concentração de enzimas com este sal pode causar um decréscimo da atividade enzimática.

No caso de enzimas lipolíticas de sementes a precipitação enzimática é geralmente realizada utilizando adição de sais ou solventes orgânicos ao meio contendo a enzima. No entanto, solventes orgânicos podem, em alguns casos, levar à inativação enzimática (Bom et al., 2008). Esterases e lipases de sementes de oleaginosas geralmente são precipitadas utilizando adição de sais de sulfato de amônio no meio (Yesiloglu e Baskurt, 2008; Sagioglu e Arabaci, 2005; Sana et al. 2004; Abigor et al., 2002; Kermasha e Voort, 1986).

Neste trabalho a precipitação da esterase de soja foi realizada com a adição de sal (sulfato de amônio) e com solvente (acetona). Os resultados de atividade esterase de soja precipitada com a adição de sulfato de amônio de forma fracionada encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade enzimática do extrato bruto da fração esterásica (EBFE) de semente de soja, semipurificado com sulfato de amônio de forma fracionada^{1, 2,3}.

Etapas de semipurificação	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
EBFE-0% sulfato de amônio	18,30±0,52 ^a	67,86±2,91 ^a	3,54±0,13 ^a	1	100
EBFE-20% sulfato de amônio	2,62±0,06 ^c	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^d	0	0
EBFE-40% sulfato de amônio	14,08±2,34 ^b	11,37±0,71 ^c	0,80±0,05 ^c	0,16	16,66
EBFE-60% sulfato de amônio	13,72±1,49 ^b	11,68±0,42 ^c	0,85±0,03 ^c	0,23	23,33
EBFE-80% sulfato de amônio	12,47±0,13 ^b	16,12±0,84 ^b	1,29±0,06 ^b	0,35	35,83

¹ Média de seis repetições com uma determinação cada±desvio padrão

² Médias acompanhadas de letras iguais, não diferem significativamente entre si para p≤0,05.

³ Substrato 4-*p*-nitrofenil-butirato (1,12Mm); tempo de reação 15 minutos.

Com base na Tabela 2 observa-se que a precipitação com sulfato de amônio levou a uma diminuição na atividade esterásica. Foi observada somente atividade da enzima a partir da precipitação com sulfato a 40%. Concentrações superiores do sal resultaram em aumento na atividade esterásica, porém essa elevação na atividade ainda foi inferior aos valores obtidos no extrato bruto sem

adição do sal ($3,54 \text{ U.mg}^{-1}$). Neste trabalho, o sulfato de amônio não demonstrou ser adequado para precipitação da esterase de soja.

Em relação ao teor de proteínas, o extrato bruto apresentou o maior valor ($18,30 \text{ mg. mL}^{-1}$), o extrato semipurificado obtido com 20% de saturação de sulfato de amônio continha $2,62 \text{ mg. mL}^{-1}$ de proteínas. Quando se elevou a saturação de sulfato de amônio para 40% houve também um aumento significativo no teor de proteínas precipitada. No entanto, utilizando-se concentrações maiores que 40% de saturação não houve aumento significativo no teor de proteínas.

Paques et al. (2008) estudou a concentração da lipase de resíduos do processamento de mamão formosa com acetona e sulfato de amônio e observou que a precipitação da enzima com sulfato de amônio fracionada ou 80% de saturação, promoveu uma intensa desnaturação enzimática, diminuindo a atividade lipolítica.

Não foi possível detectar atividade no extrato bruto de esterase de soja precipitado com acetona. Após o processo de precipitação, houve a formação de uma massa rígida insolúvel em água, inviabilizando a detecção da atividade da enzima, nesta condição.

Como nenhum dos reagentes utilizados para a concentração da esterase de soja demonstrou boa eficiência, optou-se em conduzir os demais experimentos concentrando o extrato bruto de soja somente pelo processo de liofilização.

Foi realizado um estudo da cinética de atividade da esterase de soja em relação ao tempo de reação, utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil butirato e os resultados encontram-se na Figura 1.

Através da Figura 1 observa-se um aumento na formação de produto (*p*-nitrofenil) por ação da esterase de soja, à medida que há um aumento no tempo de reação.

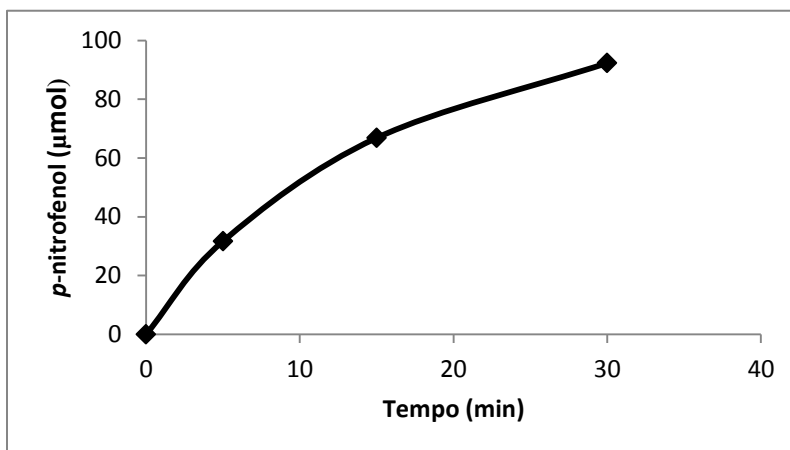


Figura 1: Cinética de atividade da esterase de soja em relação ao tempo de reação, utilizando-se *p*-nitrofenil butirato como substrato.

3.2 Estudo da semipurificação do extrato bruto de sorgo

Foi estudado a semipurificação da esterase de sorgo utilizando sulfato de amônio em diferentes % de saturação e acetona a 40% (v:v). Os resultados da atividade da esterase de sorgo semipurificada encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade enzimática do extrato bruto da fração esterásica (EBFE) de semente de sorgo, semipurificado com sulfato de amônio de forma fracionada e concentração por precipitação com acetona a 40%^{1, 2, 3}.

Etapas de semipurificação	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	Atividade total (U.mL ⁻¹)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
EBFE-0% sulfato de amônio	0,88±0,003 ^a	32,04±1,18 ^d	36,22±1,34 ^d	1	100
EBFE-40% sulfato de amônio	0,92±0,007 ^c	59,52±3,11 ^c	65,22±3,36 ^c	1,80	180
EBFE-60% sulfato de amônio	0,94±0,01 ^b	177,78±10,11 ^a	188,30±10,76 ^a	2,89	519
EBFE-80% sulfato de amônio	1,08±0,006 ^b	121,70±4,47 ^b	113,55±4,13 ^b	1,74	313
EBFE-40% acetona	1,08±0,00 ^b	34,64±1,57 ^d	31,53±1,45 ^d	0,88	88

¹Média de seis repetições com uma determinação cada±desvio padrão

²Médias acompanhadas de letras iguais, não diferem significativamente entre si para p≤0,05.

³ Substrato 4-*p*-nitrofenil-butilato (1,12Mm); tempo de reação 15 minutos.

Observando os resultados da Tabela 3, nota-se que houve um aumento significativo na atividade da enzima, quando esta foi semipurificada com sulfato de amônio. O maior valor de atividade específica ($188,30 \text{ U.mg}^{-1}$) foi observado no extrato bruto semipurificado com sulfato de amônio a 60% de saturação. Quando a enzima foi concentrada com sulfato de amônio a 80% de saturação observou-se um decréscimo na atividade da enzima ($113,55 \text{ U.mg}^{-1}$).

Abigor et al. (2002) utilizaram sulfato de amônio a 60 e 80% de saturação para semipurificação de esterase de semente de pinhão manso. Os autores observaram que em sulfato de amônio a 60% de saturação a atividade esterásica foi de $8,14 \text{ U.mL}^{-1}$ e a atividade específica $0,58 \text{ U.mg}^{-1}$; em sulfato de amônio a 80% de saturação constataram um aumento na atividade $13,34 \text{ U.mL}^{-1}$ e atividade específica $1,40 \text{ U.mg}^{-1}$. Diferente deste trabalho, quando a concentração de sulfato foi elevada para 80% de saturação, observou-se um decréscimo de atividade da enzima.

Yesiloglu e Baskurt (2008) estudaram a semipurificação de lipase de sementes de amêndoa e observaram um aumento da atividade com o aumento da concentração de sulfato de amônio ao extrato contendo a enzima, atingindo o máximo de atividade com 90% de saturação do sal. No caso do extrato bruto de sorgo estudado neste trabalho, a saturação de 60% de sulfato de amônio foi suficiente para purificação parcial da enzima. Em concentrações superiores do sal, observou-se um decréscimo na atividade enzimática.

Quando acetona a 40% (v:v) foi utilizada como agente precipitante, pode-se verificar que houve um aumento significativo no teor de proteínas, porém o mesmo não foi observado para a atividade enzimática, quando comparado com o extrato bruto. Neste caso a adição de acetona ao extrato enzimático não resultou em um aumento na atividade esterásica. Provavelmente, a acetona provocou inativação parcial da enzima. Segundo Freire et al., (2008) acetona é bastante utilizada para concentração de enzimas de interesse, no entanto, este composto pode causar inativação enzimática em alguns casos.

Sendo assim, tanto pelo teor de proteínas como pela atividade enzimática (U.mL^{-1}) e específica (U.mg^{-1}) a melhor concentração de sulfato de amônio para parcial purificação da esterase de sorgo foi de 60% de saturação.

Foi realizado um estudo da cinética de atividade da esterase de sorgo em relação ao tempo de reação (Figura 2).

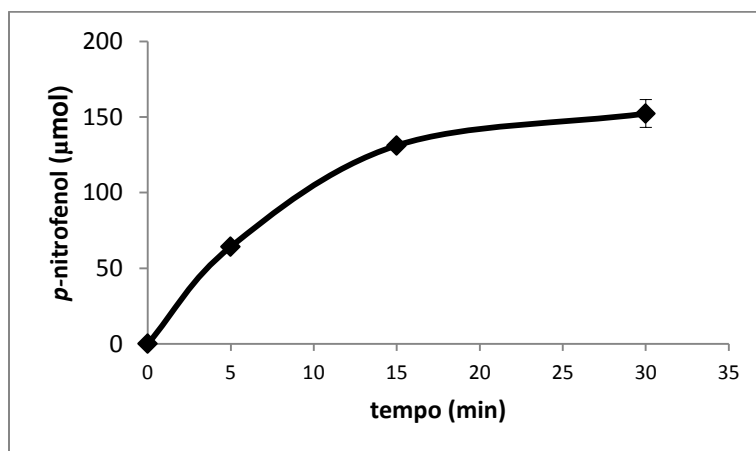


Figura 2: Cinética de atividade da esterase de sorgo em relação ao tempo de reação utilizando-se *p*-nitrofenil butirato como substrato.

Foi realizado um estudo para verificar a melhor solução para a extração da esterase de soja. Os resultados encontram-se nas Figuras 3 e 4.

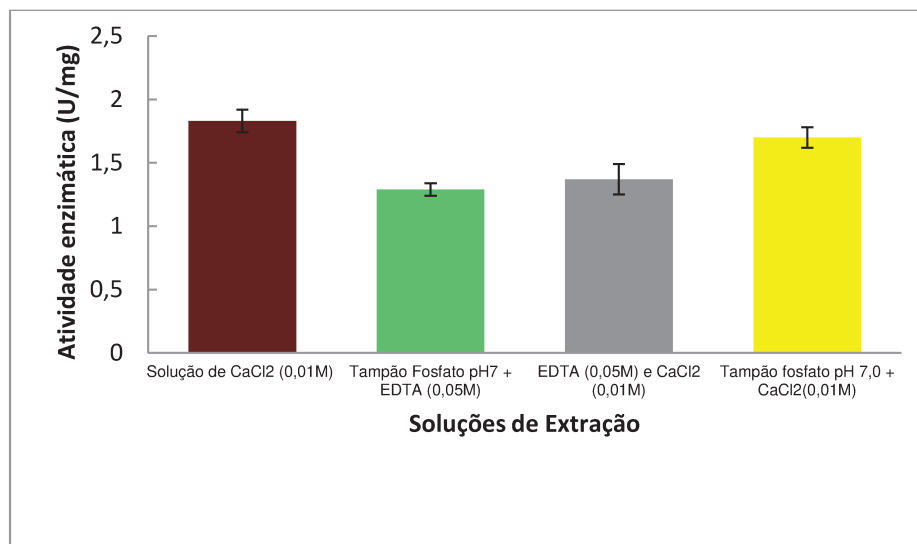


Figura 3: Extração de esterase de sementes de soja utilizando diferentes soluções de tampão e sais.

A esterase de soja apresentou maior atividade quando extraída com solução 0,01M de CaCl_2 ($1,83 \text{ U.mg}^{-1}$) e em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 adicionado de cálcio 0,01M ($1,7 \text{ U.mg}^{-1}$). Segundo Kermasha and van de Voort (1986) íons de cálcio auxiliam na extração da enzima que, por sua vez, pode estar ligada a parede da celular.

Observou-se também que a solução de CaCl_2 (0,01M) extraiu maior concentração de proteína das sementes de soja (Figura 2).

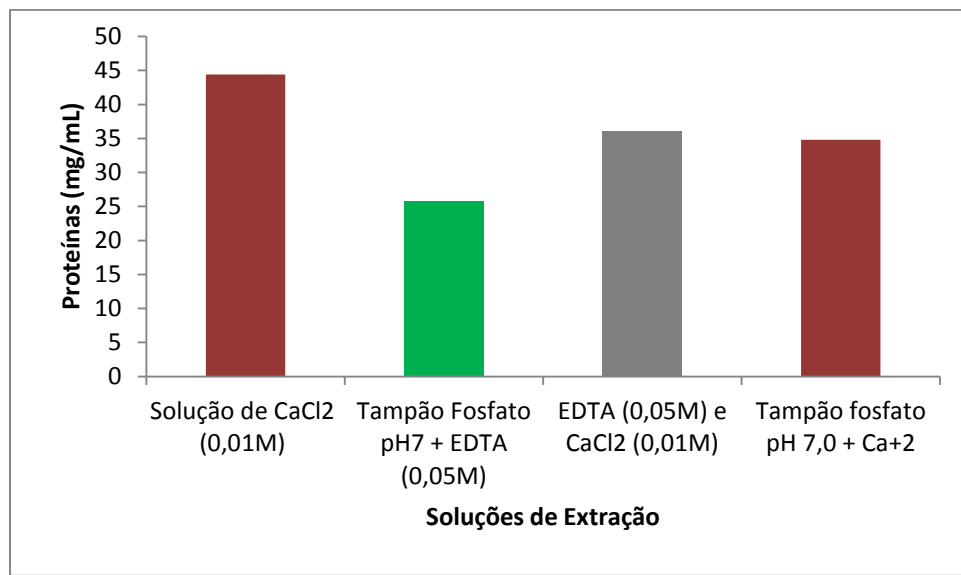


Figura 4: Extração de proteínas de soja utilizando-se diferentes soluções tampão e sais.

4. Conclusão

As sementes de soja e sorgo apresentaram uma expressiva atividade de esterase, respectivamente. Mais estudos são necessários para avaliar as características bioquímicas destas enzimas, para verificar possível potencial de aplicação industrial. As amêndoas de cacau apresentaram atividade de esterase e lipase, estas enzimas podem não ser promissoras para aplicação comercial, porém é de grande interesse tecnológico estudar as características bioquímicas destas enzimas, uma vez que, podem trazer problemas durante o processo de obtenção de produtos derivados do cacau.

Referências

- Abigor R. D., Uadia P. O., Foglia T. A., Haas M. J., Scott K. and Savary B. J., Partial Purification and Properties of Lipase From Germinating Seeds of *Jatropha curcas* L., **Journal of the American Oil chemist's Society**, v.79, p. 1123-1127, 2002.
- Barros, M.; Fleuri, L.F.; Macedo, G.A. Seed lipase: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 15-29, 2010.
- Bhardwaj K., Raju A. and Rajasekharan R., Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (Phospho) lipase family, **Plant Physiology**, v.127, p. 1728-1732, 2001.
- Borgston, B.; Brockman H. L., Lipases. Amsterdam, Elsevier (1984).
- Freire, G.D.M.; Castilho, F. L. R. Lipases em Biocatálise. pp. 369-385. In: Enzimas em biotecnologia produção, aplicação e mercado. Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML (ed). Interciências, Rio de Janeiro, BR, 2008.
- Enujiugha V. N., Thani F. A., Sanni T. M. and Abigor R. D., Lipase Activity in dormant seeds of the african oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth), **Food Chemistry**, v.88, p.405-408, 2004.
- Huang, A. C.; Moreau R. A., Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination, **Planta**, v. 141, p. 111-117, 1978.
- Kermasha. S.; Van de Voort F. R., Characterization of french bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 19, p. 23 - 28 1986.
- Paques, F. W.; Pio, T. F.; Carvalho, P. de Oliveira; Macedo, A. G. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 20-27, 2008.
- Panda, T.; Gowrishankar, B.S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 160-169, 2005.
- Pio, T. F.; Macedo, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 41, p. 613-619, 2007.
- Rakhimov M. M., Dzhanbaeva N. R. and Yuldashev P. K., Specificity the lipase of cottonseed. **Chemical of the Natural Compounds**, v. 6, p. 616-620, 1970.

Paques, F. W., Pio, T. F., Carvalho, P. O., Macedo, G. A. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues. **Brazilian Journal of Technology**, v. 11, p. 20-27, 2008.

Rose, D. J.; Pike O. A., A Simple method to measure lipase activity in wheat and wheat bran as an estimation of storage quality. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 83, p. 415 -520, 2006.

Sadeghipour H. R.; Bhatla S. C., Light-enhanced oil body mobilization in sunflower seedlings accompanies faster protease action on oleosins, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 309-315, 2003.

Sagiroglu A.; Arabaci N., Purification and characterization of lipase from sunflower seed, **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 35, p. 37-42, 2005.

Sammaour, R. H., Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipidbody linseedlings, **Turkish Journal of Botany**, v. 29, p. 177-181, 2005.

Sana N. K., Hossin I., Haque E. M. and Shaha R. K., Identification, purification and characterization of lipase from germinating oil seeds (*Brassica napus* L.), **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 246-255, 2004.

Singh, R.; Gupta, N.; Goswami, V.K.; Gupta, R.S. Simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 70, p.679-682, 2006.

Yesiloglu, Y.; Baskurt L., Partial purification and characterization of almond seed lipase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.38, p. 397-402, 2008.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESTERASES DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* L.) E SORGO (*Sorghum bicolor* L.)

Este capítulo está dividido em três partes 3.1; 3.2 e 3.3. O 3.1 corresponde ao estudo da caracterização bioquímica da esterase de semente de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). O item 3.2 descreve o estudo de caracterização bioquímica da esterase de soja (*Glycine max* L.) e seu potencial biocatalítico. O item 3.3 descreve o estudo da maximização da atividade da esterase de semente de soja (*Glycine max* L.) por delineamento experimental.

3.1 Biochemical properties of the esterase from sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seed

Barros, M. and Macedo, G. A.

Abstract

The esterase was extracted from sorghum seeds and some of its biochemical properties determined using synthetic substrates (*p*-nitrophenyl butyrate, caprylate, laurate and palmitate). The enzyme presented optimum activity at pH 8.0 and was stable at all the pH ranges studied. The optimum temperature for activity was 40°C but it showed low stability at this temperature (40% relative activity). The values for K_m and V_{max} were 0.67mM/min and 125 U.mg⁻¹, respectively. The enzyme showed an increase in activity when K₂HPO₄ was added to the reaction medium, but the ions Mn²⁺, CO⁺, Hg⁺ and Fe²⁺ strongly inhibited enzyme activity.

Keywords: esterase, sorghum (*Sorghum bicolor*), ions, activators and inhibitors.

1. Introduction

Esterases belong to the group of hydrolases (carboxylester hydrolases; EC. 3.1.1.1). They catalyze the formation or cleavage of ester bonds in water-soluble substrates. Similar to lipase, the acyl-enzyme complex is formed via a serine residue within the active site. Due to their easy availability they are of interest for application in industrial processes. Esterases and lipases may improve the quality or accelerate the maturation of cheeses, cured bacon and fermented sausages. The esterases are also widely used in the resolution of racemic mixtures of compounds in order to produce pure enantiomers (Houd, Kademi e Leblanc, 2004; Singh et al., 2006; Fahmy et al., 2008; Er-Zheng , Peng-yong and Dong-zhi, 2010).

Esterases can be of animal (pancreatic, hepatic and gastric), microbial (bacterial, fungal and yeast) or vegetable origin, with variations in their catalytic properties (Mukherjee and Hills, 1994; Mohamed et al., 2000; Barros, Fleuri and Macedo, 2010). Nevertheless, despite the extensive range of microbial esterases, the possibility of using of these enzymes on an industrial scale has resulted in a search for other sources of these enzymes (Parques and Macedo 2006).

Recently, seed esterases and lipases have been the focus of much attention as biocatalysts. In some cases, these enzymes present advantages over animal and microbial lipases due to some quite interesting features such as specificity and low cost, being a great alternative for the potential commercial exploitation as industrial enzymes (Barros, Fleuri and Macedo, 2010; Tuter et al., 2003).

Several studies have been carried out using seed lipases and esterases. A partially purified raw extract of *Nigella sativa* L. was used as a source of lipase for enriching borage oil with gamma-linolenic fatty acid by interesterification (Tuter et al., 2003). Fahmy et al. (2008) studied the biochemical characteristics of the esterase from *Cucurbita pepo* cv. The authors observed that this enzyme had some interesting characteristics such as high stability, an alkaline pH optimum and high affinity towards short-chain esters, a characteristic they share with some microbial esterases used in the maturation and flavor development of cheeses, such as *Lactobacillus* sp. esterases.

Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is the fifth most produced cereal throughout the world, after wheat, rice, corn and barley. It is widely used as animal feed and has also been studied by some researchers as an alternative to replace barley malt. Nwanguma, Eze and Ezengwa, (1996) detected lipolytic activity in non-germinated sorghum seeds during grain malting and mashing. The authors observed a slight decrease in enzyme activity during steeping for 24 hours, but it increased several fold during the course of germination. Between 24 and 60% of the lipolytic activity was retained after cooking at 48°C, but no activity was found after mashing at 65°C. About 68% of the lipase activity of 72h old malt was detected in the plumule, while 29% and 3% were found in the endosperm and radicle, respectively.

No study has been carried out to characterize the physicochemical properties of the lipolytic enzyme present in sorghum grains, to date only the presence of lipolytic activity was determined. The present study aimed to observe and quantify the presence of esterase activity in non-germinated and post germination sorghum seeds, assess the specificity and study the biochemical characteristics of the crude esterase.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

The sorghum seeds studied were donated by *VITAO Polinutri Industry LTDA*, Brazil, and the commercial lipase used was Lipozyme TLIM obtained from *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes®). The concentration of commercial lipase used was 2mg.mL^{-1} . The substrates *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB), *p*-nitrophenyl caprylate (pNPC), *p*-nitrophenyl-laurate (pNPL) and *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO). Triacetin and triolein were obtained from Fluka (Switzerland) and the other chemicals were of analytical grade.

2.2 Esterase extraction

The esterase was extracted from the sorghum using a modification of the procedure described by Aizono et al. (1973). Non-germinated and post germination seeds were suspended in $1 \times 10^{-3}\text{M}$ CaCl_2 solution and blended for 3 min at 4°C in a waring blender. The sample was transferred to a conical flask, stirred mechanically at 4°C for 30min and then subjected to ultrasound (125W at 200 kHz) for 1 min in an effort to release the bound enzyme. The resulting suspension was centrifuged at $2000 \times g$ for 45min at 5°C , and the supernatant collected and cooled to 0°C . Solid ammonium sulphate was added with constant stirring to obtain 60% saturation. The resulting precipitate was separated by centrifugation at $2000 \times g$ for 45 min and then resuspended in a minimum amount of $1 \times 10^{-3}\text{M}$ CaCl_2 solution. The CaCl_2 suspension was dialyzed against the same solution at 4°C until all traces of ammonium sulfate had been removed, and then re-centrifuged to eliminate any insoluble material (Kermasha and van de Voort, 1986). The resulting purified extract was then assayed for its protein content using the modified Bradford (1976) method.

Sorghum post germination grains were germinated for a period of 24 h in the dark, after soaking at room temperature for 24h.

2.3 Enzyme Assay

Esterase activity was determined spectrophotometrically following the hydrolysis at 405nm of *p*-nitrophenyl-butyrate (pNPB) as the substrate. An aliquot (0.070 mL) of the purified enzyme extract was added to 3.43 mL of a reaction mixture with the following composition: 1.12 mM pNPB dissolved in 50mM phosphate buffer, pH 7.0, also containing 0.2% (N/P) Triton X-100 and 0.42 M tetrahydrofuran. The enzymatic activity was determined for a period of 5 min at 37°C, determining the absorption at one minute intervals against a blank solution. One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme required to release one micromole of *p*-nitrophenol per minute under the standard assay conditions (Macedo and Pio, 2005).

The esterase activity was also determined by a titrimetric method using triacetin and triolein as the substrates. One milliliter of the purified enzyme extract was added to a reaction mixture with the following composition: 5mL of 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, and 1mL of triacetin. The solution was incubated at 37°C for 6h with shaking at 120 rpm. After incubation, the reaction was stopped by adding 15mL ethanol:acetone 1:1 (v/v), and the fatty acids released were titrated with 0.05 M sodium hydroxide. One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme required to release one μ mol of oleic acid per minute per mL under the specified conditions (Paques et al., 2008).

The substrate specificity of the enzyme was determined under the standard assay conditions described above. Several *p*-nitrophenyl-esters were analyzed: *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB), *p*-nitrophenyl caprylate (pNPC), *p*-nitrophenyl laurate (pNPL) and *p*-nitrophenyl-palmitate (pNPP). The specificity was also tested using different triacylglycerols (triacetin, tributyrin, tricaproyn, tripalmistin and triolein) by titration with NaOH as described previously.

2.4 Optimum temperature and heat stability

The effect of temperature on the esterase activity was studied by carrying out assays at different temperatures in the range from 30-90°C at pH7.0, obtained using 0.1M phosphate buffer.

The heat stability of the esterase was tested by pre-incubating the enzyme for 1h at different temperatures ranging from 30 to 60°C. After the pre-incubation, the residual activity was measured at 37°C and expressed as a percentage of the relative esterase activity.

2.5 pH optimum and stability

The optimum pH for esterase activity was determined using 0.1M acetate buffers in the range from pH 3.6 to 5.6, 0.1M phosphate buffers from pH 6.0 to 7.0, 0.1M Tris-HCl buffers from pH 7.2 to 9.0 and 0.1M borax-NaOH buffers from pH 9.5 to 10.0.

The pH stability was evaluated by incubating the enzyme with different buffers at pH values ranging from 3.6 to 10.0 for 24h at room temperature. After incubation, the residual activity was determined (37°C, phosphate buffer pH 7) and expressed as a percentage of the relative esterase activity. All the tests were carried out in duplicate.

2.6 Effect of salts and chemical agents

The effects of different salts (CaCl_2 , KCl_2 , HgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NaNO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , Na_2SO_4 , NaHSO_3 , HgCl_2 , NaH_2SO_4 , CuSO_4 and NaCl_2) on the esterase activity were studied. The salts were added to the reaction buffer at concentrations of 1 and 10 mM. The relative activity was expressed as a percentage of the relative esterase activity as measured in the reactive medium without the added salts. The effects of different chemical agents (EDTA, urea, sodium lauryl sulphate, sodium bisulphate, glutathione (reduced), ascorbic acid, sodium citrate, cysteine, Tris and sodium persulfate) were also evaluated at concentrations of 1 and 10mM.

2.7 Statistical analysis

The data from the experiments are presented as the mean $\pm$ standard error (SEM), and were analyzed by a one way analysis of variance (ANOVA), with the differences analyzed by the Tukey test at level of 5% probability (SAS version 9.2 – Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results and Discussion

It was obtained esterase activity only in the non-germinated (dormant) seed of the *Sorghum bicolor*.

3.1 Study of the specificity of the sorghum esterase

The specificity of the sorghum esterase was studied using different substrates and the results are shown in Figure 1.

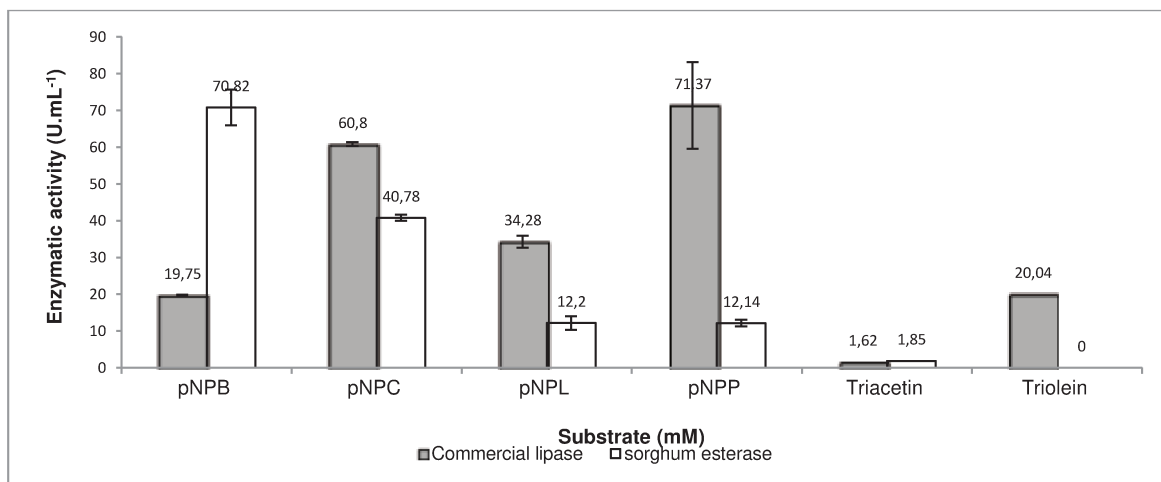


Figure 1: Activity of sorghum esterase and commercial lipase (*Thermomyces lanuginosu*) on different substrates.

The highest value for activity was observed with pNPB (70 U.mL⁻¹) after 30 minutes of reaction, with pNPC in second place, the maximum activity being 40.78U.mL⁻¹. The preference of the sorghum esterase for the substrates tested was in the following order: pNPB> pNPC>pNPL>pNPP. According to Marten et al.

(2006) and Osborn and Akoh (2002), fatty acids with 2 to 6 carbons in their structure are classified as short chain fatty acids, for example butyric acid (4 carbons), and fatty acids containing from 6 to 12 carbons are classified as medium chain fatty acids (e.g. caprylic acid). The sorghum esterase showed an affinity for short chain fatty acids, this being the expected behavior for an esterase.

Kubicka et al. (2000) evaluated the activity of barley esterase and detected greater affinity for short chain fatty acids, especially for acetic acid esters. Liaquat and Apenten (2000) studied the syntheses of different esters by the lipase from corn seeds and observed the preferential hydrolysis of short chain fatty acids by the enzyme in the following order: acetic acid (2C) > butyric acid (4C) > caproic acid (6C), in an organic medium using isopentanol, after 72 hours of reaction.

Pollizeli, Tiera and Bonilla-Rodriguez (2008), studying lipase from the seeds of *P. aquatica* with 90 minutes of reaction time, found the following values for activity – 2.5; 5 and 4.5 U.mL⁻¹ in (pNPB), pNPC and pNPP respectively, values inferior to those found in the present study. In addition the activity of the sorghum esterase was evaluated in triacetin and triolein and presented greater activity in triacetin.

3.2 Effect of temperature and pH on the activity and stability of sorghum esterase

The temperature showed a considerable influence on the reaction velocity of the enzyme due to various factors. It can affect the stability of the enzyme and the velocity with which the enzyme-substrate complex breaks up, which is determined by the temperature of the reaction medium and the affinity between the enzyme and the substrate.

Figure 2 shows the effect of temperature on the activity of the sorghum esterase.

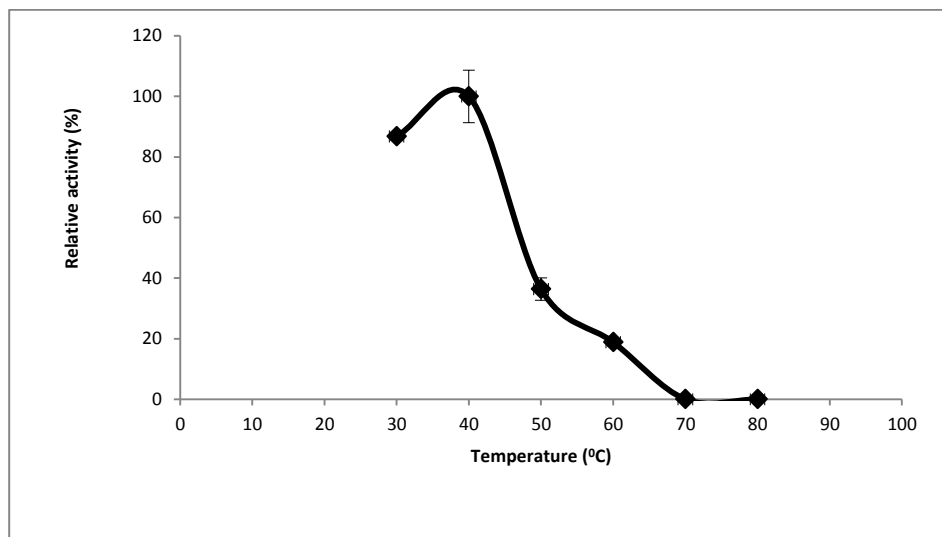


Figure 2: Optimum temperature for the activity of sorghum esterase.

The greatest value for the activity of the sorghum esterase was at a temperature of 40°C, and at temperatures above 40°C there was a significant decrease in enzyme activity. Staubmann et al. (1999), studying the esterase from a physic nut (*J. curcas* L.) observed optimal activity at 50°C in a substrate of (pNPB). The lipase from the kapok tree nut (*P. aquatica* Bombacaceae), studied by Polizelli et al (2008), showed optimum activity at 40°C using pNPP as the substrate, and Isbilir, Ozan and Yagar (2008), studying the lipase from bay seeds (*L. nobilis* L.) found the optimum activity at 50°C in triolein.

About to stability, the sorghum esterase was more stable at 30°C. Although the enzyme showed its greatest activity at 40°C, at this temperature it only presented 40% of residual activity after one hour of incubation. Figure 3 shows thermostability of the sorghum esterase.

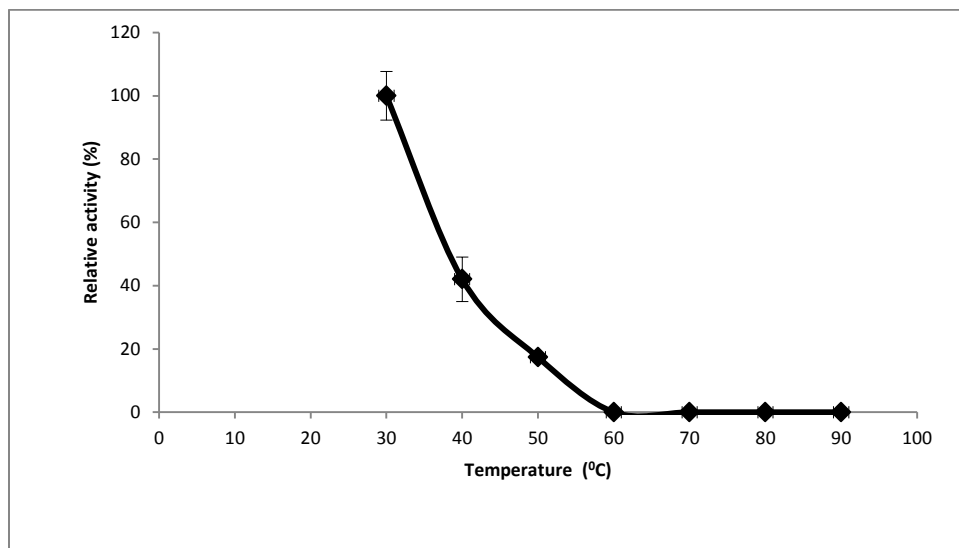


Figure 3: Effect of temperature on the stability of the sorghum seed esterase

3.3 Effect of pH on the activity and stability of the enzyme

Figure 4 shows the effect of pH for the activity of sorghum esterase.

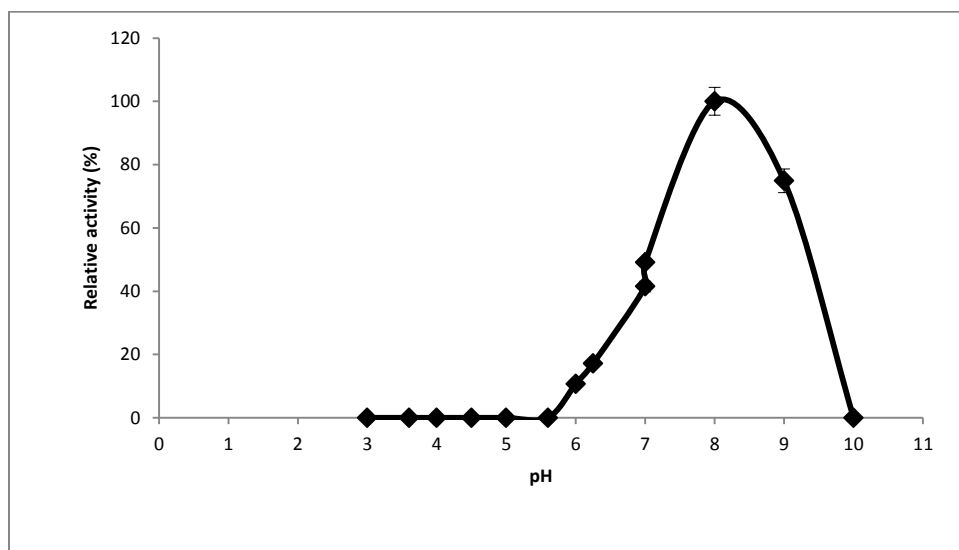


Figure 4: Effect of pH on the activity of the sorghum seed esterase

The sorghum esterase showed its greatest activity at pH 8.0, similar to the soybean esterase, and is thus an alkaline enzyme. This value is similar to that shown by the esterases from physic nut (*J. curcas*) studied by Staubmann et al. (1999) and by Abigor et al. (2002), and by the bay seed lipase (*J. curcas*) studied by Isbilir, Ozcan and Yagar (2008), which showed their maximum activities at pH 7.5.

About to pH stability, the sorghum esterase was stable at all the pH values studied, as shown in Figure 5.

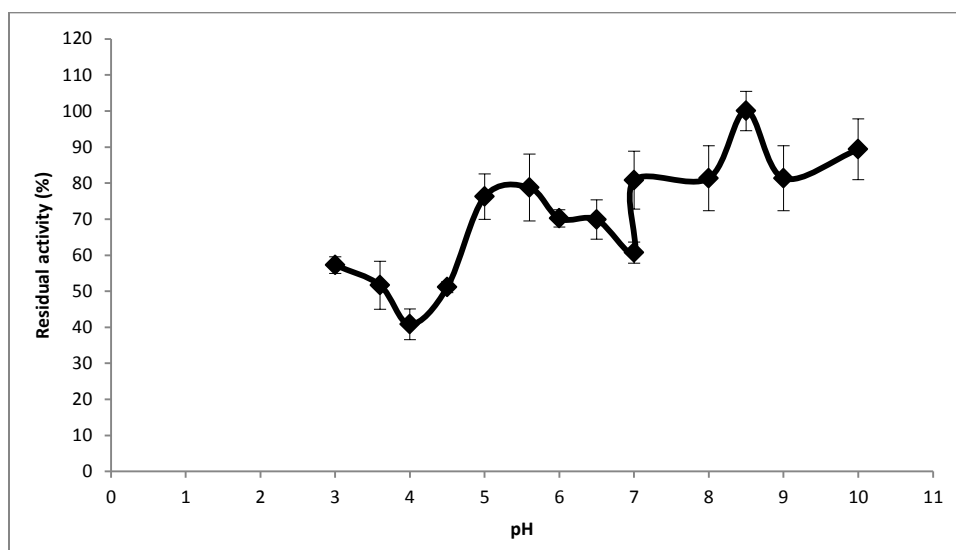


Figure 5: Effect of pH on the stability of the sorghum seed esterase

The sorghum esterase showed its greatest stability at pH 8.5, but did not show significant difference between the values found at the pH values (Tris-HCl) of 7, 8 and 9. The lowest value for residual activity was found at pH 4, with only 40% of residual activity. The sorghum esterase was shown to be stable at all the pH values studied.

3.4 Effect of salts and some activators and inhibitors on the activity of the freeze-dried enzyme

The effect of salts and of some activators and inhibitors on the activity of sorghum esterase was tested, and the results can be seen in Tables 1 and 2.

Table 1: The effect of different salts on the activity of sorghum esterase^{1, 2}

Salts	Final concentration (1mM)	Final concentration (10mM)
	Relative activity (%)	Relative activity (%)
Control	100±2.42 ^{bcde}	100±2.42 ^{bcde}
K ₂ HPO ₄	95.50±5.66 ^{bcdef}	130.77±6.02 ^a
NaNO ₃	111.29±8.67 ^{ab}	111.47±9.87 ^{ab}
Mn Cl ₂	84.91±3.79 ^{def}	109.05±7.90 ^{b^c}
CaCl ₂	106.32±1.03 ^{bc}	105.70±3.05 ^{bcd}
Fe ₂ SO ₄	102.99±6.54 ^{bcde}	0.0 ^h
Na ₂ SO ₄	88.95±4.07 ^{cdef}	101.48±11.04 ^{bcde}
KCl ₂	91.45±5.71 ^{bcdef}	98.71±7.16 ^{bcde}
K ₂ SO ₄	75.42±2.13 ^f	93.81±8.55 ^{bcdef}
MnSO ₄	90.28±7.11 ^{cdef}	0.0 ^h
CoCl ₂	83.64±4.18 ^{ef}	0.0 ^h
MgSO ₄	83.18±2.98 ^{ef}	75.33±9.82 ^f
ZnSO ₄	52.75±10.23 ^g	0.0 ^h
HgCl	0.0 ^h	0.0 ^h

¹Mean of four repetitions with one determination each ± standard deviation

²Means accompanied by the same letters do not differ significantly at p≥0.05.

Of the salts studied in this trial, the only one that favored an increase in enzyme activity was potassium phosphate (K₂HPO₄) at a concentration of 10mM. However, the salts CoCl₂⁺, HgCl and Fe₂SO₄ strongly inhibited the enzyme activity. The same occurred with the lipase from the kapok tree nut (*Pachira aquatica*) studied by Polizelli et al. (2008).

For the esterase of physic nut (*Jatropha. curcas*) studied by Staubmam et al. (1999) only BaCO₃, at a concentration of 10mM showed a positive effect on the enzyme activity. The author mentioned that the ions K²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺ frequently showed a positive effect on esterase activity, but this was not observed

with the physic nut esterase. However in the present study potassium did have a positive effect on the enzyme activity.

Isbilir, Ozcan and Yagar(2008), studying the lipase from bay seeds (*Laurus nobilis* L.) observed a significant increase in enzyme activity in the presence of the ions Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} in the reaction medium, results similar to those observed for the lipase from almond seeds (*Amygdalus communis* L.). The lipase from Kapok seeds (*P. aquatica*) also showed an increase in activity in the presence of the ions Ca^{2+} and Mg^{2+} .

Table 9 shows the effect of some activators and inhibitors on the activity of the esterase from sorghum seeds.

Table 2: Effect of activators and inhibitors on the activity of sorghum esterase^{1,2}

Chemical agentes	Final concentration (1mM)	Final concentration (10mM)
	Relative activity (%)	Relative activity (%)
Control	100±5.33 ^{bc}	100±5.33 ^{bc}
Urea	105.04±11.67 ^{ab}	120.80±11.46 ^a
Sodium citrate	87.39±3.18 ^{bcde}	90.67±3.40 ^{bcd}
EDTA	85.74±9.89 ^{cde}	69.14±0.35 ^{efgh}
Reduced glutathione	79.82±4.68 ^{def}	0.0 ^j
Sodium bisulfate	75.37±5.56 ^{defg}	0.0 ^j
L-cysteine	69.58±7.68 ^{efgh}	0.0 ^j
Ammonium persulfate	64.28±3.55 ^{fgh}	35.09±5.58 ⁱ
TRIS	63.00±1.60 ^{fgh}	101.68±9.65 ^{bc}
Ascorbic acid	60.80±2.33 ^{gh}	56.36±7.07 ^h

¹Means of four repetitions with one determination each ± standard deviation

²Means accompanied by the same letters do not differ significantly at $p \geq 0.05$.

Of the compounds examined, only urea showed a positive effect on the enzyme activity, and the compounds reduced glutathione, sodium bisulfate and L-cysteine at a concentration of 10mM inhibited the enzyme activity. Polizelli et al (2008), studying the effects of some chemical compounds on the activity of the

lipase from the kapok tree nut (*Pachira aquatica*) also observed the negative effect of reduced glutathione at a concentration of 10mM.

The values for K_m and V_{max} of the enzyme were be 0.67mM (*p*NPB) and 125 U.mg⁻¹, respectively (Figure 5).

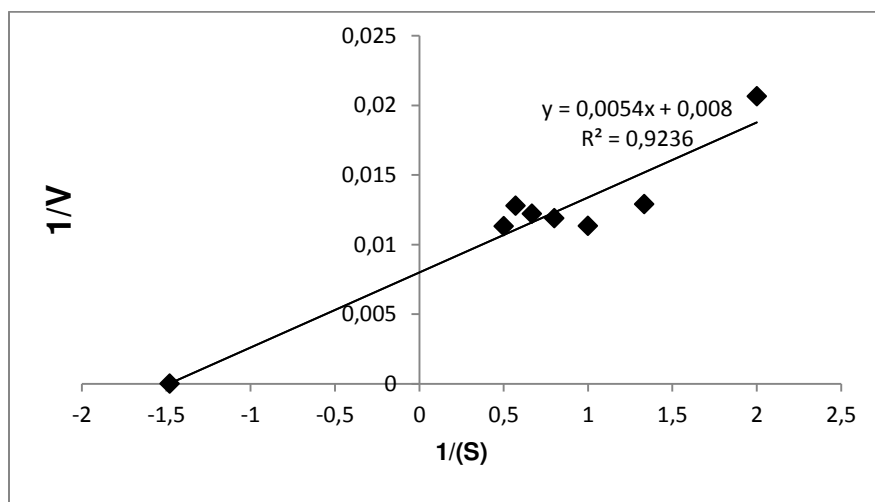


Figure 6: Graphic determination of K_m and V_{max} values of the sorghum esterase, using *p*-nitrophenyl butyrate as substrate, according to the method of Liner Weaver-Burk.

The effect of the surfactant Triton X-100 on the activity of the sorghum esterase was also examined (Figure 7).

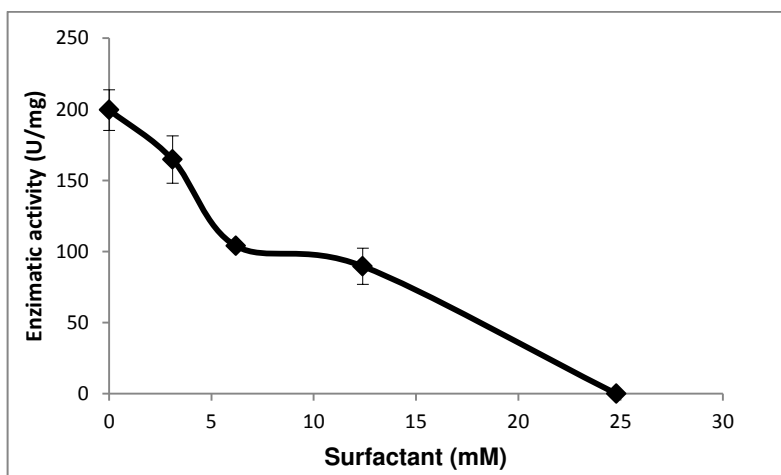


Figure 7: Effect of the concentration of the surfactant Triton X-100 on the activity of sorghum esterase

It can be seen that the surfactant Triton X-100 had a negative effect on the enzyme activity. The reaction medium containing no surfactant presented enzyme activity of 199.53U.mL^{-1} , whereas with 3.10mM of surfactant it decreased significantly to 164.62U.mg^{-1} , and as the concentration of the surfactant increased so the esterase activity decreased until completely inhibited.

Plou et al. (1998) studied the effect of surfactant (Tween 80) on the activities of lipase and esterase. They observed that the surfactant strongly inhibited the activities of the esterases studied (rabbit and pig liver esterases) but favored the activity of the majority of lipases studied. Polizelli et al. (2008) also studied the effect of different surfactants, including Triton X-100 and Tween 80, on the activity of the lipase from the oilseed of *Pachira aquatica*, and observed a negative effect of both on the enzyme activity, the effect becoming increasingly negative with increasing concentrations of the surfactants.

References

- Abigor, R. D.; Uadia, P. O.; Foglia, T. A.; Haas, M. J.; Scott, K.; Savary, B. J. Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal American of Chemical Society**, v.79, 1123-1126, (2002).
- Barros, M., Fleuri, L.F., Macedo, G.A. Seed lipase: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 15-29, 2010.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- Fahmy, A.S.; Abo-Zeid, A.Z.; Mohamed, T.M.; Ghanem, H.M.; Borai, I.H.; Mohamed, S.A. Characterization of esterases from *Cucurbita pepo* cv. Eskandrani. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 437-443, 2008.
- Er-zheng, Y. Z.; Peng-yong, Y.; Dong-zhi, W.; 2010. Lipase in the castor bean of Chinese comparison, purification and characterization. **Journal Shanghai University (Engl. Ed.)**, v.14, p. 137-144, 2010.
- Houd, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.
- Isbilir, S. S.; Ozcan, M. H.; Yagar, H. Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds. **Journal American of Chemical Society**, v. 85, 227-233 (2008).
- Kermasha, S.; van de Voort, F. R. Characterization of french bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v.19, p. 23-27, 1986.
- Kubicka, E.; Grabska, J.; Jedrychowski, L.; Czyz, B. Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 301-304, 2000.
- Macedo, G. A., Pio, T. F. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 388-394, 2005.
- Marten, B. Pfeuffer, M.; Scherezenmeir, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, v.16, p.1374-1382, 2006.

Mohamed, M. A.; Mohamed, T. M.; Mohamed, S. A.; Fahmy, A. S.; Distribution of lipases in the graminae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 227-234, 2000.

Mukherjee, K.D., Hills, M.J.N. Lipases from plants, in: Wooley, P., Peterson, S.B. (Eds), Lipases – their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, England, pp. 271-288, 1994.

Nwanguma, B. C.; Eze, M. O.; Ezengwa, O. O. Changes in activity of sorghum lipase malting and mashing. **Journal of Institute of Brewing**, v.102, p. 39-41 1996.

Osborn, H. T; Akoh, C. C. Structure lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 3, p. 110-120, 2002.

Paques, F.W.; Macedo, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações indústrias. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.

Paques, F. W.; Pio, T. F.; Carvalho, P. O.; Macedo, G. A. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues. **Brazilian Journal of Technology**, v. 11, p. 20-27, 2008.

Plou, F. J.; Ferrera, M.; Nuerob, O. M.; Calvoa, M. V.; Alcalde, M.; Reyes, F.; Ballesteros, A. Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 183–186, 1998.

Polizelli, P.; Fracchini, F. A.; Cabral, H.; Bonilla-Rodriguez, G. O. A new lipase isolated from oleaginous seeds *Pachira aquatica* (Bombacaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, p. 233-242, 2008.

Polizelli, P. P.; Tiera, M. J.; Bonilla-Rodriguez, G. O. Effect of surfactant and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase form oilseed of *Pachira aquatic*. **Journal American of Chemical Societ**. v. 85, p. 749-753, 2008.

Singh, R.; Gupta, N.; Goswami, V. K.; Gupta, R. S. Simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 679-682, 2006.

Staubmann, R.; Ncube, I.; Gübitz, G. M.; Steiner, W.; Read, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.

Tuter M., Secundo F., Riva S., Aksoy H. A. and Ustun, G., Partial Purification of *Nigella sativa* L. Seed Lipase and Its Application in Transesterification Reactions. **Journal of American Oils Chemists' Society**, v. 80, p. 43-49, 2003.

3.2 Biochemical Characterization and Biocatalytic potential of Esterase from Brazilian *Glycine max* L.

Márcio de Barros^{1*} and Gabriela Alves Macedo¹

Aceito para publicação na revista **Food Science and Biotechnology**

Abstract

The extraction and esterase activity of Brazilian soybean seeds (*Glycine max* L.) were evaluated. Esterase activity was found in both the germinated and non-germinated seeds at 2.90 and 1.70 U.mg⁻¹, respectively, with a concentration in the powdered extract (freeze dried) of 100 mg.mL⁻¹, the germinated seeds showing the highest activity. The enzyme showed a preference for the hydrolysis of short chain fatty acids (120.02 U.mL⁻¹). The optimum pH for activity was pH 8.0 with optimum temperatures of 40°C and 80°C. The enzyme showed stability at 70°C showing 60% of residual activity. It was also shown that the activity of the enzyme increased with the addition of the following salts: NaNO₃, K₂SO₄ and Na₂SO₄ in the reaction medium, and only the salts HgCl₂ and NaH₂SO₃ inhibited the enzymatic activity. The characteristics of *Glycine max* esterase are very similar to those of the microbial esterases used in detergent processing.

Keywords: Esterase; Lipase; Soybean (*G. max* L.); Seeds; Fatty acids.

1. Introduction

Esterases (carboxylester hydrolases; EC. 3.1.1.1) and lipases (triacylglycerol acylhydrolase EC. 3.1.1.3), collectively known as “lipolytic enzymes”, are characterized by their potential to hydrolyze hydrophobic long- and short chain carboxylic acid esters, respectively. Lipases catalyze the hydrolysis of ester bonds at the interface between an insoluble substrate phase and the aqueous phase, whereas esterases catalyze the hydrolysis of the ester bonds of water soluble substrates. However, medium-length fatty acid chains can be hydrolyzed by both enzymes (1- 5).

Lipase and esterase enzymes have become more and more prominent on the enzyme biotechnology scenario due to their versatility for hydrolysis and synthesis, their catalytic reactions often being chemo-selective, region-selective or enantio-selective (4, 6, 7). The participation of lipolytic enzymes on the worldwide enzyme industrial market has grown significantly and is now comparable to that of the peptidases, which currently represent 25 to 40% of the industrial enzymes sales (7-9).

Esterases can be of animal (pancreatic, hepatic and gastric), microbial (bacterial, molds and yeast) or vegetable origin, with variations in their catalytic properties (1, 7, 10). Nevertheless, despite the extensive range of microbial esterases, the use of these enzymes on an industrial scale requires a search for other sources of these enzymes (11).

Recently, seed lipases and esterases have been the focus of much attention as biocatalysts. In some cases, these enzymes present advantages over animal and microbial lipolytic enzymes due to some quite interesting features such as specificity, low cost, availability and easy of purification, representing a great alternative for the commercial exploitation as industrial enzymes (7, 11-15).

Liaquat and Apenten (16) studied the synthesis of low molecular weight esters in an organic medium composed of hexane, using enzymes precipitated from different vegetable seeds by ammonium sulfate. The direct esterification of acetic, butyric and caproic acids by ethanol, butanol, isobutanol or (Z)-3-hexen-1-ol was also carried out. Of the grain lipases studied (wheat, linseed, barley and canola), canola seed lipase showed the highest degree of flavor formation, producing (Z)-3-hexen-1-yl butyrate and (Z)-3-hexen-1-yl caproate with an efficiency of about 96%.

The following are the most widely studied oilseed grains with respect to lipase extraction and characterization: beans (14); sunflower seeds (17, 18); linseed (19), peanuts (20) and cotton seeds (21), although lipases from other oilseed sources are currently being investigated. Soybean seed, for example, can be a good alternative as a source of lipolytic enzymes.

Soybean (*Glycine max* L.) is a grain that belongs to the oilseed family (Fabaceae) which includes bean and peas. The main producers of soybean around the world are the United States (32%), Brazil (28%), Argentina (21%), China (7%) and India (4%). The soybean grain contains high concentrations of proteins and other nutrients, and is therefore widely applied as food and feed. Mature soybeans contain about 40.7% protein, 22.7% lipids, 10.9% carbohydrates and 6.7% dietary fiber. Of the total fatty acids, soybean presents high levels of linoleic, oleic and linolenic acids (39.93%, 42.46% and 4.64%, respectively).

Stejskal and Griga (22) studied the presence of isoenzymes in the soybean seed, including esterase enzymes. However, no study of the biochemical characteristics and biocatalytic potential of the esterases from soybean seed has yet been carried out.

The present work aimed to observe and quantify the presence of esterase activity in the non-germinated and post germinated soybean seeds, assess the specificity and study the biochemical characteristics of the crude esterase.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

The soybean seeds studied were kindly donated by the Brazilian industry VITAO. The commercial lipase used in this study was Lipozyme TLIM extracted from *Thermomyces lanuginosu* by Novozymes®. The concentration of the commercial lipase used was 2mg.mL⁻¹. The chemicals *p*-nitrophenyl acetate (pNPA), *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB), *p*-nitrophenyl caprilate (pNPC), *p*-nitrophenyl laurate (pNPL) and *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) were purchased from Sigma Chemicals (St Louis, MO). Triacetin, tributyrin, tricaproin, tripalmistin and triolein were purchased from Fluka (Switzerland), and the other chemicals were of analytical grade.

2.2 Esterase extraction

Esterase was extracted from the soybeans using a modification of the procedure described by Aizono et al. (23). Non-germinated and post germinated seeds were suspended in a 1X10⁻³M CaCl₂ solution and blended for 3 min at 4 °C in a Waring blender. The samples were transferred to conical flasks, stirred mechanically at 4 °C for 30min, and then subjected to ultrasound (125W at 200 kHz) for 1 min in an effort to release the bound enzyme. The resulting suspension was centrifuged at 2000xg for 45min, the supernatant collected and freeze dried for 48 h. The powder obtained was stored at -18 °C and assayed for its protein content using the modified Bradford method (24).

The post germinated soybean grains, were germinated for a 24 h period in the dark, after soaking at room temperature.

2.3 Enzyme Assay

Esterase activity was determined spectrophotometrically at 405nm, following the hydrolysis of the substrate *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB). An aliquot (0.070 mL) of a solution containing 100mg.mL⁻¹ freeze dried powder was added to 3.43

mL of a reaction mixture consisting of the following: 1.12 mM (pNPB) dissolved in 50mM phosphate buffer pH at 7.0, plus 0.2% Triton X-100 and 0.42 M tetrahydrofuran. The enzymatic reaction was carried out for a period of 5 min at 37°C, and monitored for one minute against a blank solution. One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme required to release one micromole of *p*-nitrophenol per minute under the standard assay conditions (25).

Esterase activity was also determined by a titrimetric method using triacetin as the substrate. One milliliter of the solution containing 100mg.mL⁻¹ of the freeze dried powder extract was added to a reaction mixture with the following composition: 5mL of 0.1M phosphate buffer at pH 7.0 and 1mL of triacetin. The solution was incubated at 37°C for 6h with shaking at 120 rpm. After incubation, the reaction was stopped by adding 15mL ethanol:acetone 1:1 (v/v), and the fatty acids released titrated with 0.05 M sodium hydroxide. One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme required to release one µmol of oleic acid one minute per mL under the specified conditions (26).

2.4 Enzyme specificity

Substrate specificity of the enzyme was determined under the standard assay conditions described above. Several *p*-nitrophenyl-esters were analyzed: *p*NPA, *p*NPB, *p*NPC, *p*NPL and *p*NPP. The specificity was also tested using different triacylglycerols (triacetin, tributyrin, tricaproin, tripalmitin and triolein) by titration with NaOH as described previously.

2.5 Optimum temperature and heat stability

The effect of temperature on the esterase activity was studied by carrying out assays at different temperatures in the range from 30-90°C at pH7.0, using 0.1M phosphate buffer.

Heat stability of the esterase was tested by pre-incubating the enzyme for 1h at various temperatures from 30 to 60°C. After pre-incubation, the residual

activity was determined at 37°C and expressed as a percentage of the relative esterase activity.

2.6 Optimum pH and pH stability

The optimum pH for esterase activity was determined using 0.1M acetate buffer in the range from 3.6 to 5.6, 0.1M phosphate buffer from 6.0 to 7.0, 0.1M Tris-HCl buffer from pH 7.2 to 9.0, and 0.1M Borax-NaOH buffer from pH 9.5 to 10.0.

The pH stability was evaluated by incubating the enzyme with different buffers at pH values ranging from 3.6 to 10.0 for 24h at room temperature. After incubation, the residual activity was determined (37°C, phosphate buffer pH 7) and expressed as a percentage of the relative esterase activity. All the tests were carried out in duplicate.

2.7 Effect of salts and chemical agents

The effect of different salts (CaCl_2 , KCl_2 , HgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NaNO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , Na_2SO_4 , NaHSO_3 , HgCl_2 , NaH_2SO_4 , CuSO_4 and NaCl_2) on the esterase activity was studied. The salts were added to the reaction buffer at concentrations of 1 and 10 mM. The relative activity was expressed as a percentage of the relative esterase activity determined in the reaction medium without the added salts. The effect of different chemical agents (EDTA, urea, sodium lauryl sulfate, sodium bisulphate, glutathione (reduced), ascorbic acid, sodium citrate, cysteine, Tris and sodium persulfate) was also evaluated at concentrations of 1 and 10mM.

2.8 Stability in solvents

The stability of the esterase in various solvents was evaluated by incubating the enzyme with different solvents (methanol, ethanol, isopropanol, 1-propanol, butanol, iso-butyl, n-hexane, acetone, acetone:ethanol and tetrahydrofurane) at room temperature for 1h. After the incubation period, the solvent was evaporated

off, the enzyme powder dissolved in distilled water and the residual activity determined. The relative activity was expressed as a percentage of the relative esterase activity when incubated in water (control).

2.9 Statistical analysis

The data from the experiments are presented as the mean $\pm$ standard error (SEM), and were analyzed by a one way analysis of variance (ANOVA), with the differences analyzed by the Tukey test at level of 5% probability (SAS version 9.2 – Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results and Discussion

3.1 Esterase activity of the extracts from the germinated and ungerminated soybean seeds

According to Villeneuve (13) and Hassanien and Mukherjee (27), the majority of seeds only present lipolytic activity after germination of the grain. However, in the case of soybeans, esterase activity was observed both in the germinated and non-germinated beans, and the results can be seen in Figure 1.

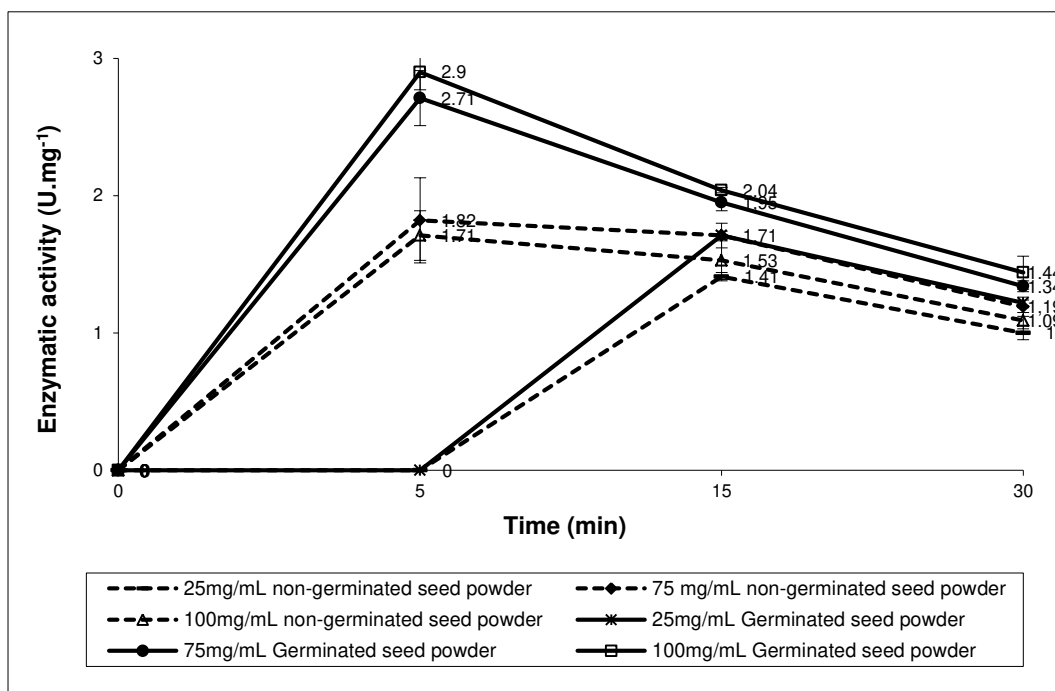


Figure 1: Esterase activity of the freeze dried crude soybean extract from germinated and non-germinated seed. The experiments were performed in triplicate.

Both the germinated and non-germinated soybeans showed esterase activity, although higher values were observed in the germinated beans. It was observed that the medium containing 100 mg.mL^{-1} of freeze dried extract of the germinated beans showed the greatest activity (2.90 U.mg^{-1}) after 5 minutes of reaction time, although this value did not differ statistically from that of the medium containing 75 mg.mL^{-1} of freeze dried extract of the germinated beans. The same was true for the crude extracts from the non-germinated beans.

The esterases and lipases in grains are responsible for hydrolyzing the fatty acids of the triacylglycerols stored as energy sources for the embryo during germination (28-30). For this reason some grains present activity of these enzymes during the germination period or the activity increases, as in the case of the soybean. Sadeghipour and Bhatla (18) studied the lipolytic activity of the sunflower seed, whose activity was only observed after 36 hours of germination. Sammour *et*

al. (19) also showed lipase activity in oat grains after 36 hours of germination. However sorghum grains (31), brown beans (14), nuts (15) and coconut (28), among others, also showed lipolytic activity without germination of the grains and an increase after germination.

It was also observed that the greatest enzymatic activity of esterase was obtained after 5 minutes of reaction time for both germinated and non-germinated soybean seeds with the various concentrations of freeze dried enzymatic extracts. Longer reaction times resulted in a decrease in specific activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) of the enzyme, probably due to a decrease in substrate concentration.

3.2 Enzyme specificity

With respect to specificity, the lipolytic enzymes of seeds generally present greater affinity for short chain fatty acids such as: acetic and butyric acids, saturated and unsaturated acylglycerols, and fluorescent substrates with the molecular structure of monoesters (14, 32). The hydrolytic specificity of the freeze dried soybean esterase was evaluated with various synthetic substrates, and the results can be seen in Figure 2.

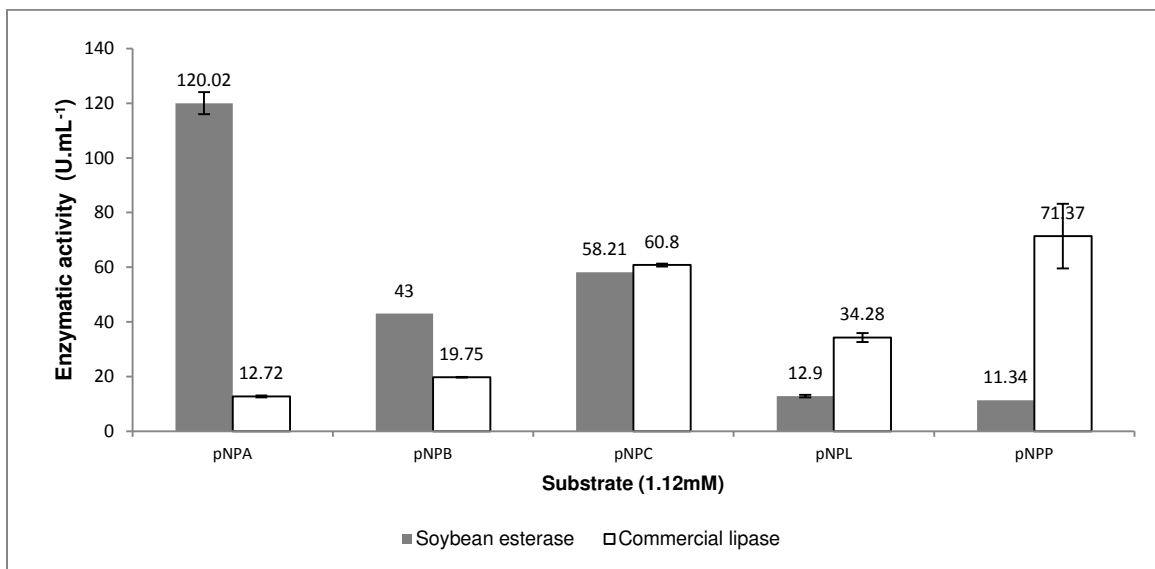


Figure 2: Esterase activity of the freeze dried crude soybean extract in different synthetic substrates. The experiments were performed in triplicate.

In the above graph it can be seen that the soybean esterase showed greater activity with pNPA (120.02 U.mL⁻¹), followed by pNPC and pNPB, with 43 and 58 U.mL⁻¹ respectively. The commercial lipase used showed greater activity with long chain fatty acids (pNPP with 71.37 U.mL⁻¹), as expected.

According to Marten *et al.* (33), Osborn and Akoh (34), fatty acids containing from 2 to 6 carbons in their structure are classified as short chain fatty acids, for example, butyric acid (4 carbons). Fatty acids containing from 6 to 12 carbons in their structure, are classified as medium chain fatty acids (e.g. caprylic acid). The soybean esterase showed a greater affinity for short chain fatty acids, a behavior expected for an esterase.

Kubicka *et al.* (35) evaluated the esterase activity of barley and also detected a greater affinity of the enzyme for short chain fatty acids, especially acetic acid esters. Liaquat and Apenten (16) studied the synthesis of different esters by the lipase from corn seeds, and observed a preferential hydrolysis of short chain fatty acids by the enzyme in the following order: acetic acid (2C) >

butyric acid (4C) > caproic acid (6C), in an organic medium using isopentanol, after 72 hours of reaction.

Polizelli *et al.* (15) studied the specificity of the lipase from seeds of *P. aquatica*, which showed values for activity of 2.5; 2.7; 5.0; and 4.8 U.mL⁻¹ in pNPA, pNPB, pNPC and pNPP, respectively, after 90 minutes of reaction. Although the authors were studying one lipase, they observed that the values for activity presented by this enzyme were lower than the values presented by the esterase from soybean for all the substrates, after 30 minutes of reaction.

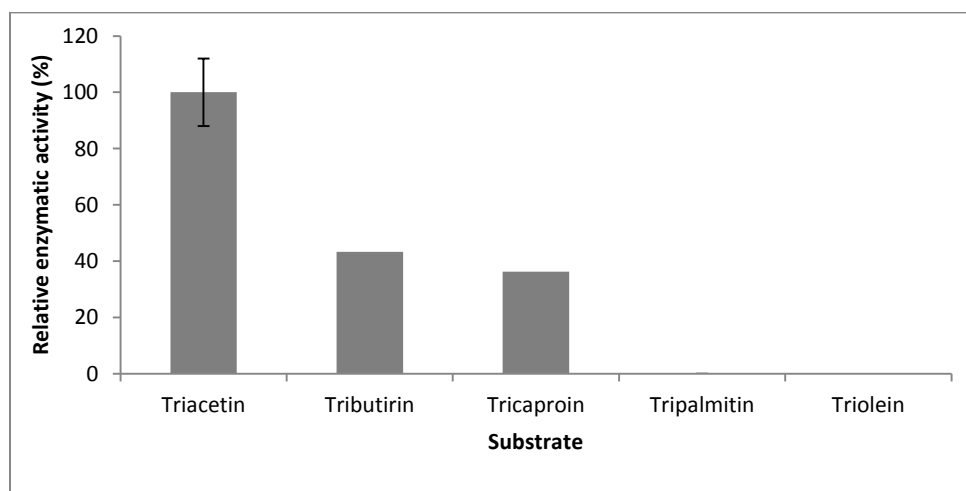


Figure 3: Esterase activity of the freeze dried crude soybean extract in different substrates. The experiments were performed in triplicate.

It can be seen that when triacylglycerols were used as the substrate to evaluate the specificity of the soybean esterase, the enzyme showed similar behavior to the results shown in Figure 2. The highest values for activity were obtained with triacetin, and as the size of the fatty acid chain increased, so the activity of the enzyme decreased significantly.

3.3 Effect of temperature on the enzyme activity and stability

Figure 4 shows the results obtained in the evaluation of the temperature optimum for the activity of the soybean esterase.

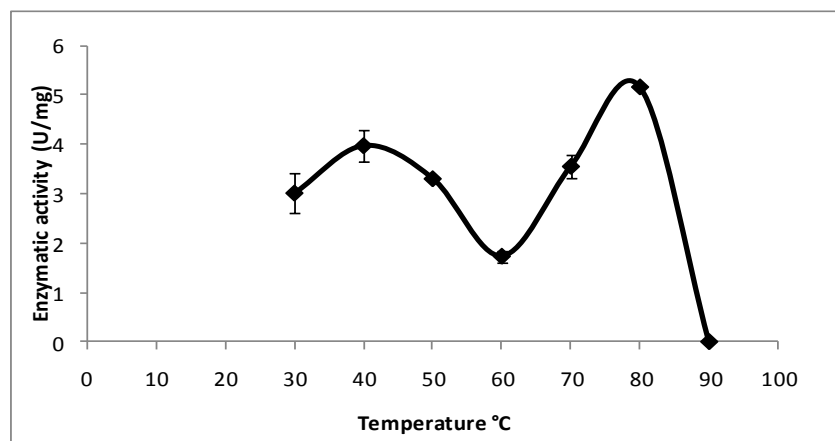


Figure 4: Temperature optimum for the activity of soybean esterase. The experiments were performed in quadruplicate.

Since the enzyme presented two peaks for optimum activity, there is a possibility that the soybean esterase has two isoforms. Staubmann *et al.* (36) studied the esterase from the *J. curcas* L. seed and observed optimum activity for the enzyme at 50°C in (*p*NPB). Mohamed *et al.* (1) studied the esterases from oat seeds (EI and EII) and observed optimum activity for EI at 60°C and at 80°C for EII. The lipase from the kapok tree seeds (*P. aquatica* Bombacaceae), studied by Polizelli *et al.* (15), showed optimum activity at 40°C, using *p*NPP as the substrate. Isbilir *et al.* (37) studied the lipase from bay tree seeds (*L. nobilis* L.), and found optimum activity at 50°C in triolein.

A study of the thermostability of an enzyme is important, since it provides information concerning possible applications of the enzyme. The thermostability of the soybean esterase was studied at temperatures of 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90°C, and the results are shown in Figure 5 as the percent of residual activity.

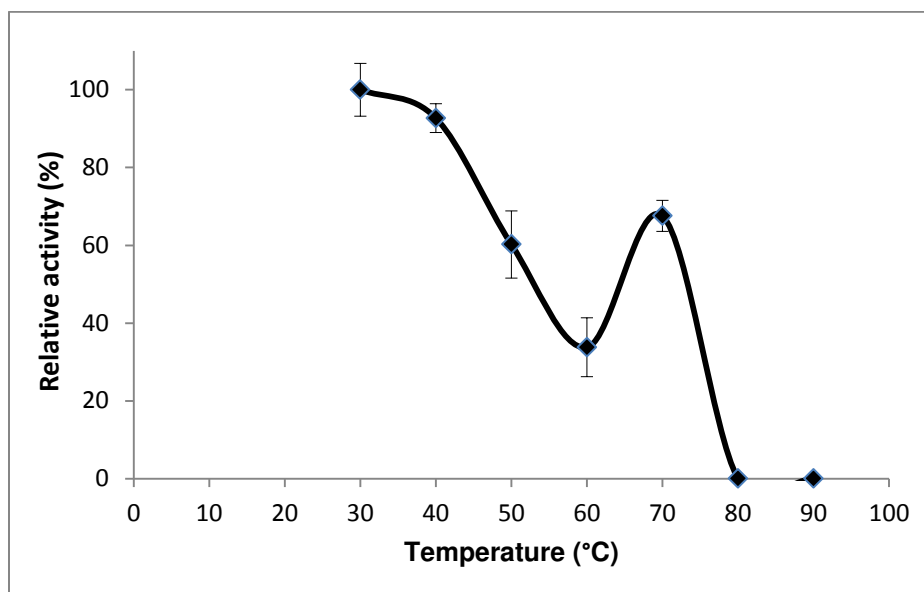


Figure 5: Effect of temperature on the stability of soybean esterase. The experiments were performed in quadruplicate.

The results shown in Figure 5 showed that the soybean esterase was stable at 30 and 40°C for 1 hour of incubation. There was a decrease in activity of approximately 40 and 60% when the temperature was raised to 50 and 60°C. However there was an increase in activity at 80°C, where the enzyme retained 65% of its activity, but at temperatures above 80°C it showed no activity.

Based on these results, the soybean esterase can be considered as an enzyme with medium temperature stability. The oat (*A. fatua*) esterases EII and EIII, studied by Mohamed (1), were stable at 30 and 50°C, respectively, but were unstable at higher temperatures. The lipase from bay tree seeds (*L. nobilis*) studied by Isbilir *et al.* (37), presented 80% of activity after 1 hour of incubation at 50°C, and 60% at 80°C.

3.4 Effect of pH on the enzyme activity and stability

The effect of pH on the enzyme activity and stability was also evaluated and the results are shown in Figures 6 and 7.

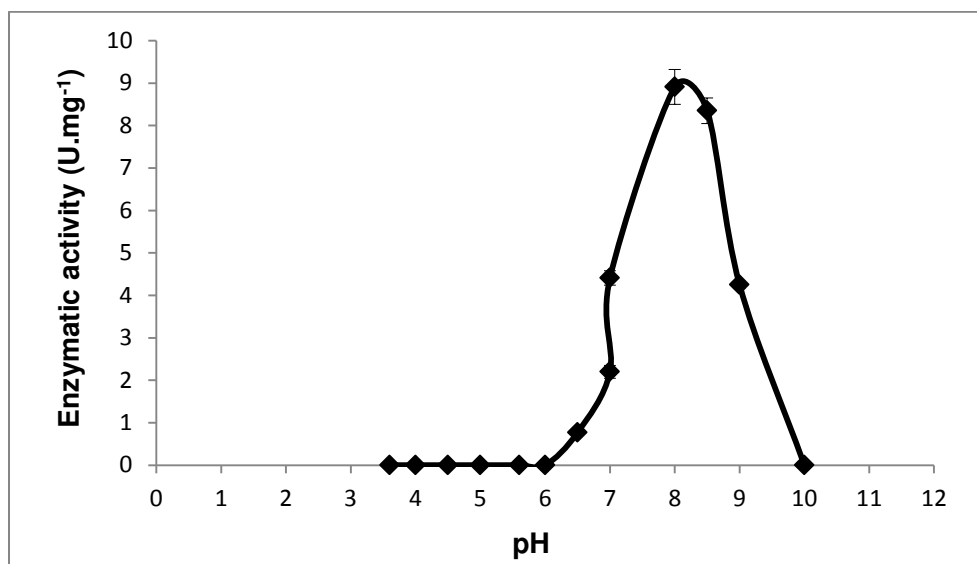


Figure 6: Effect of pH on the activity of soybean esterase. The experiments were performed in quadruplicate.

As shown in the above Figure, the pH optimum for the soybean esterase was 8.0. This value was close to that presented by the esterase of the *J. curcas* studied by Staubmann *et al.* (36), which showed its greatest activity at pH 7.5, and that of the bay tree lipase (*L. nobilis*) studied by Isbilir *et al.* (37). The oat (*A. fatua*) esterases EI and EII showed their optimum activity at pH 9.0 Mohamed *et al.* (1).

Figure 7 shows the percent of residual activity of the soybean esterase at different pH values between 3.5 and 10.

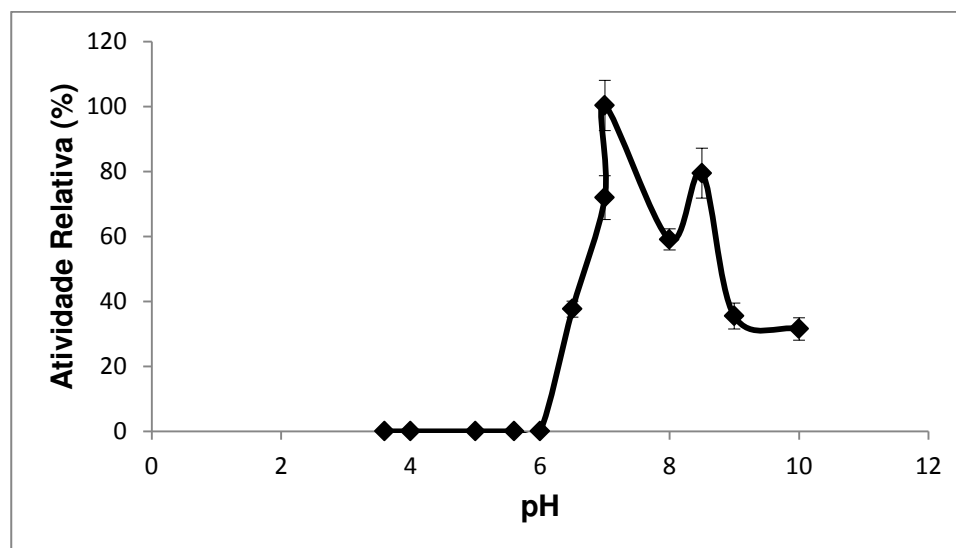


Figure 7: Effect of pH on the stability of soybean esterase. The experiments were performed in quadruplicate.

The pH stability profile of the soybean esterase showed that the enzyme retained its total activity at pH 7 (Tris – HCl buffer), and at pH 8.0, where the enzyme showed its pH optimum for activity, it retained 70% of its activity. Nevertheless, at pH 8.5 it retained 80% of its activity, so there are probably two esterases in the crude soybean extract.

3.5 Effect of salts

Table 1 shows the results obtained for the influence of various salts at 1 and 10mM on the soybean esterase activity.

Table 1: Effect of different salts on the activity of the soybean esterase ^{1,2}.

Salt	Final concentration 1mM	Final concentration 10mM
	Relative activity (%)	Relative activity (%)
Control	100 ^{efg}	100 ^{efg}
K ₂ HPO ₄	88.57±5.36 ^{ghi}	86.65±5.75 ^{ghi}
NaNO ₃	118.77±6.35 ^{cd}	165.86±15.93 ^a
CaCl ₂	114.40±5.63 ^{cde}	114.52±8.94 ^{cde}
MgSO ₄	58.59±1.34 ^L	57.92±3.73 ^L
KCl ₂	98.24±3.93 ^{efg}	108.44±9.99 ^{cdef}
MnCl ₂	74.05±5.34 ^{ijkl}	93.38±4.36 ^{igh}
HgCl ₂	35.78±10.01 ^M	0.00 ^N
K ₂ SO ₄	151.63±8.84 ^a	145.91±5.36 ^b
NaH ₂ SO ₃	29±4.30 ^{kL}	0.00 ⁿ
Fe ₂ SO ₄	119.05±7.35 ^{cd}	66.42±4.21 ^{lk}
MnSO ₄	85.96±3.61 ^{ghij}	119.88±8.55 ^b
ZnSO ₄	69.22±1.64 ^{kl}	74.28±5.34 ^{ijkl}
Na ₂ SO ₄	150.24±6.86 ^{ab}	147.10±7.07 ^b
CoCl ₂	101.98±6.84 ^{detg}	90.89±3.48 ^{ghi}
NaCl ₂	77.02±2.05 ^{hijk}	101.40±2.30 ^{efg}
CuSO ₄	61.55±1.52 ^{Lk}	25.14±0.78 ^M

¹ Means of four repetitions with one determination each ± standard deviation.² Means followed by the same letter do not differ significantly at p≥0.05.

Only K₂SO₄, Na₂SO₄ and NaNO₃, at concentrations of 1 and 10mM, showed positive effects on the esterase activity, and a concentration of 1mM was sufficient to increase the enzyme activity. For the esterase of the *J. curcas* studied by Staubmann *et al.* (36), only BaCO₃ at a concentration of 10mM, showed a positive effect on the activity of the enzyme. The author stated that it was common for the ions K²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺ to have a positive effect on esterase activity, although this was not the case with the edible pine esterase or the soybean esterase, with the exception of K²⁺. The Ca²⁺ ion did not alter the activity of the soybean esterase activity, although the enzyme extraction medium already contained this ion. When Ba²⁺ was studied, an increase of 49% and 64% was observed in the activities of EII and EIII, respectively (1).

Isbilir *et al.* (37) studied the lipase from the bay (*L. nobilis*) seed, and observed a significant increase in activity of the enzyme when the ions Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} were added to the reaction medium, results similar to those observed with almond (*A. communis*) seed lipase. The lipase from the kapok tree seed (*P. aquatica*) showed an increase in activity in the presence of the ions Ca^{2+} and Mg^{2+} .

The soybean esterase was strongly inhibited by MgSO_4 , CuSO_4 , HgCl_2 and NaH_2SO_4 , as also observed for the esterase from *Jatropha curcas* L. (36) and almond seeds (38).

3.6 Effect of activators and inhibitors

Table 2 shows the results obtained for the effects of activators and inhibitors on the soybean esterase activity.

Table 2 : The effect of activators and inhibitors on the relative activity of freeze dried soybean esterase^{1, 2}.

Chemical Agent	Concentration 1mM	Concentration 10mM
	Relative activity (%)	Relative activity (%)
Control	100 ^{bcd}	100 ^{bcd}
Glutathione (oxidized)	99.52±4.87 ^{bcd}	65.93±7.35 ^{fghi}
Glutathione (reduced)	140.81±7.01 ^a	42.60±7.80 ^{kL}
Ascorbic acid	110.82±11.22 ^b	79.99±3.62 ^{ef}
Sodium citrate	113.98±8.29 ^b	143.27±7.18 ^a
Sodium Lauryl	72.29±1.98 ^{fg}	36.17±1.93 ^L
Cysteine	69.89±6.88 ^{fgh}	50.57±2.74 ^{ijkl}
Tris	69.15±5.89 ^{fgh}	79.85±4.63 ^{ef}
Sodium bisulfate	55.19±2.89 ^{hijk}	0.0±0.0 ^M
EDTA	67.88±6.66 ^{fgh}	61.31±6.95 ^{ghij}
Urea	93.37±4.04 ^{cde}	108.76±4.72 ^{bc}
Sodium persulfate	91.55±8.06 ^{ed}	49.76±1.48 ^{jkL}

¹ Means of four repetitions with one determination each ± standard deviation.

² Means followed by the same letter do not differ significantly at $p \geq 0.05$.

Table 2 shows that the activity of the soybean esterase was considerably increased by the presence of 1mM reduced glutathione and 10mM sodium citrate. The compounds sodium bisulfate, sodium lauryl sulfate, cysteine, sodium persulfate and oxidized and reduced glutathione, all at 10mM, had a negative effect on the activity of the enzyme. Polizelli *et al.* (15) evaluated the effects of some chemical compounds on the activity of the lipase from the seed of *Pachira aquatica* and observed negative effects by reduced glutathione, ascorbic acid and ammonium persulfate, all at a concentration of 10mM.

The esterases and lipases are well known for their stability and ability to act in organic solvents (15). Table 3 shows the stability of the soybean esterase in organic solvents.

3.7 Effect of solvents

Table 3 shows the results obtained for the effects of organic solvents on the soybean esterase stability.

Table 3: Stability of the soybean esterase in organic solvents^{1,2}.

Solvents	Log <i>P</i>	Relative activity (%) [*]
Control		100 ^b
Methanol	-0.76	51.33±2.52 ^e
Ethanol	-0.24	58.49±7.00 ^{de}
Isopropanol	0.28	51.83±1.32 ^e
1-propanol	0.28	25.48±1.81 ^f
Butanol	0.80	0.00 ^g
Isobutanol	0.80	65.50±3.89 ^d
n-Hexane	3.5	120.64±7.34 ^a
Acetone	-0.23	100.40±5.99 ^b
Acetone:Ethanol		84.38±2.55 ^c
Tetrahydrofuran	0.49	51.25±2.99 ^e

¹Means of four repetitions with one determination each ± standard deviation.

²Means followed by the same letter do not differ significantly at $p \geq 0.05$.

The soybean esterase showed relatively good lipolytic activity in (pNPB) in the majority of the solvents studied. In acetone, ethanol/acetone and isobutanol it

showed 100, 84.30 and 65.5% relative activity, respectively. However the activity of the enzyme was increased by 20% in hexane, as compared to the control. Staubmann *et al.* (36) also observed an increase in the activity of the esterase from the *J. curcas* in the presence of ethanol, but a decrease in activity in the presence of methanol.

4. Conclusions

In the present study, the soybean esterase showed interesting characteristics such as specificity, capability and catalytic stability at alkaline pH (pH 8), stability at relatively high temperatures of 70°C and stability in some organic solvents. These characteristics demonstrate the potential for application of this enzyme in various industrial sectors, in the synthesis of low molecular weight esters (aromatic esters), in industrial detergents and in other applications.

Acknowledgments This work was supported by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

1. Mohamed, M. A.; Mohamed, T.M.; Mohamed, S.A.; Fahmy, A.S. Distribution of lipases in the gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. **Bioresource Technology**, v.73, p. 227-234, 2000.
2. Maia, M.A; Heasley, A.; de Moraes, M. M. C.; Melo, E. H. M.; Moraes Jr., M. A.; Lendingham, W.M.; Lima Filho, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.
3. Panda, T; Gowrishankar, B. S. Production and applications of esterases. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 160-169, 2005.
4. Singh, R.; Gupta, N; Goswami, V.K. Gupta RS. Simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 679-682, 2006.
5. Fahmy, A. S.; Abo-Zeid, A.Z.; Mohamed, T. M.; Ghanem, H.M.; Borai, I. H.; Mohamed, A. S. Characterization of esterases from *Cucurbita pepo* cv. Eskandrani. **Bioresource Technology**, v. 99, p.437-443, 2008.
6. Freire, G.D.M.; Castilho, F. L. R. Lipases em Biocatálise. pp. 369-385. In: Enzimas em biotecnologia produção, aplicação e mercado. Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML (ed). Interciências, Rio de Janeiro, BR, 2008.
7. Barros, M.; Macedo, A.G. Seed lipase: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p.15-29 (2010).
8. Hasan, F. Shah, A. A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 39, p.235-251 (2006).
9. Ruchi, G.; Anshu, G. Khare, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4796-4802, 2008.
10. Mukherjee, K. D.; Hills, M. J. N. Lipases from plants. Pp 271-288. In Lipases – their structure, biochemistry and application. Wooley P, Peterson SB (ed) Cambridge University Press, England, 1994.
11. Paques F.W.; Macedo, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações indústrias. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99 2006.

12. Hellyer, S. A.; Chandler, I. C.; Bosley, J. A. Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? **Biochimical and Biophysical Acta**, v.1440, p. 215-224 1999.
13. Villeneuve, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid and Technology**, v.105, p. 308-317 2003.
14. Enujiagha, V.N.; Thani, F. A.; Sanni, T. M.; Abigor, R. D. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth) **Food Chemistry**, p. 88, v.405-410, 2004.
15. Polizelli, P. P; Tiera, M. J.; Bonilla-Rodriguez, G. O. Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 749-753 2008.
16. Liaquat, M.; Apenten, R. K. O. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. **Journal of Food Science: Food Chemistry Toxicology**, v. 65, p. 295-299 2000.
17. Sagiroglu, A.; Arabaci, N. Sunflower seed lipase: extraction, purification, and characterization. **Preparative Biochemistry of Biotechnology**, v. 35, p.37-5,1 2005.
18. Sadeghipour, H.R.; Bhatla, S. C. Light-enhanced oil body mobilization in sunflower seedlings accompanies faster protease action on oleosins. **Plante Physiology and Biochemistry**, v. 41, p.309-316, 2003.
19. Sammaour, R. H. Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipid body linseedlings. **Turkish Journal of Botany**, v. 29, p.177-184, 2005.
20. Huang, A. H.C; Moreau, R.A. Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. **Planta**, v. 141, p.111-116, 1978.
21. Rakhimov, M. M.; Dzhanbaeva, N.R.; Yuldashev, P.K. Specify of the lipase from cottonseed. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 6, p. 616-619, 1970.
22. Stejskal, J. Grica, M. Comparative analysis of some isozymes and proteins in somatic and zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Plante Physiology**, v.146, p. 497-502, 1995.
23. Aizono, Y.; Funatsu, M.; Sugano, M.; Hayashi, K.; Fujiki, Y. Enzymatic properties of rice bran lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, p. 2031-2036, 1973.

24. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
25. Pio, T. F.; Macedo, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 41, p. 613-619, 2007.
26. Macedo, G. A.; Pastore, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.115-119, 1997.
27. Hassanien, F. R.; Mukhrjee, K. D. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. **Journal of American Chemical Society**, v. 63, p. 893-897, 1986.
28. Ejedegba, B. O.; Onyeneke, E. C.; Oviasogie, P. O. Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera* Linn) seed under different nutrient treatments. **African Journal Biotechnology**, v. 6, p. 723-727, 2007.
29. Borek, S.; Ratajczak, W.; Ratajczak, L. Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. **Plant Science**, v.170, p. 441-452, 2006.
30. Huang, A. H. C.; Lin, Y.H.; Wang, S. M. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. **Society**, v. 65, p. 897-899, 1988.
31. Nwanguma, B. C.; Ezengwa, M. O.; Ezengwa, O. O. Changes in activity of sorghum lipase malting and mashing. **Journal of Institute of Brewing**, v.102, p. 39-41, 1996.
32. Borgston, B.; Brockman, H. L. Lipases. Elsevier, Amsterdam. pp 5-7, 1984.
33. Marten, B. Pfeuffer, M.; Schrezenmeir, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, v.16, p.1374-1382, 2006.
34. Osborn, H. T.; Akoh, C. C. Structure lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 3, p. 110-120, 2002.
35. Kubicka, E.; Grabska, J.; Jedrychowski, L.; Czyz, B. Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 301-304, 2000.

36. Staubmann, R.; Ncube, I.; Gübitz, G. M.; Steiner, W.; Read, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.
37. Isbilir, S. S.; Ozcan, M. H.; Yagar, H. Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds. **Journal of American Chemical Society**, v.85, p. 227-233, 2008.
38. Yesiloglu, Y.; Baskurt, L. Partial purification and characterization of almond seed lipase. **Preparative Biochemistry**, v.38, p.397-410, 2008.

3.3 Estudo da Maximização da Atividade da Esterase de Semente de Soja (*Glycine max* L.) por Delineamento Experimental.

Márcio de Barros^{1*} e Gabriela Alves Macedo¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos,

Faculdade de Engenharia de Alimentos P.O. Box: 6121,

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,

13083-970, Campinas, SP, Brasil

Resumo

Enzimas lipolíticas de sementes têm sido amplamente estudadas devido ao fato destas enzimas apresentarem características bastante interessantes para a indústria. A esterase de soja recentemente estudada demonstrou ter sua atividade elevada, na presença de sulfato de potássio e citrato de sódio. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito interativo do sulfato de potássio, citrato de sódio, temperatura e pH sobre a atividade da esterase de soja bruta. Foi observado que o coeficiente de regressão das variáveis temperatura (linear e quadrático) e pH (linear e quadrático) tiveram efeito negativo sobre a atividade da enzima, porém a interação entre o pH e a temperatura teve efeito positivo sobre a atividade da enzima. O coeficiente de regressão para o sulfato de potássio quadrático teve um efeito positivo. A esterase de soja demonstrou boa atividade em pH alcalino e temperaturas próximas a 45°C.

1. Introdução

Processos catalisados por enzimas tendem a se tornar um processo rotineiro em trabalhos de síntese. Este fato é consequência direta da disponibilidade comercial das hidrolases, o que permite a seleção das enzimas mais adequadas para a biotransformação desejada (Faber, 2004).

Entre os processos de maior interesse industrial, estão às reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio de lipases e esterases visando à modificação das propriedades físico-químicas, funcionais e organolépticas das matérias-primas lipídicas para obtenção de produtos conhecidos e/ou novos a custo mais competitivo, auxiliando o setor industrial a alcançar suas metas e expansão. As lipases e esterases têm sido muito utilizadas também em reações de síntese orgânica e quiral, na formulação de produtos farmacêuticos e biodiesel (Freire e Castilho et al. 2008).

A demanda de enzimas lipolíticas, particularmente, tem aumentado e está em crescente demanda relacionando intimamente a contínua utilização de engenharia genética e enzimologia. Esterases e lipases de sementes vegetais têm sido muito estudadas, e têm ganhado destaque, uma vez que, estas enzimas apresentam características interessantes como especificidade, pH ótimo de atividade, etc. (Hellyer, Chandler and Bosley, 1999; Villeneuve, 2003; Enujagha et al., 2004; Paques e Macedo, 2006; Polizelli, Tiera e Bonilla-Rodriguez, 2008).

Er-zheng et al. (2010) estudaram lipase de semente de mamona (*Ricinus communis* L.) e observaram algumas características interessantes como pH ótimo de atividade a 4,5; temperatura ótima de atividade 35°C. Lipase de semente de amêndoa (*Amygdalus communis* L.) estudada por Yesiloglu and Baskert (2008), demonstrou um pH ótimo de atividade em torno de 8,5 e atividade ótima a 65°C. As esterases (EI e EII) de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) estudada por Staubmann et al. (1999) apresentaram pH ótimo em 7,5 e temperatura ótima a

45°C e tiveram sua atividade aumentada quando Ba^{+} estava presente no meio reativo.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito interativo do pH, temperatura, sulfato de potássio e citrato de sódio na atividade da esterase de soja (*Glycine max* L.), usando a metodologia de superfície de resposta.

2. Material e Métodos

2.1 Material

Os grãos de soja (*Glycine Max* L.) utilizados neste estudo foram fornecidos pela **VITAO** indústria brasileira. O substrato utilizado para avaliar a atividade enzimática foi *p*-nitrofenil butirato adquirido na Sigma na concentração de 1,12mM. Foi utilizado citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$) e sulfato de potássio (K_2SO_4) grau P.A.

2.2 Extração da enzima

As enzimas foram extraídas utilizando o método descrito por Aizono et al. (1973) modificado por Kermasha e van de Voort (1986). Uma alíquota de 150 gramas (em peso seco) de semente foi triturada e a farinha obtida foi ressuspensa em uma solução contendo $1.10^{-3}M$ $CaCl_2$ e homogeneizados em liquidificador a 4°C por 3 minutos. A amostra foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL, agitado mecanicamente a 5°C por 30 minutos, e então, submetida a ultra-som (125W a 200W) por 1 minuto para a liberação da enzima ligada. A suspensão resultante foi centrifugada a 2000xg por 45 minutos, para retirada dos resíduos suspensos. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado congelado. A atividade esterásica do pó resultante foi determinada como descrito a seguir.

2.3 Determinação da atividade esterásica utilizando substrato sintético

A atividade de esterase do extrato bruto de soja foi determinada espectrofotometricamente pela hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil butirato (pNPB). Foram adicionados 0,07 mL do sobrenadante do extrato bruto a 3,43 mL de uma solução contendo: 1,12 mM de (pNPB), tampão fosfato 50 mM pH 7,0, Triton X-100 0,2% (v/v) e tetrahidrofurano 0,43 M. Junto ao meio de reação foram adicionados o citrato de sódio e o sulfato de potássio. As leituras foram feitas após 5 minutos de reação a 405 nm. Uma unidade de atividade esterásica foi definida como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado (em μmol) por minuto por mL do sobrenadante, sob as condições especificadas (Macedo and Pio 2005).

Foi preparada uma curva padrão, utilizando diferentes concentrações de (pNPB) para ser utilizada na determinação da atividade enzimática.

2.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 (temperatura, pH, citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$) e sulfato de potássio (K_2SO_4) para a reposta atividade da esterase de soja.

Foi realizado um DCCR 2^4 para as variáveis temperatura, pH, sulfato de sódio e citrato de sódio. Os níveis estudados foram determinados com base nos experimentos univariáveis. A matriz experimental encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis utilizadas no delineamento central composto rotacional completo 2^4 .

Variáveis independentes/níveis	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Temperatura ($^{\circ}C$)	30	35	40	45	50
pH	7	7,5	8	8,5	9
$K_2SO_4^*$	0,5	1,37	2,25	3,12	4
Citrato Sódio*	8	9	10	11	12

*Concentração em mM.

$(2^n)^{1/4}$, n= número de variáveis independentes estudadas.

$\alpha = 1$

3. Resultados e discussão

Alguns resultados apresentados no capítulo 3 item 3.3 da caracterização da esterase de soja demonstraram que o citrato de sódio e sulfato de sódio têm a capacidade de elevar a atividade da esterase de soja. Foi realizado um experimento utilizando a metodologia de superfície de resposta para verificar o efeito da interação destes compostos com a temperatura e o pH na atividade da enzima. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Variáveis codificadas e valores reais (em parênteses) das variáveis do planejamento fatorial (DCCR) 2^4 , e valores de atividade enzimática (U.mg^{-1}) da esterase de soja.

Ensaio	Ordem de execução	Temperatura (°C)	pH	K_2SO_4	Citrato Sódico	Atividade Enzimática (U.mg^{-1})	Atividade Prevista pelo modelo	Resíduo
1	10	-1(35)	-1(7,5)	-1(1,37)	-1(9)	3,80	4,03	-0,23
2	23	-1(35)	-1(7,5)	-1(1,37)	1(11)	3,07	3,18	-0,12
3	2	-1(35)	-1(7,5)	1(3,12)	-1(9)	2,98	3,13	-0,15
4	29	-1(35)	-1(7,5)	1(3,12)	1(11)	3,77	3,76	-0,00
5	8	-1(35)	1(8,5)	-1(1,37)	-1(9)	4,07	2,88	1,18
6	11	-1(35)	1(8,5)	-1(1,37)	1(11)	0,00	1,16	1,16
7	19	-1(35)	1(8,5)	1(3,12)	-1(9)	0,00	1,17	-1,17
8	25	-1(35)	1(8,5)	1(3,12)	1(11)	0,00	0,92	-0,92
9	12	1(45)	-1(7,5)	-1(1,37)	-1(9)	1,99	1,74	0,24
10	15	1(45)	-1(7,5)	-1(1,37)	1(11)	2,23	1,99	0,24
11	5	1(45)	-1(7,5)	1(3,12)	-1(9)	2,21	1,98	0,23
12	9	1(45)	-1(7,5)	1(3,12)	1(11)	1,84	3,70	-1,87
13	20	1(45)	1(8,5)	-1(1,37)	-1(9)	0,34	1,27	-0,92
14	17	1(45)	1(8,5)	-1(1,37)	1(11)	0,09	0,63	-0,54
15	16	1(45)	1(8,5)	1(3,12)	-1(9)	0,11	0,68	-0,58
16	15	1(45)	1(8,5)	1(3,12)	1(11)	0,84	1,53	-0,69
17	28	-2(30)	0(8)	0(2,25)	0(10)	3,10	2,64	0,45
18	13	2(50)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,06	0,95	1,11
19	30	0(40)	-2(8,5)	0(2,25)	0(10)	1,75	1,75	-0,00
20	27	0(40)	2(7)	0(2,25)	0(10)	0,00	1,57	1,57
21	3	0(40)	0(8)	-2(4)	0(10)	4,65	4,19	0,46
22	9	0(40)	0(8)	2(0,5)	0(10)	5,30	4,19	1,10
23	26	0(40)	0(8)	0(2,25)	-2(8)	2,60	2,36	0,24
24	25	0(40)	0(8)	0(2,25)	2(12)	3,54	2,36	1,17
25 (C)	13	0(40)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,49	2,36	0,13
26 (C)	14	0(40)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,38	2,36	0,01
27 (C)	20	0(40)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,04	2,36	-0,33
28 (C)	18	0(40)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,74	2,36	0,37
29 (C)	21	0(40)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,21	2,36	-0,15
30 (C)	24	0(40)	0(8)	0(2,25)	0(10)	2,43	2,36	0,06

DCCR= delineamento composto central rotacional $\alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 2$

n= número de variáveis estudadas

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão de cada variável, bem como de suas interações.

Tabela 3: Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo para atividade enzimática (U.mg^{-1}) da esterase de soja.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(5)	p-valor
Média/interação*	2,382*	0,098	24,279	$2,21.10^{-6}$
Temperatura(L) *	-0,843*	0,098	-8,597	$3,51.10^{-4}$
Temperatura(Q) *	-0,290*	0,092	-3,156	$2,52.10^{-2}$
pH(L) *	-1,662*	0,098	-16,939	$1,31.10^{-5}$
pH(Q) *	-1,142*	0,092	-12,446	$5,94.10^{-5}$
$\text{K}_2\text{SO}_4(\text{L})$	-0,212	0,098	-2,158	$8,34.10^{-2}$
$\text{K}_2\text{SO}_4(\text{Q})$ *	0,908*	0,092	9,894	$1,80.10^{-4}$
Citrato de sódio (L)	-0,148	0,098	-1,512	$1,91.10^{-1}$
Citrato de sódio(Q)	-0,045	0,092	-0,486	$6,48.10^{-1}$
Temperatura x pH*	0,333*	0,120	2,768	$3,95.10^{-2}$
Temperatura x K_2SO_4 *	0,568*	0,120	4,724	$5,23.10^{-3}$
Temperatura x citrato de sódio*	0,545*	0,120	4,536	$6,19.10^{-3}$
pH x K_2SO_4 *	-0,408*	0,120	-3,392	$1,94.10^{-2}$
pH x citrato de sódio*	-0,440*	0,120	-3,662	$1,46.10^{-2}$
K_2SO_4 x citrato de sódio*	0,745*	0,120	6,201	$1,59.10^{-3}$

$R^2 = 0,72$, * Fatores com efeito significativo ($p < 0,05$).

As reações foram conduzidas conforme item 1.2.1.1

Pela Tabela 3 observa-se que para a atividade enzimática, foram significativos os termos lineares e quadráticos para temperatura e pH, e o termo quadrático para K_2SO_4 a 5% de significância ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação para a atividade enzimática foi de 72%. A ANOVA (Tabela 4) indica que a regressão não foi altamente significativa a 95% de confiança. Embora, o coeficiente de correlação não tenha sido satisfatório, e o valor de $F_{\text{calculado}}$ ser bem próximo ao do F_{tabelado} , para esse tipo de experimento esse valor pode ser considerado regular, uma vez que estamos trabalhando com atividade enzimática, e o substrato utilizado para avaliar a atividade da enzima era bastante instável. O modelo foi retirado a fim de prever reações catalisadas pela esterase de soja. O

modelo codificado contendo os termos significativos pode ser observado na Equação 1.

Equação 1: Atividade máxima ($U \cdot mg^{-1}$)= $2,38 - 0,84Temp - 0,29Tem^2 - 1,66pH - 1,13pH^2 + 0,91(K_2SO_4)^2 + 0,33Temp \times pH + 0,56 Tem \times (K_2SO_4) + 0,54 Temp \times citrato - 0,40 pH \times citrato - 0,43pH \times (K_2SO_4) + 0,74citrato \times (K_2SO_4)$.

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo real aos pontos codificados.

Fator	Soma de quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrados médios (QM)	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão(R)	43,11778	14	3,079	3,17	2,27
Resíduo (r)	17,45924	18	0,969		
Total (T)	60,58	32			

%de variação explica: $R^2 = 72\%$; $F_{cal} = 3,95$; $F_{14,18} = 2,27$

As Figuras 1 (a e b) e 2 (a e b) ilustram, respectivamente, os efeitos das interações entre o pH e temperatura; e pH e sulfato de potássio na atividade da esterase de soja.

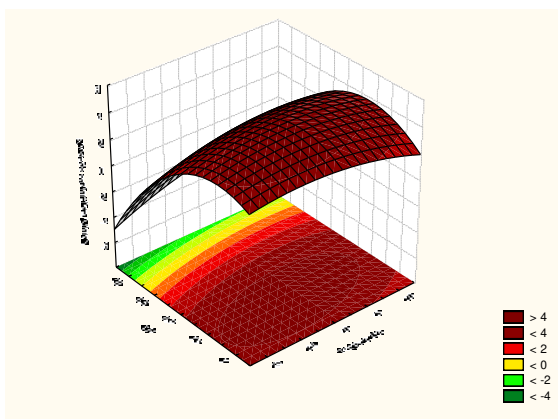


Figura 1a: Superfície de resposta da interação entre o pH e a temperatura na atividade enzimática.

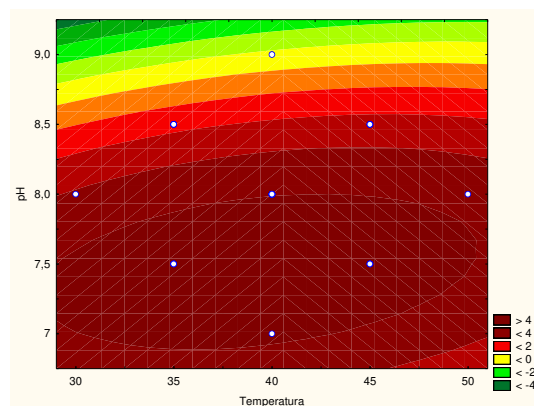


Figura 1b: Superfície de contorno da interação entre o pH e a temperatura na atividade enzimática.

Os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos nos menores valores de pH de 7 a 7,5; e temperatura entre 30 a 50°C.

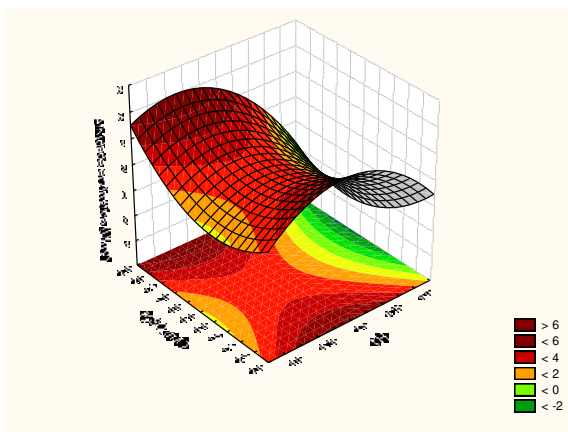


Figura 2a: Superfície de resposta para interação de pH e sulfato de potássio (K_2SO_4) na atividade enzimática

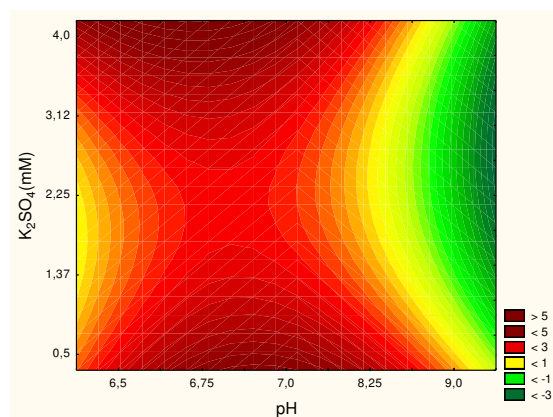


Figura 2b: Superfície de contorno para interação de pH e sulfato de potássio (K_2SO_4) na atividade enzimática.

Pelas Figuras 2(a e b), nota-se que não se obteve um ponto ótimo para condição entre o pH e sulfato de sódio na atividade enzimática, no entanto, observou-se que concentrações próximas a 0,5

ou a 4,0mM favoreceram para um aumento da atividade enzimática. O sulfato de potássio não demonstrou ter um efeito linear na atividade da enzima, e sim, um efeito quadrático conforme resultados na Tabela 2.

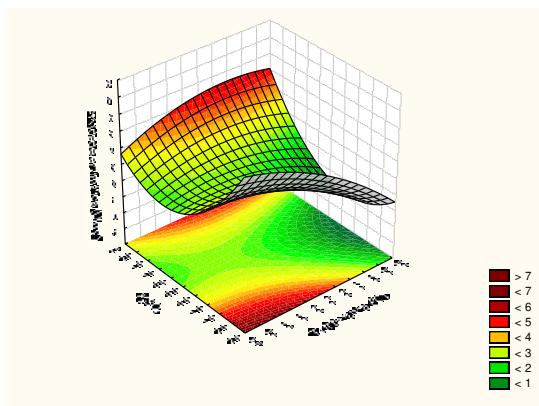


Figura 3a: Superfície de resposta para interação entre temperatura e fosfato de potássio (K_2SO_4).

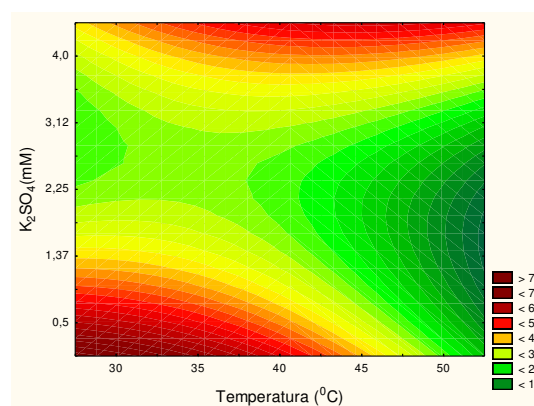


Figura 3b: Superfície de contorno para interação entre temperatura e fosfato de potássio (K_2SO_4).

Não foi observado também um ponto ótimo na interação entre a temperatura e o K_2SO_4 na atividade da enzima. Observando a Figura 3a, os resultados indicaram que concentrações do sal abaixo de 0,5 ou acima de 4,0mM, pareceram favorecer a atividade da enzima.

Foram realizados mais alguns testes para confirmar que as condições do ensaio 22 do planejamento experimental (Tabela 1) representam realmente as melhores condições para a atividade da enzima (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade enzimática da esterase de soja em pH7,5 e temperatura 40°C.

Ensaio	Atividade enzimática (U.mg ⁻¹)	Média
1	5,83	5,78±0,25
2	5,32	
3	5,76	
4	5,40	

Os resultados de atividade enzimática demonstrados na Tabela 5 são semelhantes aos resultados do ensaio 22 (Tabela 2), do planejamento experimental, confirmando que a esterase de soja realmente tem melhor atividade em pH 8,0 a 40°C.

Conclusão

A esterase de soja apresentou atividade ótima em pH 8 e a 40°C. No estudo do efeito do citrato e sulfato de sódio, pH e temperatura por planejamento experimental, verificou-se que esses sais não apresentaram efeito ativador na esterase de soja. A esterase de soja pode ser extraída por processo simples e econômico, e dependendo da aplicação pode ser utilizada na forma bruta, sem a necessidade de etapas de purificação.

Referências

- Aizono, Y.; Funatsu, M.; Sugano, M.; Hayashi, K.; Fujiki, Y. Enzymatic properties of rice bran lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, p. 2031-2036, 1973.
- Enujiagha, V. N.; Thani, F. A.; Sanni, T. M.; Abigor, R. D. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). **Food Chemistry**, v. 88, p. 405-410, 2004.
- Er-zehng, S.; Ying, Z.; Peng-yong, Y.; Dong-zhi, W. Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. **Journal Shanghai of University (Engl. Ed)**, v. 14, p. 137-144, 2010.
- Faber, K. Em *Biotransformation in Organic Chemistry*. pp. (5° ed.). Springer-Verlag, Berlin, 2004.
- Freire, G. D. M.; Castilho, F. L. R. Lipases em Biocatálise. pp. 369-385. In: Enzimas em biotecnologia produção, aplicação e mercado. Bom, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. (ed). Interciências, Rio de Janeiro, BR, 2008.
- Hellyer, S. A.; Chandler, I. C.; Bosley, J. A. Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1440, p. 215-224, 1999.
- Kermasha, S.; van de Voort, F. R. Characterization of French bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 19, p. 23-27, 1986.
- Macedo, G. A., Pio, T. F. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 388-394, 2005.
- Paques, F. W.; Macedo, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.
- Polizelli, P. P.; Tiera, M. J.; Bonilla-Rodriguez, G. O. Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 749-753, 2008.
- Staubmam, R.; Ncube, I.; Gübitz, G. M.; Steiner, W.; Read, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.

Villeneuve, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 308-317, 2003.

Yesiloglu, Y.; Baskurt, L. Partial purification and characterization of almond seed lipase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 397-410, 2008.

CAPÍTULO 4: EFFECT OF DIFFERENT SURFACTANTS AND POLYETHYLENE GLYCOL ON THE STABILITY OF A SOYBEAN SEED ESTERASE (*Glycine max* L.)

Márcio de Barros^{1*} and Gabriela Alves Macedo¹

Abstract

Esterases and lipases from oilseeds have a great potential for commercial exploitation as industrial enzymes. Esterases and lipases are used mixed with surfactants in cleaning and other formulated products, and, accordingly, both components must be compatible with each other. This work presents the results of the effects of anionic, cationic and nonionic surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a crude esterase extracted from soybeans (*Glycine max* L.). The assays were carried out using *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB) as the substrate at pH 7.0 and 25°C. The activity was only enhanced by the cationic surfactants CTAB and TTAB at a concentration of 3.0 mM. The anionic surfactant showed a positive effect on enzyme activity at the concentrations of 1.5 and 3.0 mM. Aqueous solutions of PEG activated the esterase and maximum activation (170%) occurred with the addition of 6kDa PEG. This effect on the lipase could be due to exposition of some hydrophobic residues located in the vicinity of the active site or to aggregation. The 0.4kDa and 10kDa PEGs enhanced the enzyme stability at 40°C.

Keywords: Oilseed, Esterase, Surfactants, Polyethylene glycol, Temperature.

1. Introduction

Biocatalysis is currently one of the most promising fields in the new technologies for the synthesis of compounds of high value. The exploitation of biodiversity in the search for new catalysts using selection techniques for microorganisms, plant or animal cells, represents the traditional methods of discovery of new enzymes for the development of industrial-scale biocatalysis [1, 2]. Within this context lipolytic enzymes from seeds such as lipases and esterases, have attracted attention as biocatalysts. These enzymes have advantages when compared to animal and microbial esterases and lipases such as: specificity, low cost and a great alternative to the commercial exploitation of industrial enzymes [3, 4].

Esterases EC. 3.1.1.1 and lipases EC. 3.1.1.3 are widely distributed amongst animals, plant seeds and microorganisms. They can hydrolyze triacylglycerols into fatty acids and glycerol. The isolation of new lipolytic activity from living organisms has attracted much interest because of their many potential applications in synthetic reactions. The applications of lipases in industry include the synthesis of food ingredients, pharmaceuticals, agrochemicals, fragrances, flavors, and textiles. Lipases are also used as additives in detergents [5, 6, 7, 8].

The biological function of lipases and esterases is mediated by an interaction between lipid and water interfaces that affects their activity [9]. Surfactant-enzyme interactions in aqueous solutions have been extensively studied for technical applications, such as drug delivery, cosmetics and detergency, and for studying interactions between membrane proteins and lipids [10], and thus the two components must be compatible with each other.

Esterases and lipases improve the washing capacity of the protease-containing detergents and improve the removal of fatty food stains and sebum from fabrics, substances which are difficult to remove under normal washing conditions [11]. Another important factor is that using hydrolytic enzymes (lipases or

esterases, proteases, amylases) in detergent formulations, allows for laundering at lower temperatures, and thus reduces energy expenditure [12]. Accordingly, lipolytic enzymes must be characterized in terms of their stability towards surfactants [13-15].

Some authors have reported that PEG can enhance the activity and stability of lipases [2]. Polyethylene glycol (PEG) is a synthetic polymer with low toxicity, soluble in aqueous solution, and widely used in industrial biotechnological processes [12].

In the present work the effect of PEG was studied, and the influence of surfactant charge and chain length on the activity of an esterase from *Glycine max* L. seed, investigated.

2. Experimental Procedures

2.1 Materials

The soybean seeds studied were kindly donated by the Brazilian industry VITAO, and the esterase was extracted from the soybeans using a modification of the procedure described by Aizono et al. [17]. Post germinated seeds were suspended in a 1×10^{-3} M CaCl_2 solution and blended for 3 min at 4°C in a Waring blender. The samples were transferred to conical flasks, stirred mechanically at 4°C for 30min, and then subjected to ultrasound (125W at 200 kHz) for 1 min in an effort to release the bound enzyme. The resulting suspension was centrifuged at $2000 \times g$ for 45min, the supernatant collected and freeze dried for 48 h. The powder obtained was stored at -18°C and used as the enzyme source. The soybean grains were germinated for 24 h in the dark, after soaking at room temperature for 24h. The enzyme obtained is an esterase, as demonstrated in assays using triacetin as the substrate. The enzyme showed maximum activity at 40°C and pH 8.5. The surfactants sodium dodecyl sulfate (SDS), tetradecylmethylammonium bromide (TTAB), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and 4-dodecyldimethyl ammonium butyrate (DAB) were purchased from Sigma-Aldrich Co. The reagents,

Triton X-100, Tween 20 and Tween 80 (Vetec, Brazil) and different molecular weight PEGs (Fluka, Switzerland) were used as provided.

2.2 Methods

2.2.1 Protein Concentration

The protein concentration was determined according to the method of Bradford [18], using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

2.2.2 Enzyme Assay

Esterase activity was determined spectrophotometrically at 405nm, following the hydrolysis of the substrate *p*-nitrophenyl-butyrate (*p*NPB). An aliquot (0.070 mL) of a solution containing 100mg.mL⁻¹ freeze dried esterase powder was added to 3.43 mL of a reaction mixture containing the following: 1.12 mM *p*NPB dissolved in 50mM phosphate buffer pH at 7.0, plus 0.2% (N/P) Triton X-100 and 0.42 M tetrahydrofuran. The enzymatic reaction was carried out for a period of 5 min at 37°C, and monitored for one minute against a blank solution. One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme required to release one micromole of *p*-nitrophenol per minute under the standard assay conditions [19].

2.2.3 Effects of Surfactants

The effects of surfactants on esterase activity were studied by carrying out the assays with different surfactant concentrations (0–50 mM). Sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium octyl sulfate (SOS), tauricholic acid, cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB), tetradecyl trimethylammonium bromide (TTAB), Triton X-100 and Tween 80 were used.

The esterase stability was estimated by pre-incubating the enzyme with 10 mM of each surfactant at 25°C, in the presence or otherwise of 10 mM calcium chloride. Aliquots were withdrawn at intervals and assayed from 0–240 min.

2.2.4 Effects of Polyethylene Glycol (PEG)

The effects of different molecular weight PEGs (0.4, 6 and 10 kDa) on enzymatic activity were studied at a range of concentrations from 0 to 25 mM, 37 °C and pH 7.0. The enzyme stability was measured by pre-incubating the enzyme with a 10 mM concentration of the different MW PEGs and performing the test at 25 °C and 40°C at pH 7.0. Aliquots were withdrawn at intervals and used for the assay.

3. Results and Discussion

3.1 Effects of surfactants

As shown in Fig. 1, Tween 20, 80 and Triton X-100 showed inhibitory effects on enzymatic activity in the concentration range tested.

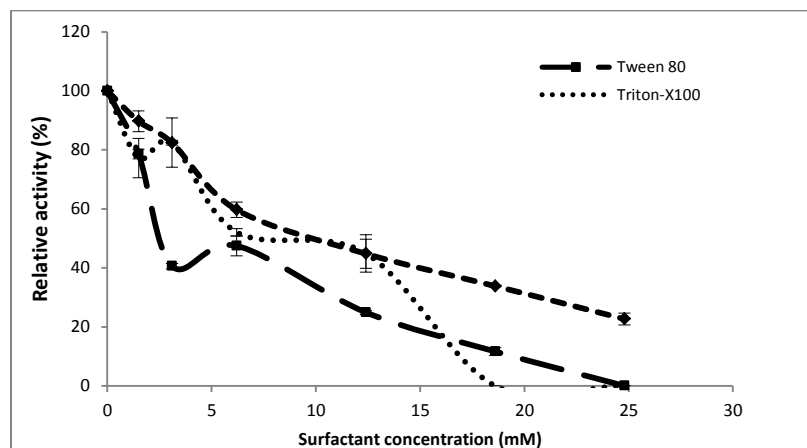


Figure 1: Effect of nonionic surfactants concentration on lipase activity using *p*NPB as substrate at 25 °C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

All the nonionic surfactants showed a negative effect on the esterase activity. However, Tween 80 showed the most pronounced negative effect as compared to the others.

Fahmy et al. [5] studied the effect of the concentration of Triton X-100 5mM on the esterase activity obtained from *Curcubita pepo* cv. seed. The authors

observed a decrease of 54% in the relative enzymatic activity. The same situation was observed with the lipase from (*Pachira aquatica* L.) as studied by Polizelli et al. [8]. The enzyme showed a decrease in lipolytic activity when Triton X-100 and Tween 80 were in the reactive medium.

Diaz et al. [20] studied the effect of Triton X-100 on the *Rhizopus homothallicus* lipase, and observed enhanced enzymatic activity. The authors reported that the presence of the surfactant in the reactive medium favored a conformational change in the enzyme, and this conformational change enhanced the enzymatic activity.

A stimulating effect of surfactants on enzymatic hydrolysis has been reported in several papers. Explanations for the effect of the surfactants include an increase in enzyme stability and increasing accessibility of the substrate [21].

A surfactant–protein interaction involves some kind of protein denaturation. However, the reduced activity can be caused by other factors apart from conformational changes of the protein. Gargouri et al. [22] related the inhibition of pancreatic lipase activity by tensoactive substances to desorption of the enzyme from its substrate, occurring after a change in the interfacial quality.

In order to explain the correlation between surfactant concentration and the decrease in enzymatic activity, it can be conjectured that the active site is occupied by surfactant molecules when it reaches a certain concentration, or alternatively by an interaction of the substrate molecules with the surfactants [2].

The effect of cationic surfactants on the activity of the soybean seed esterase is shown in Fig. 2.

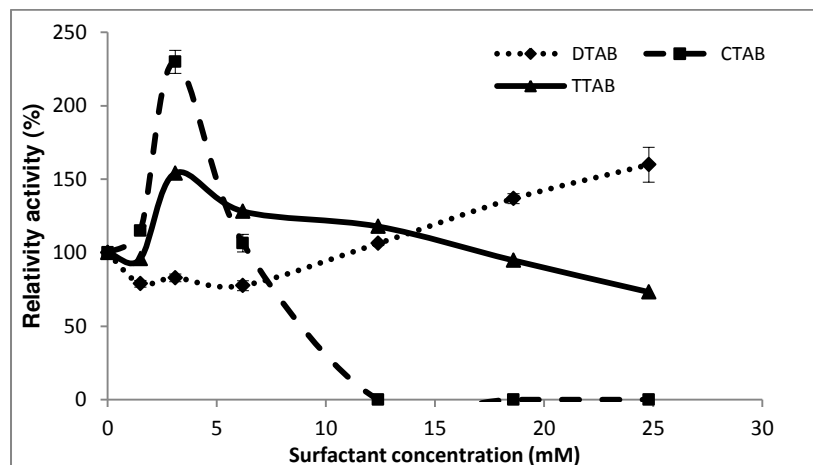


Figure 2: The effect of cationic surfactant concentration on esterase activity using *p*NPB as the substrate at 25 °C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

Of the cationic surfactants studied, significant increases in relative activity were observed when CTAB was used at concentrations of 1.5 and 3.1mM, showing relative activities of 115 and 229%, respectively. High concentrations of CTAB strongly inhibited the enzymatic activity and the effect seems to be proportional to the chain length (CTAB>TTAB>DTAB). This behavior could also be due to micelle formation, because CTAB has a low critical micelle concentration (cmc), facilitating the substrate enzyme interaction [2]. The same situation was observed when TTAB was used at a concentration of 3.1mM, reaching 154% of relative activity. However when DTAB was used, an increase in enzymatic activity was only favored at concentrations above 10mM. The effect of anionic surfactants on the activity of the soybean seed esterase is shown in Fig. 2.

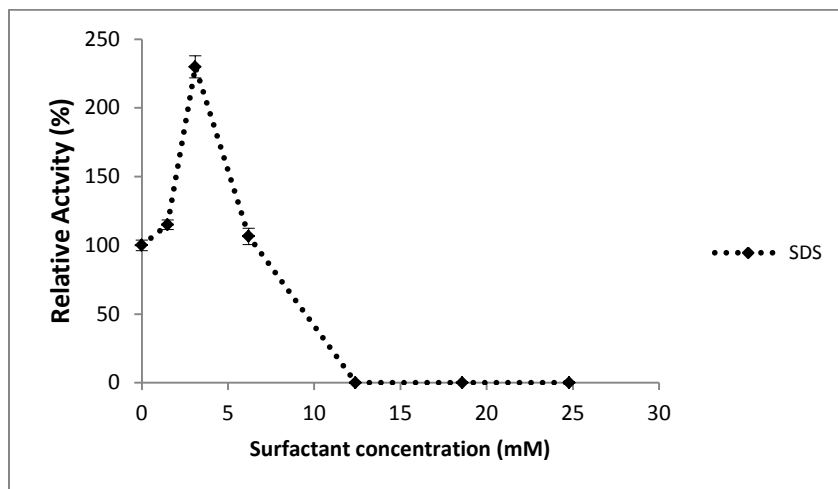


Figure 3: Effect of anionic surfactant concentration on esterase activity using pNPB as the substrate at 25 °C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

In the presence of SDS at concentrations of 1.5 and 3.1 mM, a significant increase in the relative activity of the esterase was observed at 115 and 229%, respectively. High concentrations of SDS led to an inhibition of the enzymatic activity.

3.2 Effect of Polyethylene Glycol

The incubation of the soybean seed esterase with various concentrations of 0.4, 6 and 10 kDa PEG increased the hydrolytic activity in aqueous solution (Fig. 4) as described by Polizelli et al [2] when studying the lipase from *Pachira aquatica*.

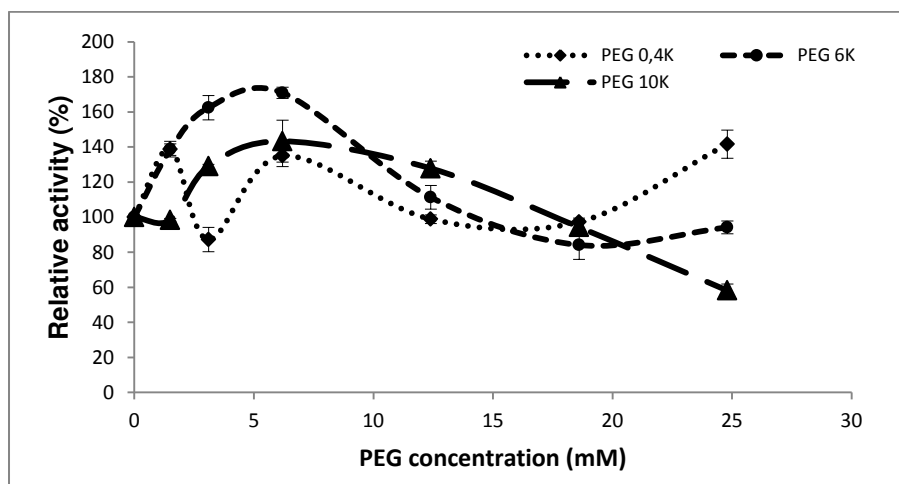


Figure 4: Esterase activity in the presence of PEG. The assays were carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

The relative enzymatic activity was more pronounced using 0.6kDa PEG at a concentration of 6 μ M (170%). The 10kDa and 0.4kDa PEGs also enhanced the lipolytic activity of the soybean esterase. No increase compatible with the increase in PEG molecular weight was observed, as described by Pancera [23] and Otera [24].

This behavior could be due to an enhancement of the hydrophobicity, promoted by the increase in chain length, as suggested by Forciniti et al. [25], facilitating the coupling of the substrate at the active site, or even by reduced the water activity and favoring the exposure of hydrophobic residues, or due to enzyme aggregation. A comparative analysis of the crystallographic models of iso-lipases from *Candida rugosa*, suggests a role for PEG in enzyme activation, and further stabilization of the active form via dimerization in aqueous media [24].

The esterase was stable in the presence of the 0.4 kDa, 6kDa and 10kDa PEGs, maintaining significantly higher activity as compared to the control after 4 hours (Fig. 5).

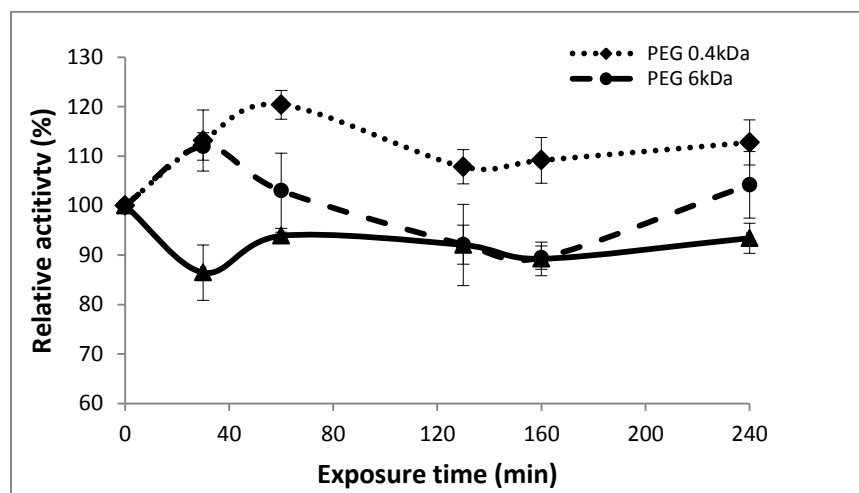


Figure 5: Esterase stability in the presence of 10mM PEG at 25°C. The assays were carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0 . Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

The esterase showed greater stability in 0.4kDa PEG. A decrease in enzymatic activity was observed with an increase in PEG molecular weight. These results agree with previously reported results that indicated that when the molecular mass of the PEG was greater than $1,000 \text{ g.mol}^{-1}$, the chains were excluded from the larger aqueous areas around the protein; larger chains can dehydrate the protein [26].

The stability of the esterase in PEG at 40°C was also observed. Previous studies (data not shown) demonstrated that soybean esterase had optimum activity at 40°C, but low stability. Thus this part of the work aimed to observe if the presence of PEG could increase the esterase activity (Fig.6).

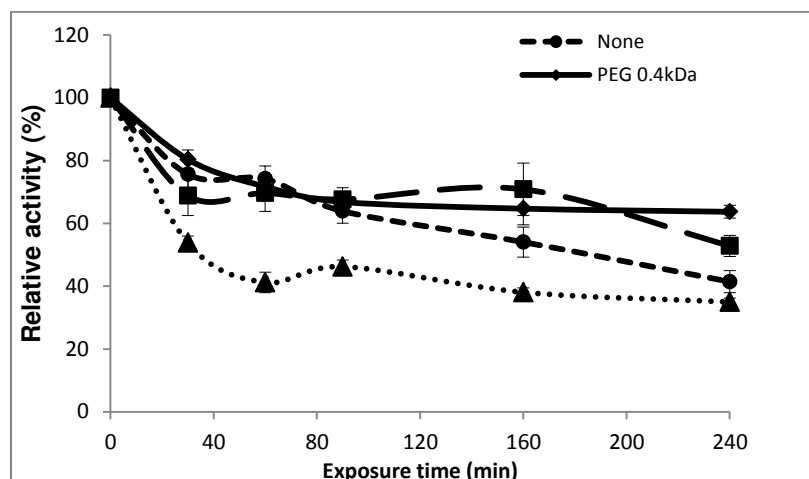


Figure 6: Esterase stability in the presence of 10mM PEG (0.4kDa, 6kDa and 10kDa) at 40°C. The assays were carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

The 0.4kDa and 10kDa PEGs increased the enzymatic activity at 40°C.

Esterase stability was also studied in the presence of surfactants with and without the presence of 10 mM CaCl_2 (Fig 7).

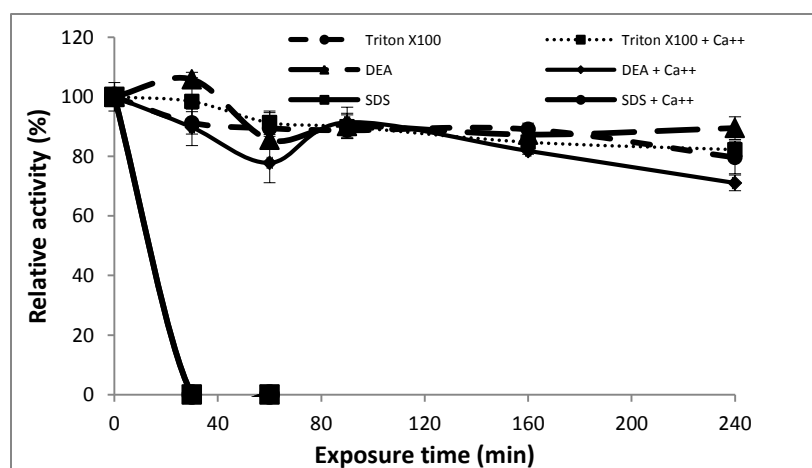


Figure 7: Esterase stability in the presence of surfactants with and without the presence of 10mM CaCl_2 at 25°C. The assay was carried out using *p*NPB as the substrate at 37°C and pH 7.0. Each point is the average of three replicates $\pm$ SD.

The enzyme showed great stability in Triton X100 and DEA with and without the presence of CaCl_2 . However, in the presence of SDS the enzyme showed low stability with or without the presence of CaCl_2 . Ca^{++} ions are known to provide a stabilizing effect on the 3D structure of any lipase, but surfactant aggregates and interactions with Ca^{++} micelles compete favorably for bound calcium ions with the enzymes [26]. In this work no difference was observed in esterase activity with or without the presence of Ca^{++} , so the soybean esterase is not Ca^{++} dependent.

3. Conclusions

The soybean esterase showed high activity in cationic surfactants (TTAB and DAB) and increased activity and stability in PEG. Such characteristics demonstrated that this esterase had the potential for use in the detergent industry.

References

1. Carvalho PO, Calafatti AS, Marassi M, de Silva DM, Contesini FJ (2005) Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova* 28: 614-621
2. Polizelli PP, Tiera MJ, Bonilla-Rodriguez GO (2008) Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. *J Am Oil Chem Soc* 85:749-753
3. Tüter M, Secundo F, Riva S, Aksoy H A, Ustun G (2003) Seed lipase and its application in transesterification reactions. *J Am Oil Chem Soc* 75: 417-421
4. Barros M, Fleuri LF, Macedo GA (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Braz J Chem Eng* 27:15-29
5. Fahmy AS, Abo-Zeid AZ, Mohamed TM, Ghanem HM, Borai HI, Mohamed SA (2008) Characterization of esterases from *Cucurbita pepo* cv. *Bioresource Technol* 99:437-443
6. Isbilir SS, Ozcan HM, Yagar H (2008) Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds. *J Am Oil Chem Soc* 85:227-233
7. Er-zhng S, Ying Z, Peng-yong Y, Dong-zhi W (2010) Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: activity comparison, purification and characterization. *J Shangai University* 14:137-144
8. Polizelli PP, Facchini FD, Cabral H, Bonilla-Rodriguez GO (2008) A new isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). *App Biochem Biotechol* 150:233-242
9. Myake Y, Ohkubo M, Teramoto M (1991) Lipase-catalyzed hydrolysis of 2-naphthyl esters in biphasic system. *Biotechnol Bioeng* 38(1):30-36
10. Saveli G, Spreti N, Di profio P (2000) Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 5:111-117
11. Antrin RL, Buchert J, Burrows H, Herbots I, Kottwitz B, Lenting HBM, Niku-Paavola M-L, Reilly PJ, Suurnäkki A, Viikari L (2004) Industrial enzymes: enzymes in nonfood applications. In: Aehle W (ed) *Enzymes in industrial*, 2nd edn. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, KGaA, Germany, pp 155-244
12. Davranov K (1994) Microbial lipases in biotechnology. *Appl Biochem Microbiol* 30:427-432
13. Stamatis H, Xenakis A, Kolisis FN (1999) Bioorganic reactions in microemulsions the case of lipase. *Biotechnology Adv* 17(4-5):293-318

14. Holmberg K (1994) Organic and bioorganic reactions in microemulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 8:187-196
15. Holmberg K (2003) Organic reactions in microemulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 8:187-196
16. Johansson G (1967) Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. Plenum Press, New York
17. Aizono Y, Funatsu M, Sugano M, Hayashi K, Fujiki Y (1973) Enzymatic properties of rice bran lipase. *Agric Biol Chem* 37: 2031-2036
18. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 39:239-247
19. Pio TF, Macedo GA (2007) Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme Microb Tech* 41:613-619
20. Diaz JC, Baratti J, Cordova J, Carriere F, Abousalham A (2007) Effect of nonionic surfactants on *Rhizopus homothallicus* lipase activity. *Mol Biotechnology* 35:205-214
21. Kristensen JB, Börjesson J, Bruun MH, Tjerneld F, Jorgensen H (2007) Use of surfactant active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocelluloses. *Enzyme Microb Technol* 40:888-895
22. Gargouri Y, Julien R, Bois AG, Verger R, Sarda L (1983) Studies on the detergent inhibition of pancreatic lipase activity. *J Lipid Res* 24:136:1342.
23. Pancera SM, da Silva LHM, Loh W, Itri R, Pessoa A, Petri DFS (2002) The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. *Colloids Surf B Biointerfaces* 26(4):291-300
24. Otero C, Fernández-Pérez M, Hermoso JA, Ripio MM (2005) Activation in the family of *Candida rugosa* islipases by polyethylene glycol. *J Mol Catal B Enzym* 32:225-229
25. Forciniti D, Hall CK, Kula MR (1991) Protein partitioning at the isoelectric point-influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. *Biotechnol Bioeng* 38(9):986:994
26. Stoner MR, Dale DA, Gualfetti PJ, Becker T, Randolph TW (2005) Ca²⁺-surfactant interactions affect enzyme stability in detergent solutions. *Biotechnology Prog* 21:1716-1723

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA TEMPERATURA NA TERMOESTABILIDADE DA ESTERASE DE SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* L.)

Márcio de Barros^{1*} e Gabriela Alves Macedo¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos,

Faculdade de Engenharia de Alimentos P.O. Box: 6121,

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,

13083-970, Campinas, SP, Brasil

Resumo

Neste trabalho foi realizada a caracterização da esterase de soja, presente no extrato bruto liofilizado da semente, quanto à estabilidade térmica, determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da inativação térmica. A esterase de soja demonstrou ser uma enzima estável, nas temperaturas avaliadas. A meia vida da enzima a 40 e 45°C foi 203 e 108 minutos, respectivamente. A partir dos valores da termoestabilidade foi calculado à energia de ativação necessária para desnaturação da enzima cujo valor foi de 59,4 kJ.mol⁻¹. A esterase de soja apresentou valores de K_m e V_{max} para o substrato *p*-nitrofenil butirato, iguais a 3,90mM e 18,55mM.mg⁻¹min⁻¹, respectivamente.

1. Introdução

Esterases pertencem ao grupo das hidrolases (carboxil-ester hidrolases; EC. 3.1.1.1). Elas catalizam a formação ou clivagem de ligações éster de substratos solúveis em água. Similar às lipases, o complexo acil-enzima no sítio ativo é formado via resíduo de serina. Por causa da disponibilidade, especialmente das esterases microbianas, estas são interessantes para aplicação em processos industriais. Esterases e lipases microbianas podem promover a qualidade ou acelerar a maturação de queijos, cura do bacon e salsichas fermentadas. As esterases são amplamente usadas também para a resolução de misturas de compostos racêmicos, e produzir enantiômeros puros (Fahmy et al., 2008).

Esterases têm sido isoladas de tecidos animais bem como micro-organismos e plantas. Várias formas de esterase foram isoladas de tecidos vegetais incluindo folhas (Chandra e Toole, 1977) e sementes (Barros, Fleuri e Macedo, 2010; Polizelli et al., 2008; Parques and Macedo, 2006; Enujiagha et al., 2004; Villeneuve, 2003; Hellyer, Chandler e Bosley, 1999).

Recentemente, esterases de sementes têm sido foco de atenção como biocatalisador. Em alguns casos, estas enzimas apresentam vantagens quando comparada às esterases de origem animal e microbiana devido algumas características bastante interessantes, tais como especificidade, baixo custo para obtenção, disponibilidade e facilidade para purificação; características que atribuem a esta enzima grande potencial de aplicação industrial (Barros e Macedo, 2010; Fahmy et al., 2008).

Entretanto, um dos problemas para aplicação industrial de enzima é a falta de estabilidade a temperaturas elevadas. A aplicação de enzimas em processos industriais depende da termoestabilidade da mesma durante a preparação, estocagem e aplicação em alguns casos em temperaturas elevadas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a termoestabilidade da esterase de sementes de soja (*Glycine max* L.).

2. Material e métodos

2.1 Material

As sementes de soja estudadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela indústria brasileira VITAO.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração da enzima

As enzimas foram extraídas utilizando o método descrito por Aizono et al. (1973) modificado por Kermasha e van de Voort (1986). Uma alíquota de 150 gramas (em massa seca) de semente foi triturada e a farinha obtida foi ressuspensa em uma solução contendo 1.10^{-3}M CaCl_2 e homogeneizados em liquidificador a 4°C por 3 minutos. A amostra foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, agitado mecanicamente a 5°C por 30 minutos, e então, submetida a ultra-som (125W a 200W) por 1 minuto para a liberação da enzima ligada. A suspensão resultante foi centrifugada a $2000\times g$ por 45 minutos, para retirada dos resíduos suspensos. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado congelado. A atividade esterásica do pó liofilizado foi determinada como descrita no item 2.2.1.

2.2.2 Concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976) usando albumina de soro bovina como padrão.

2.2.3 Atividade Enzimática

A atividade de esterase do extrato bruto de soja foi determinada espectrofotometricamente pela hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil butirato (pNPB). Foram adicionados 0,07 mL do sobrenadante do extrato bruto a 3,430 mL de uma solução contendo: 1,12 mM de (pNPB), tampão fosfato 50 mM pH 7,0, Triton X-100 0,2% (v/v) e tetrahidrofurano 0,43 M. Junto ao meio de reação foram adicionados o citrato de sódio e o sulfato de potássio. As leituras foram feitas após

5 minutos de reação a 405 nm. Uma unidade de atividade esterásica foi definida como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado (em μmol) por minuto por mL do sobrenadante, sob as condições especificadas (Macedo and Pio 2005).

Foi preparada uma curva padrão, utilizando diferentes concentrações de (pNPB) para ser utilizada na determinação da atividade enzimática.

2.2.4 Estudo da estabilidade da enzima

2.2.4.1 Estudo da termoestabilidade da esterase de soja

Frascos contendo 3 mL da solução do extrato bruto de soja como fonte da enzima esterase, obtida conforme descritos acima foram incubados a 25, 30, 35, 40 e 45°C. Alíquotas de 0,07mL foram retiradas em diferentes períodos de tempo (30, 60, 90, 160 e 240 minutos) para as temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C; e para a temperatura de 45°C (10, 20, 40, 60 e 120 minutos) e imediatamente resfriada em banho de gelo por 3 minutos. Em seguida, foi determinada a atividade residual da esterase de soja usando o método descrito no item 2.2.3. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Considerou-se a atividade da amostra sem incubação como 100% e a atividade relativa da enzima foi calculada como apresentada na Equação 1:

$$\text{Equação 1: } A = (U_t / U_0) * 100$$

Onde A é atividade relativa da esterase de soja (%); U_t equivale à média das atividades de esterase das triplicatas em cada tempo de acompanhamento e U_0 equivale à média das atividades de esterase em triplicatas sem tratamento térmico ($t = 0 \text{ min}$).

2.2.4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da esterase de soja

A partir dos valores de atividade residual obtidos no item (2.2.4.1) foram determinados os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da esterase de soja (*Glycine max* L.).

Inicialmente, os dados do estudo da termoestabilidade enzimática foram ajustados graficamente em modelos de curvas teóricas para verificar o perfil de cinética de desnaturação enzimática seguido pela esterase de soja. Em seguida foram determinados de acordo com Marangoni (2003) os parâmetros cinéticos K_d , $T_{1/2}$, valor D , valor Z , e os parâmetros termodinâmicos E_{ad} , ΔH , ΔG e ΔS , conforme descrito abaixo:

2.2.4.3 Constante de desnaturação (K_d)

Considerando-se um modelo de cinética de desnaturação enzimática de primeira ordem para a esterase de soja, pode-se escrever a Equação 2:

$$\text{Equação 2: } -r_d = -\frac{dU}{dt} = K_d \cdot U$$

Onde r_d corresponde à taxa de desnaturação (U/t), U é a atividade enzimática em um determinado momento, t é o tempo em minutos e K_d é a taxa constante de desnaturação ($1/t$).

Por integração da Equação 2 tem-se a Equação 3:

$$\text{Equação 3: } U_t = U_0 \cdot e^{-K_d \cdot t}$$

Onde U_t corresponde à atividade enzimática após um período de tempo t e U_0 é a atividade enzimática inicial sem tratamento térmico.

Assim, os logaritmos naturais de U/U_0 obtidos ao longo do acompanhamento do estudo da termoestabilidade da esterase, de acordo com o item 2.2.4.2, foram plotados em função do tempo em minutos para o cálculo de K_d (min^{-1}). O valor da inclinação da reta de regressão linear dos dados experimentais foi considerado como sendo a constante de desnaturação (K_d) na temperatura avaliada.

2.2.4.4 Tempo de meia vida ($t_{1/2}$)

Corresponde ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura, para que uma enzima tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial. Este parâmetro foi determinado a partir de K_d , pela equação 4:

$$\text{Equação 4: } t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d}$$

2.2.4.5 Valor de redução decimal (valor D)

O valor D corresponde ao tempo necessário em minutos para reduzir a velocidade de reação a 10% do valor inicial. Este parâmetro foi calculado a partir da Equação 5:

$$\text{Equação 5: } D = \frac{2,3026}{K_d}$$

2.2.4.6 Valor Z

Este parâmetro indica a variação de temperatura requerida em um sistema para que ocorra redução decimal na velocidade de reação, ou seja, perda de 90% da atividade enzimática. O Valor Z foi determinado graficamente através do inverso da inclinação da reta obtida a partir da relação gráfica de $\log(D)$ *versus* temperatura.

2.2.4.7 Energia de ativação da desnaturação (E_{ad})

Considerando-se que a perda de atividade enzimática devido à desnaturação ocorre segundo uma taxa constante (K_d) nas diferentes temperaturas, uma estimativa da energia de ativação da desnaturação (E_{ad}) também pode ser determinada. A energia requerida para promover a ativação da desnaturação é conseguida através do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Arrhenius (Equação 6).

$$\text{Equação 6: } \ln k = \frac{-E_a + \ln K_d}{R \cdot T}$$

Onde k corresponde à velocidade de reação, E_a à energia de ativação aparente, R à constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e T à temperatura absoluta (K).

Assim, a energia requerida para promover a ativação da desnaturação foi determinada pela inclinação da reta ($-E_a/R$) obtida a partir da linearização proposta por Arrhenius na forma de $\ln(K_d)$ versus $1/T$.

2.2.4.8 Entalpia (ΔH)

A entalpia de desnaturação refere-se à quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima. Este parâmetro foi calculado para cada temperatura a partir da Equação 7:

$$\text{Equação 7: } \Delta H = E_{ad} - R \cdot T$$

2.2.4.9 Energia livre (ΔG)

Os valores de energia livre da inativação nas diferentes temperaturas foram calculados a partir da constante do processo de inativação, conforme a Equação 8.

$$\text{Equação 8: } \Delta G = -R \cdot T \cdot \frac{\ln K_d \cdot h}{K_B \cdot T}$$

Onde h é a constante de Planck ($6,6262 \times 10^{-34} \text{ J.s}$), K_B é a constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$).

2.2.4.10 Entropia (ΔS)

A entropia de desnaturação é a quantidade de energia por grau de temperatura envolvida na transição do estado nativo para o estado desnaturado. Este parâmetro foi calculado a partir da Equação 9.

$$\text{Equação 9: } \Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T}$$

3. Resultados e Discussão

Curvas da termoestabilidade da esterase de soja nas temperaturas de 25, 30, 35, 40 and 45°C estão demonstradas na Figura 1.

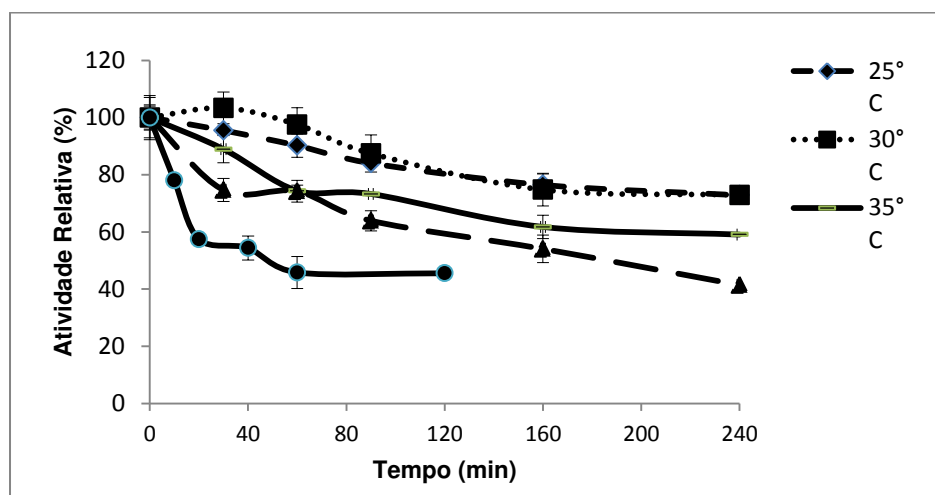


Figura 1: Estabilidade térmica da esterase de soja (*Glycine max* L.).

A Figura 1 ilustra que a atividade residual da esterase de soja decresceu com o tempo de incubação. A enzima manteve 50% de atividade relativa após 240 minutos de tratamento a 40°C. A lipase de *R. miehei* apresentou 90% de atividade relativa após 240 minutos de tratamento a 40°C.

A partir dos resultados obtidos anteriormente, foram calculados alguns parâmetros cinéticos e termodinâmicos da esterase de soja, visando obter informações sobre o processo de desnaturação térmica da enzima.

Vários comportamentos podem ser encontrados para descrever a cinética térmica de desnaturação de uma enzima (Longo e Combes, 1999). Foi observado que a esterase de soja segue uma cinética de desnaturação de primeira ordem. Isto significa que a desnaturação pode ocorrer em uma única etapa através da mudança do estado nativo (E) para o estado totalmente desnaturado (E_d), a partir

da ruptura de uma ligação importante para a enzima ou da deformação da estrutura tridimensional protéica (Longo e Combes, 1999; Maragoni, 2003).

A Figura 2 ilustra a cinética de desnaturação térmica da esterase de soja para as diferentes temperaturas estudadas. A desnaturação térmica da esterase em diferentes temperaturas pode ser distinguida pelas diferenças nas inclinações das retas de regressão linear. A esterase de soja mostrou-se estável a temperaturas abaixo de 45°C.

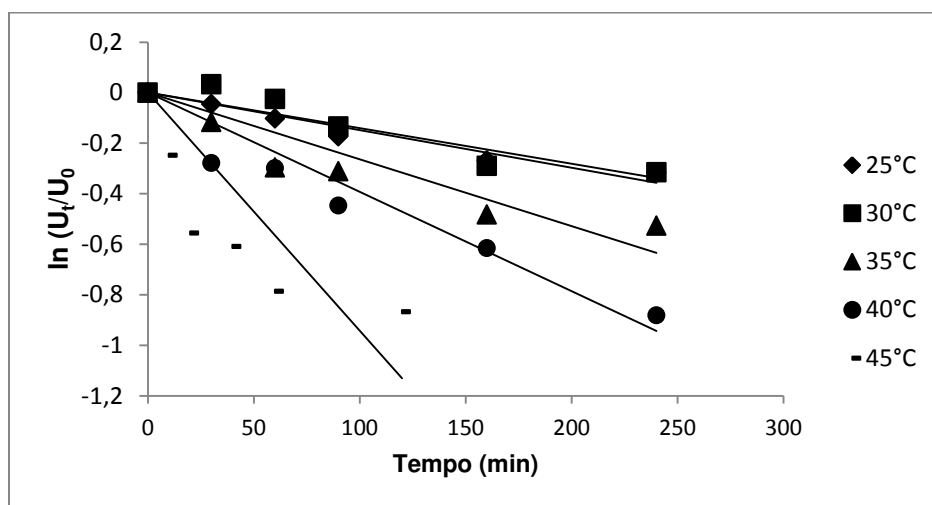


Figura 2: Cinética de desnaturação térmica da esterase de soja.

Foi observado que o valor da constante de desnaturação (K_d) aumentou mais de 50% quando a enzima foi incubada a 45°C em comparação com o valor de K_d a 30°C, ou seja, o K_d passou de 0,0014 min^{-1} para 0,0064 min^{-1} a 45°C. A lipase de *R. miehei* estudada por Noel e Combes (2003) apresentou um K_d de 0,0012 a 40°C.

A determinação do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de uma enzima em uma determinada temperatura é considerada um parâmetro crucial para aplicação industrial de biocatalisadores, uma vez que fornece informações sobre a atividade residual da enzima (Longo e Combes, 1999). Quanto ao parâmetro de meia vida

($t_{1/2}$) foi observado que a 25°C este foi de 495 minutos. Enquanto que nas temperaturas de 40°C e 45°C este foi de 203 e 108 minutos, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta os dados referentes à constante de desnaturação (K_d), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e da redução decimal(D) da esterase de soja.

Tabela 1: Perfil de K_d , da meia vida ($t_{1/2}$) e da redução decimal (D) da esterase de soja.

Temperatura (°C)	K_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	R^2
25	0,0014	495,11	1644,71	0,96
30	0,0016	433,22	1439,13	0,90
35	0,0021	330,07	1096,48	0,90
40	0,0034	203,87	677,24	0,96
45	0,0064	108,30	359,78	0,72

Assim como verificado pelos parâmetros K_d e $t_{1/2}$ o valor D da esterase também indicou maior estabilidade nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Foi estimado que a enzima tivesse sua atividade reduzida a 10% do valor inicial após 1644,71; 1096 e 359,7 minutos quando exposta às temperaturas de 25, 35 e 45°C, respectivamente. A lipase de *Rhizomucor miehei* estudada por Noel e Combes (2003) apresentou tempo de meio vida de 5800 min.

A Figura 3 ilustra a regressão do valor D obtidos nas diferentes temperaturas para o calculo do valor Z. O valor Z reflete a variação de temperatura requerida para redução de 90% da atividade enzimática. Foi verificado que para a esterase de soja este valor foi de 30,29.

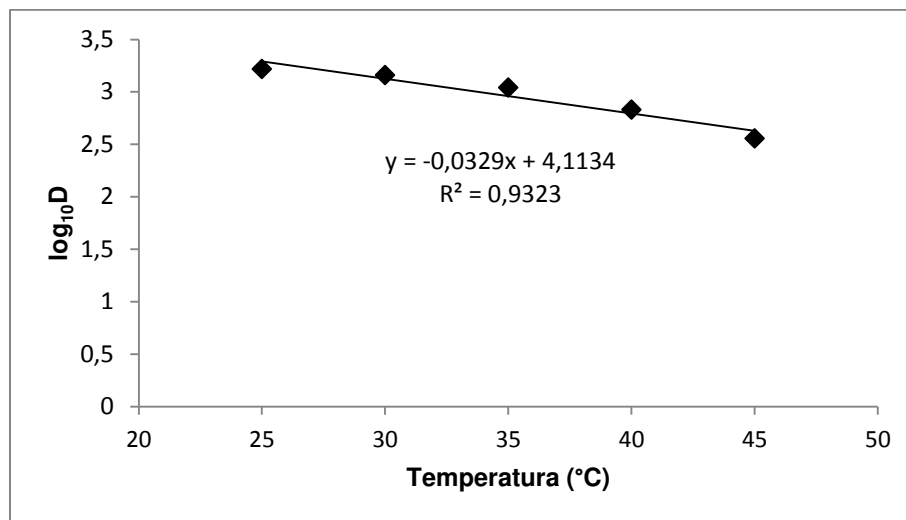


Figura 3: Linearização da redução decimal (D) para o cálculo do valor Z da esterase da semente de soja.

Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação fornecem informações sobre a termoestabilidade da enzima para cada etapa do processo de desnaturação induzida pelo calor. Estes podem ajudar a detectar alguma estabilização secundária ou efeitos da desestabilização que não são verificados se apenas o tempo de meia vida for considerado (Longo e Combes, 1999; Souza et al., 2009).

A Figura 4 ilustra a regressão linear proposta por Arrhenius para o cálculo da energia de ativação da desnaturação (E_{ad}) da esterase de soja.

O valor de E_{ad} corresponde à energia necessária para a mudança da conformação da enzima, assim quanto maior seu valor maior é a energia para que ocorra a desnaturação da enzima e, portanto, maior é resistência térmica desta (Cobos e Estrada, 2003; Silva, 2009).

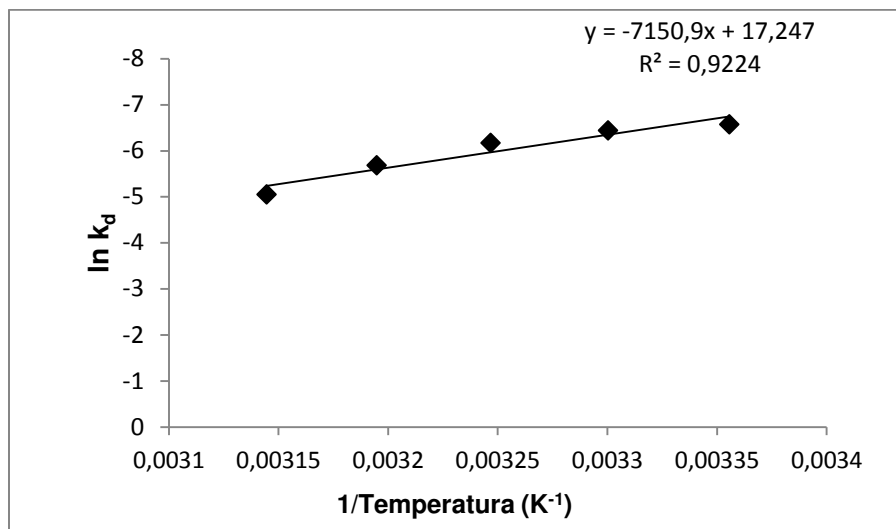


Figura 4: Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para o cálculo de E_{ad} da esterase de soja.

A energia de ativação da desnaturação obtida para a esterase de soja foi de 59,4 KJ mol⁻¹. Noel e Combes (2003) observaram o valor de 304 kJ mol⁻¹ para energia de desnaturação. Weemaes et al. 1998 observaram o valor de 319 kJ mol de energia de desnaturação para a enzima polifenoloxidase.

A Tabela 2 apresenta os valores calculados para os parâmetros de entalpia (ΔH), energia livre (ΔG) e entalpia (ΔS) da esterase de soja.

Os resultados para entalpia (ΔH) foram praticamente independentes da temperatura avaliada, indicando que não há variação da capacidade térmica da enzima estudada. Segundo Maragoni (2003) valores positivos e elevados de entalpia podem ser associados a uma enzima termoestável, uma vez que a maior quantidade de energia é necessária para a ocorrência do processo de desnaturação. De acordo com Ortega et al. (2004), o valor de ΔH pode ser correlacionado com o número de ligações não covalentes rompidas durante o processo de desnaturação.

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos da esterase de soja bruta.

Temperatura (°C)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
25	56,94	61,04	13,76
30	56,90	61,68	15,78
35	56,86	61,96	16,56
40	56,82	61,67	15,50
45	56,78	60,94	13,08

Segundo Marangoni (2003), Longo e Cobes (1999), o valor de energia livre (ΔG) é o indicador mais confiável da estabilidade de uma enzima. O valor está diretamente relacionado com a estabilidade protéica, uma vez que valores baixos ou negativos indicam que o processo de desnaturação ocorre mais rapidamente. Observou-se que a elevação da temperatura de incubação da esterase de 25 a 45°C não trouxe muita alteração nos valores de ΔG , indicando a desestabilização progressiva da proteína.

Conclusão

A esterase bruta de soja bruta demonstrou ser uma enzima relativamente termoestável. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da esterase de soja revelaram que a enzima apresenta uma cinética de desnaturação térmica de 1ª ordem, sendo mais estável em temperaturas abaixo de 40°C, onde o valor de redução decimal foi de 1439 minutos a 30°C. Os parâmetros apresentados pela enzima atribuem a esta potencial de aplicação industrial.

Referências

Aizono Y, Funatsu M, Sugano M, Hayashi K, Fujiki Y. Enzymatic properties of rice bran lipase. **Agricultural Biological and Chemistry**, v. 37, p. 2031-2036 1973.

Barros M, Macedo AG. Seed lipase: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical engineering**, v. 27, p.15-29 (2010).

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254 (1976).

Cobos, A.; Estrada, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 810-818, 2003.

Enujiagha VN, Thani FA, Sanni TM, Abigor RD. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth) **Food Chemistry**, v.88, p.405-410 (2004).

Fahmy, A. S.; Abo-Zeid, A. Z.; Mohamed, T. M.; Ghanem, H. M.; Borai, I. H.; Mohamed, S. A. Characterization of esterases from *Curcubita pepo* cv. “Eskandrani”. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 437-443, (2008).

Chandra, G. R. and Toole, V. K. Release of esterase following germination of lettuce seed (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology**, v. 59, p. 1055-1058.

Hellyer SA, Chandler IC, Bosley JA. Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? *Biochimica et Biophysica Acta* v. 1440, p. 215-224 (1999).

Kermasha, S.; van de Voort, F. R. Characterization of French bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 19, p. 23-27, 1986.

Longo, M. A.; Combes, D. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 25-32, 1999.

Marangoni, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. 1a ed., John Wiley and Sons, 229 p, 2003.

Noel, M. e Combes, D. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei*. **Journal of Bitechology**, v. 102, p. 23 – 32, 2003.

Ortega, N.; Diego, S.; Rodriguez-Nogalez, J. M.; Perez-Mateos, M.; Busto, M. D. Kinetics behavior and thermal inactivation of pectin lyase used in food processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 631- 639, 2004.

Paques, F. W.; Macedo, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações indústrias. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99 2006.

Pio, T. F.; Macedo, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 41, p. 613-619, 2007.

Polizelli, P. P.; Tiera, M. J.; Bonilla-Rodriguez, G. O. Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. **Journal of American Chemical Societ**, v. 85, p.749-753 2008.

SILVA, J. C. Seleção de micro-organismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium* sp. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 58 p, 2009.

Souza, C. F. V.; Faccin, D. J. L.; Mertins, O.; Heck, J. X.; Silveira, N. P.; Secchi, A. R.; Ayub, M. A. Z. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 10, p. 1567-1575, 2009.

Villeneuve P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.105, p.308-317 (2003).

Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M.E., 1998. Kinetics of combined pressure temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 292 – 300 1998.

CAPÍTULO 6- ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTERASE DE SOJA (*Glycine max* L.)

Márcio de Barros^{1*} e Gabriela Alves Macedo¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos,

Faculdade de Engenharia de Alimentos P.O. Box: 6121,

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,

13083-970, Campinas, SP, Brasil

Resumo

A esterase estudada neste trabalho foi extraída da semente de soja *Glycine max* após 24 horas de germinação. A enzima purificada apresentou elevada atividade e estabilidade em pH alcalino igual 8, e foi estável a temperatura de 45°C. A massa molecular da enzima foi estimada em 45 kDa por eletroforese em gel (SDS-PAGE). O íon Hg^{+} demonstrou ter um efeito negativo sobre a esterase da soja. Usando *p*-nitrofenil butirato, a enzima demonstrou um K_m de 0,39mM e V_{max} de 31,5 mM.mg⁻¹min⁻¹. A enzima apresentou maior afinidade por ácidos graxos de cadeia curta, principalmente, *p*-nitrofenil acetato. Tais características atribuem à enzima grande potencial para aplicação industrial.

1. Introdução

As esterases agem em específicos tipos de ésteres, as reações reversíveis são afetadas dependendo do termodinamismo da enzima, dos ésteres formados na fase orgânica que podem ser hidrolisados na fase aquosa. Entretanto, as esterases diferem das lipases, principalmente, quanta especificidade ao substrato e ativação interfacial. As lipases apresentam um domínio hidrofóbico cobrindo o sítio ativo, preferindo ácidos graxos de cadeia longa (Panda e Gowrishankar, 2005; Staubmann et al. 1999).

As esterases são aplicadas em várias áreas, devido ao crescente interesse por esta enzima. Várias características das esterases têm sido reportadas, principalmente, ampla distribuição, quantificação, produção, alvo de sínteses, purificação e biologia molecular (Panda e Gowrishankar, 2005). As esterases são aplicadas em produtos lácteos, na produção de vinho, sucos de frutas, cerveja e álcool. São aplicadas também para transformar gorduras de baixa massa molecular em óleos de maior valor comercial, as esterases bem como as lipases são usadas em reações de transesterificação. Por exemplo, esterases e lipases de *Lactobacillus casei* CL 96 são usadas significativamente para hidrolisar a gordura do leite e aumentar o sabor dos queijos e outros produtos derivados do leite (Panda e Gowrishankar, 2005; Fojan et al., 2000; Staubmann et al. 1999).

Esterases e lipases de sementes apresentam vantagens quando comparadas às esterases de micro-organismos, uma vez que podem ser aplicadas, em alguns casos, sem serem purificadas (Barros, Fleuri e Macedo, 2010). Vários estudos têm avaliado as características de lipases e esterases de sementes, devido ao seu promissor potencial de aplicação comercial; tais como: feijão (Enujiugha et al., 2004); girassol (Sagiroglu e Arabaci, 2005; Sadeghipour and Bhatla, 2003); linhaça (Sammour, 2005); amendoim (Huang e Moriau, 1978) e sementes de algodão (Rakhimov et al., 1970).

Staubmann et al. (1999) estudaram as características físico-químicas de duas esterases e uma lipase de pinhão manso purificadas. Os autores observaram que as enzimas apresentaram pH ótimo de atividade em pH alcalino, ao redor de 8; alta estabilidade em altas temperaturas (50°C). Polizelli, Tiera e Bonilla-Rodriguez (2008) avaliaram as propriedades físico-químicas de lipase de *Pachira aquatica* e observaram também que, a enzima lipolítica apresentou estabilidade a 40°C e atividade ótima em pH alcalino igual a 8. Características interessantes que conferem a esta enzima grande potencial para aplicação industrial.

Este trabalho avaliou as características físico-químicas da esterase de sementes de soja, após purificação.

2. Material e métodos

2.1 Material

As sementes de soja (*Glycine max* L.) estudadas foram cedidas pela VITAO indústria brasileira LTDA. A lipase comercial utilizada neste trabalho foi a Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus* Novozymes®, na concentração de 2mg.mL⁻¹. O *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA), *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB), *p*-nitrophenyl caprylate (*p*NPC), *p*-nitrophenyl laurate (*p*NPL) e *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) substratos para esterase foram obtidos da Sigma Chemical Co, USA. Todos os outros agentes químicos usados foram de grau analítico.

2.2 Extração da enzima

A esterase de soja foi extraída utilizando o método descrito por Aizono et al., (1973) modificado por Kermasha e van de Voort (1986). Amostras de 150 gramas (em peso seco) de semente após 24 horas de germinação foram trituradas e a farinha obtida foi ressuspensa em uma solução contendo 1.10⁻³M CaCl₂ e 5.10⁻³M EDTA (1:3 w/v) e homogeneizada em liquidificador a 4°C por 3 minutos. A amostra foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL, agitado mecanicamente a 5°C por 30 minutos, e, então, submetida a ultra-som (125W a 200W) por 1 minuto para a liberação da enzima ligada. A suspensão resultante foi centrifugada a

1.645xg por 45 minutos, para retirada dos resíduos suspensos. O sobrenadante contendo a enzima foi liofilizado e o pó enzimático obtido foi mantido em geladeira a 4°C.

2.2.1 Purificação

2.2.1.1 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose

O extrato bruto enzimático foi eluído numa coluna de troca aniônica de DEAE-Celulose (44 cm de diâmetro x raio de 1 cm). O tampão utilizado para eluição foi Tris 1M pH 7,5 com fluxo de 5 mL a cada 20 minutos. Foram coletadas 175 frações e a absorvância foi medida a 280 nm. Foi aplicado um gradiente de sal NaCl 1 M a partir da fração 59. A atividade de esterase nas frações foi determinada usando *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) como descrito no item 2.2.2.

2.2.1.2 Cromatografia em coluna de filtração em gel Sephadex G100

As frações protéicas enzimaticamente ativas coletadas após eluição em DEAE celulose, foram concentradas por ultrafiltração. O processo de ultrafiltração foi realizado em tubos de ultrafiltração com membrana em celulose regenerada 30.000 daltons. Foram colocados em cada tubo 15 mL das frações protéicas eluídas da DEAE celulose e centrifugadas a 1645xg por 25 minutos a 5°C. Após a ultrafiltração foram obtido 5mL da solução enzimática concentrada e eluídas em coluna de gel Sephadex G-100. O tampão utilizado para eluição foi Tris 0,05M pH7,5 contendo KCl 0,1M.

A atividade de esterase nas frações coletadas foi determinada como descrito no item 2.2.2.

2.2.1.3 Eletroforese em gel

A massa molar da enzima parcialmente purificada foi determinada por eletroforese SDS-PAGE em gel poliacrilamida 12% de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970).

A massa molecular da esterase de soja foi estimada pela utilização de mistura de padrões de baixa massa molecular (Bio-Rad 161-0304), contendo fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

2.2.2 Ensaio enzimático

A atividade esterásica foi determinada espectrofotometricamente a 405nm usando *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) como substrato. A mistura de 0,07 mL da solução enzimática e 3,430 mL de uma solução contendo: 1,12 mM de (*p*NPB), tampão fosfato pH 7,0 50 mM, Triton X-100 0,2% (v/v) e tetrahydrofurano 0,43 M a 37°C por 5 minutos. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de *p*-nitrofenil por minuto sob as condições especificadas (Calado et al., 2002).

2.2.3 Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade e de estabilidade da esterase de soja

Foi realizado um planejamento experimental completo 2² com quatro ensaios nos pontos axiais e três ensaios nos pontos centrais para cada variável; para verificar o efeito do pH e a temperatura e sua interação na atividade da enzima. A matriz experimental encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores utilizados no planejamento experimental completo 2².

Variáveis independentes/níveis	-α	-1	0	1	+α
Temperatura °C	30	33	40	47	50
pH	6	6,3	7	7,7	8

Para avaliar o pH de estabilidade da enzima, a enzima purificada foi mantida por 4 horas a 30°C nos seguintes tampões: Tampão acetato 0,1M pH 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,6; Tampão fosfato 0,1M pH 6,0; 6,5 e 7,0; tampão Tris-HCl

0,1M , pH 7,0; 8,0; 8,5 e 9,0; tampão Borax-NaOH 0,1M, pH 9,5 e 10,0. Após o período, foi determinada a atividade esterásica conforme descrito anteriormente.

Para os testes de temperatura de estabilidade alíquotas de 0,07 mL da enzima purificada foram mantidas por 1 hora a 30, 40, 50, 60, 70 e 90°C. Transcorrido o tempo de 1 hora foi determinada a atividade residual a 37°C conforme descrito anteriormente. Os testes foram realizados em triplicata e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, com um intervalo de confiança de $\pm 95\%$ e um nível de significância de $p \leq 0,05$.

2.2.4 Estudo da especificidade da esterase de soja

A especificidade da enzima foi estudada avaliando a atividade de hidrólise em diferentes substratos sintéticos: *p*-nitrofenil acetato (2:0), *p*-nitrofenil butirato (4:0), *p*-nitrofenil caprilato (6:0), *p*-nitrofenil laurato (12:0) e *p*-nitrofenil palmitato (16:0); a 37°C durante 5 minutos como descrito anteriormente.

2.2.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

2.2.6 Influência de íons metálicos e parâmetros cinéticos

Os valores de K_m e V_{max} foram determinados pela hidrólise do *p*-nitrofenil butirato em várias concentrações nas condições descritas acima. Para determinar a influência de íons metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ , Co^+ , Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+}) na atividade enzimática, adicionou-se os sais dos íons no tampão de reação na concentração de 10mM. A atividade relativa foi expressa em porcentagem da atividade enzimática sem a adição de sais como descrito acima. Para cada ensaio foi preparado um controle contendo o sal adicionado sem a enzima, pois alguns deles possuíam cor.

3. Resultados e Discussão

A Tabela 2 ilustra a purificação da esterase de soja por cromatografia em coluna de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, filtração em gel Sephadex e ultrafiltração.

Tabela 2: Purificação da esterase de soja por cromatografia em coluna de DEAE-celulose e Sephadex G-100 e ultrafiltração.

Etapas de Purificação	U Total	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	167,12	106,02	1,58	1,0	100,0
DEAE-Celulose	101,63	17,64	5,76	3,7	60,8
Sephadex G-100 Gel	34,67	6,15	5,64	3,6	20,7
Ultrafiltração	62,98	3,56	17,6	11,1	37,6

A Figura 1 ilustra a cromatografia da preparação bruta de esterase de soja em coluna de DEAE-celulose equilibrada em Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5. Observa-se que a esterase não foi adsorvida sendo eluída nas frações 20 a 33. A enzima foi purificada cerca de 3,7 vezes com 60,8% de rendimento (Tabela 2). Ao final da corrida em coluna de gel Sephadex G-100, a esterase de soja apresentou uma atividade de 5,76 U.mg⁻¹. Foram observados dois picos de proteína sendo que a esterase foi eluída no primeiro pico nas frações 32 a 50. Nesta etapa de preparação da enzima (filtração em gel) não foi obtido aumento da atividade específica. Após a etapa de ultrafiltração em membranas de 30kDa, a esterase foi purificada cerca de 11,1 vezes.

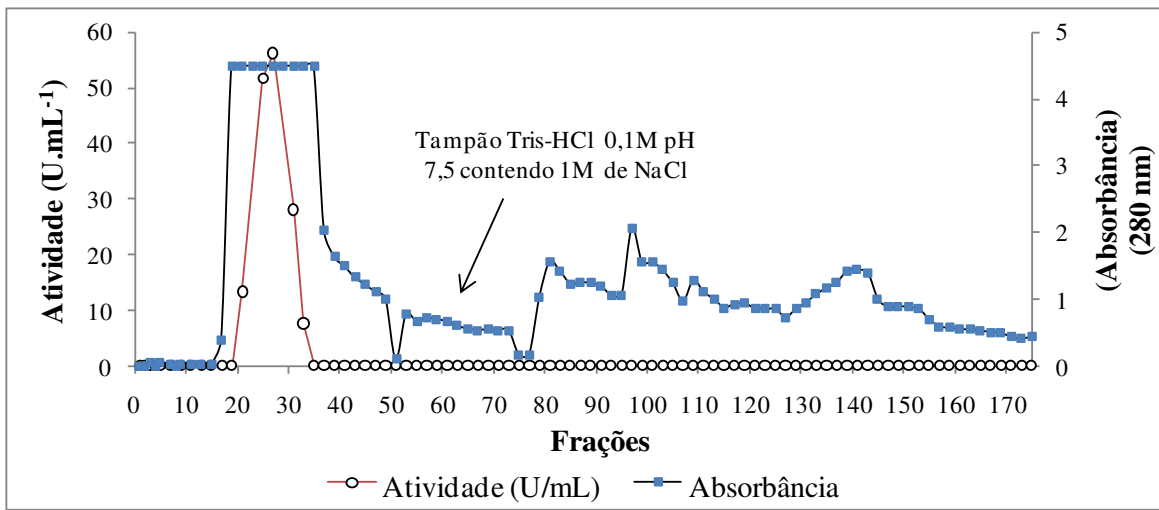


Figura 1: Perfil de eluição da esterase de soja usando coluna cromatográfica DEAE-Sepharose.

A Figura 2 mostra o perfil de eluição da preparação da esterase parcialmente purificada obtida da coluna de DEAE celulose, na coluna de filtração em gel Sephadex G-100.

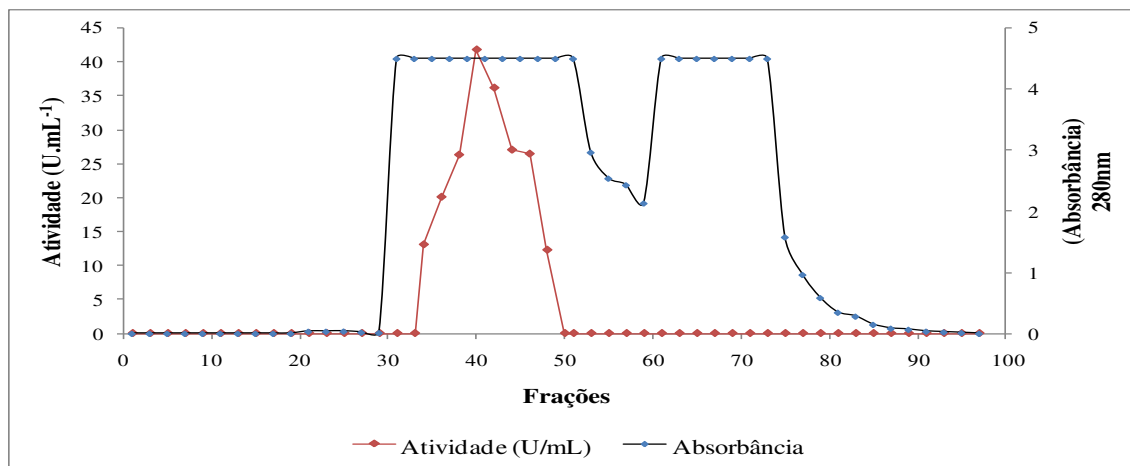


Figura 2: Perfil de eluição da esterase de soja usando coluna cromatográfica de filtração em gel Sephadex G-100.

Vários trabalhos têm isolado e estudado enzimas lipolíticas de sementes vegetais. Staubmann et al. (1999) isolou duas esterases da semente de pinhão

manso. Polizelli et al. (2008) purificou e avaliou as características da lipase de *Pachira aquatica* purificada.

A esterase da soja apresentou massa molecular de 45kDa estimada por eletroforese em gel poliacrilamida da SDS (Figura 3). As esterases EI e II de pinhão manso estudadas por Staubmann et al. (1999) apresentaram massa molecular de 23 kDa e 30,2 kDa respectivamente.

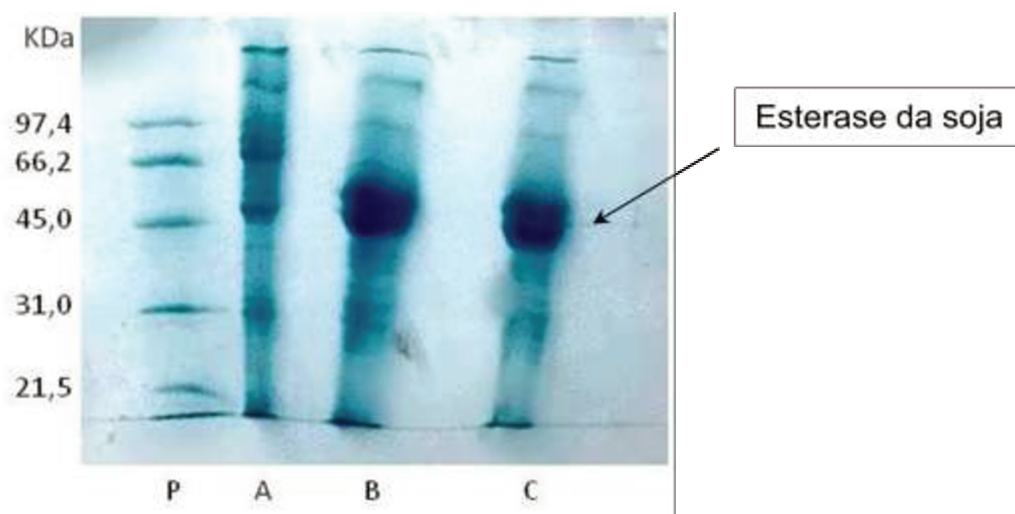


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das preparações bruta e purificadas de esterase de soja em colunas de DEAE-celulose e Sephadex G-100 P= Proteína padrão; A= Extrato bruto de esterase; B=Esterase purificada em coluna DEAE-celulose; C=Esterase purificada em coluna Sephadex G-100.

3.1 Caracterização da esterase de soja purificada

Foi realizado um planejamento experimental para verificar o pH e temperatura ótima de atividade da esterase de soja purificada. A Tabela 3 ilustra os resultados do delineamento experimental para o estudo do efeito da temperatura e o pH na atividade da esterase de soja.

Tabela 3: Variáveis codificadas e valores reais (em parênteses) das variáveis do planejamento fatorial (DCCR 2²), e valores de atividade esterásica experimental e previsto pelo modelo.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade Enzimática (U.mg ⁻¹) Experimental	Atividade enzimática prevista pelo modelo	Resíduo (U.mg ⁻¹)
1	-1(33)	-1(6,3)	1,00	3,32	-2,31
2	-1(33)	1(7,7)	10,98	10,80	0,19
3	1(47)	-1(6,3)	8,80	10,07	-1,28
4	1(47)	1(7,7)	17,56	16,33	1,22
5	-1,4142(30)	0(7,0)	7,88	6,62	1,26
6	1,4142(50)	0(7,0)	15,20	15,39	-0,20
7	0(40)	-1,4142(6)	6,51	4,23	2,28
8	0(40)	1,4142(8)	12,82	14,04	-1,22
9	0(40)	0(7,0)	13,17	12,97	0,19
10	0(40)	0(7,0)	12,73	12,97	-0,24
11	0(40)	0(7,0)	13,06	12,97	0,10

Tabela 4: Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo para a atividade enzimática (U.mg⁻¹) de esterase de soja purificada.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(5)	p-valor
Mean/Interc.*	275,93	101,50	-2,72	0,042
(1) Temperatura (°C) (L)	2, 45	1,82	1,35	0,236
Temperatura (°C) (Q)	-0,02	0,02	-1,26	0,263
(2) pH (L) *	61,15	23,12	2,65	0,046
pH (Q)	-3,84	1,56	-2,46	0,057
1L by 2L	-0,06	0,19	-0,33	0,754

R²=0,92; *Fatores com efeito significativo (p<0,05). As reações foram conduzidas conforme descrito na metodologia.

O erro padrão foi estimado a partir do erro puro. Para a atividade da esterase de soja observou-se que a temperatura e o pH apresentaram efeito sobre a atividade da enzima. Sendo que, o aumento da temperatura e do pH teve influência positiva na atividade da esterase de soja. O p-valor calculado para cada

variável e para interação entre elas indica que a interação entre o pH e temperatura não apresentaram efeito sobre a atividade da enzima. Modelo real contendo os termos significativos pode ser observado na equação 1.

Equação 1:

$$\text{Atividade máxima (U.mg}^{-1}\text{)} = 275,93 + 2,45\text{XTemp.} - 0,02\text{XTemp}^2 + 61,15\text{XpH} - 3,84\text{pH}^2 - 0,06\text{pHXTemp.}$$

A Tabela 5 ilustra a análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo real aos pontos codificados.

Tabela 5 : Análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo real aos pontos codificados.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados médios	F _{calculado}	F _{tabelado}	p-valor
Regressão	193,55	5	38,71	11,41	5,5	0,009
Resíduo	16,9650	5	3,39			
Falta de ajuste	16,8602	3		160,77	19,16	
Erro puro	0,1048	2				
Total	210,4702	10				

Coeficiente de correlação R=0,92. F_{0,95;5;5}=5,5.

ANOVA indica que a regressão foi significativa a 95% de confiança, visto que o teste de F, o F_{calculado} foi maior que o F_{tabelado}. O coeficiente de correlação foi de 0,92; ou seja, o modelo é capaz de explicar 92%.

As Figuras 2a e 2b demonstram o efeito do pH e da temperatura na atividade da esterase de soja purificada.

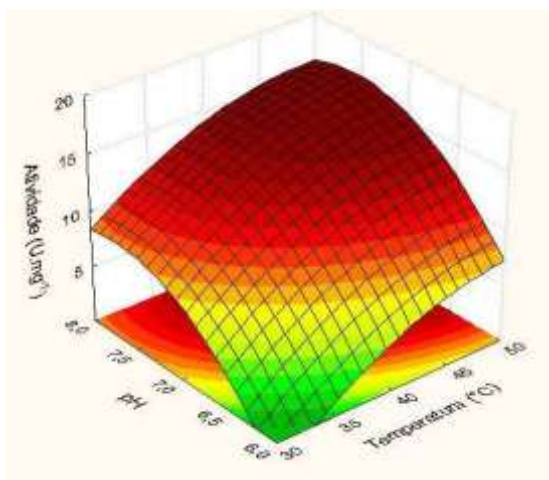


Figura 4a: Superfície de resposta da atividade do efeito do pH e temperatura na atividade (U.mg^{-1}) da esterase de soja purificada.

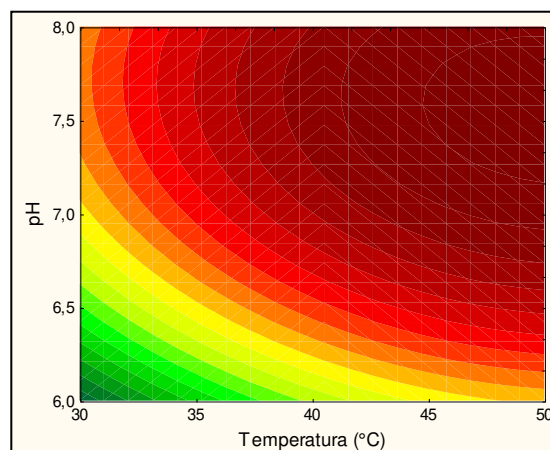


Figura 4b: Curva de contorno da atividade do efeito do pH e temperatura na atividade (U.mg^{-1}) da esterase de soja purificada

Os resultados demonstraram que à medida que houve um aumento da temperatura e do pH, ocorreu um aumento na atividade enzimática, atingindo o máximo de atividade em pH 7,7 a 47°C com $17,50 \text{ U.mg}^{-1}$ de atividade.

Foram testados também o efeito da temperatura e do pH na estabilidade da enzima. Os resultados encontram-se nas figuras 5 (a e b) e 6 (a e b).

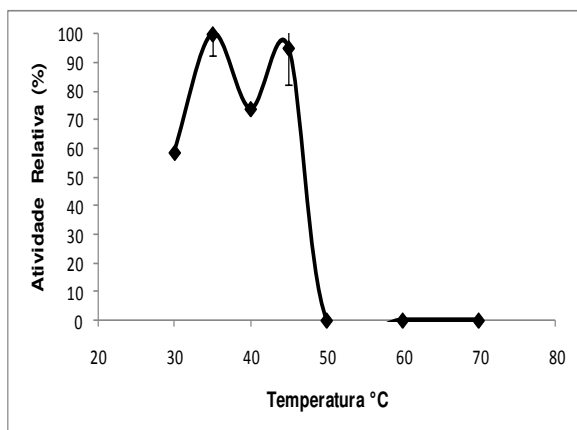


Figura 5a: Efeito da temperatura na estabilidade da esterase de soja purificada.

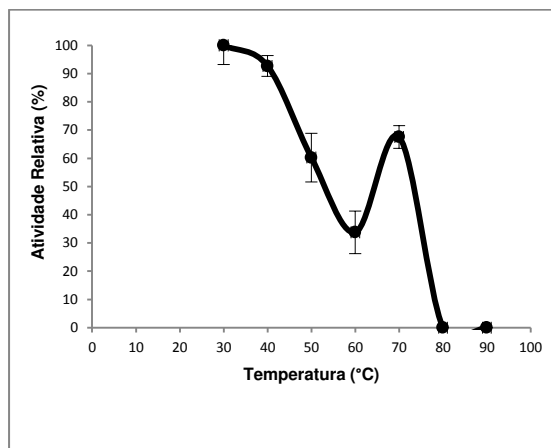


Figura 5b: Efeito da temperatura na estabilidade da esterase de soja bruta.

A esterase de soja mostrou estabilidade após 1 hora de incubação a 45°C em pH 7,0, sendo inativada completamente em temperaturas superiores a 50°C. A preparação bruta da esterase de soja mostrou-se estável após uma hora a 70°C em pH 7,0, sendo inativada em temperaturas superiores a 80°C indicando que a preparação bruta de esterase de soja é mais estável que a enzima purificada. Baseado em trabalhos da literatura, a esterase de soja purificada pode ser considerada uma enzima estável a médias temperaturas, pois apresentou aproximadamente 100% quando incubada a 45°C. Yesiloglu and Baskurt (2008) estudaram a lipase de amendoim (*Antygadalus communis*) e observaram que a enzima foi estável na faixa de temperatura entre 10 a 90°C. A lipase de semente de *Laureu nobilis* estudada por Isbilir et al. (2008) apresentou 80% de atividade relativa após ter sido mantida por 1 hora a 50°C.

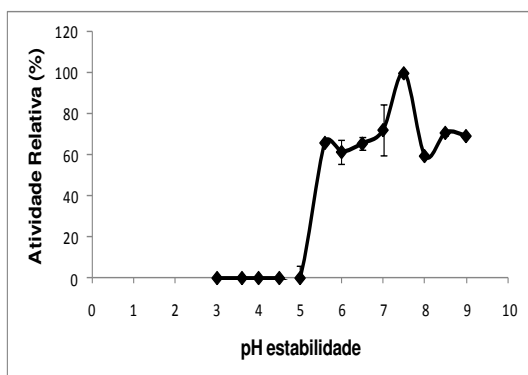


Figura 6a: Efeito do pH na estabilidade da esterase de soja purificada.

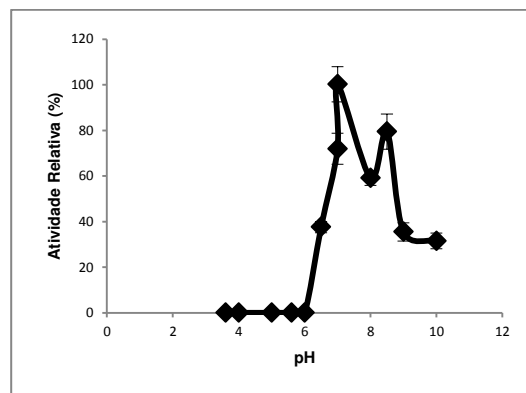


Figura 6b: Efeito do pH na estabilidade da esterase de soja bruta.

As Figuras 6a e 6b ilustram, respectivamente, a faixa de pH de estabilidade da esterase purificada e bruta, extraída de soja.

A esterase da soja purificada apresentou estabilidade numa ampla faixa de pH (5 a 10) sendo que no pH 7,5 a enzima apresentou maior estabilidade. Em pH 9 a enzima reteve 70% da atividade. A esterase da preparação bruta apresentou maior estabilidade na faixa de pH 6,5 até pH 10, sendo que apresentou maior estabilidade em pH 7,5. A lipase de amendoim estudada por Yesioglu e Baskurt (2008) apresentou um perfil de estabilidade em pH entre 6 a 9,5 semelhante ao da esterase de soja.

3.2 Efeito de alguns íons na atividade enzimática da esterase purificada de soja.

Foi avaliado o efeito de alguns íons na atividade da esterase purificada de soja cujos resultados encontram-se na Figura 7.

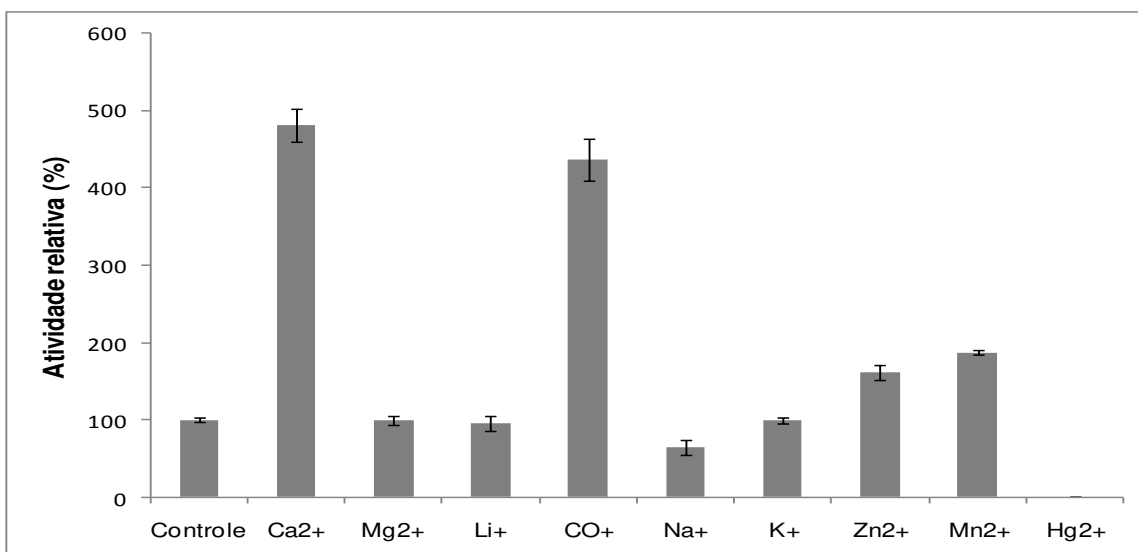


Figura 7: Efeito de alguns íons na atividade enzimática da esterase de soja. A porcentagem de inibição de cada composto foi comparada com a atividade relativa do controle (100% atividade).

A adição dos sais de Ca^{2+} e Co^{+} na concentração de 10mM na mistura de reação ativaram a esterase purificada cerca de 4 vezes, comparado ao controle. No estudo do efeito de íons na atividade da esterase bruta de soja verificou-se que NaNO_3 na concentração de 10mM, ativou a enzima cerca de 1,5 vezes. A lipase de amendoim estudada por Yesioglu e Baskurt (2008), apresentou um aumento na atividade relativa de 3,5 e 1,5 vezes quando íons Co^{+} e Ca^{2+} estava presente no meio reativo, respectivamente.

Isbilir, Ozcan e Yangar (2008) estudaram a lipase de *Laurus nobilis* L.e observaram um aumento significativo na atividade enzimática quando os íons Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} foram adicionados ao meio reativo da enzima. A lipase de castanha-do-maranhão (*P. aquatica*) estudada por Polizelli, Tiera e Bonilla-Rodriguez (2008) também apresentou elevação na atividade relativa quando Ca^{2+} e Mg^{2+} estavam presentes no meio reativo.

O íon Hg^+ demonstrou um efeito totalmente inibitório para a esterase de soja. O mesmo foi observado para a esterase de *Jatropha curcas* L. estudada por Staubmann et al. (1999).

Os valores de K_m e V_{max} da enzima purificada foram calculados e os valores encontrados foram de 0,48 mM e 22,83 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente, utilizando *p*NPB como substrato. Para a enzima bruta, os valores de K_m e V_{max} foram 19,66 e 7,70, respectivamente. A enzima purificada apresentou maior afinidade pelo substrato *p*-nitrofenil acetado.

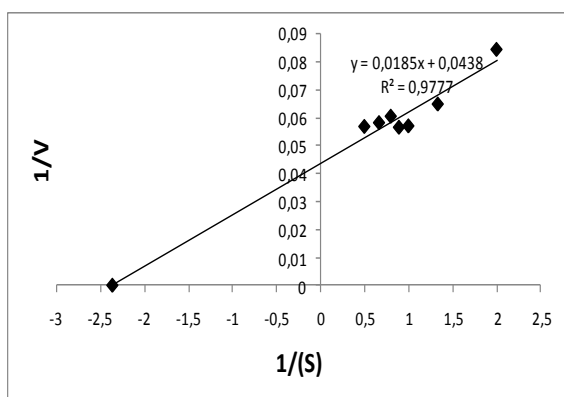


Figura 8 a: Determinação gráfica dos valores de K_m e V_{max} da esterase purificada de soja, utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil butirato, seguindo a método de Lineweaver-Burk

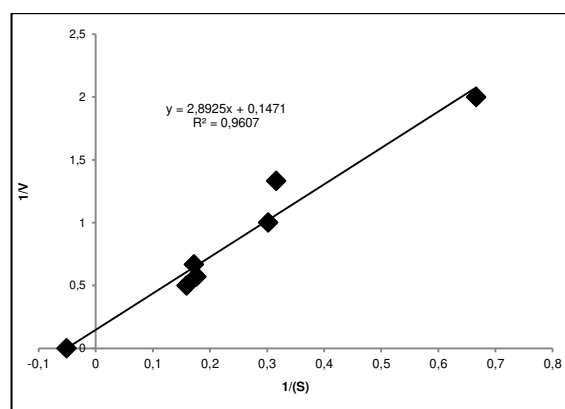


Figura 8 b: Determinação gráfica dos valores de K_m e V_{max} da esterase bruta de soja, utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil butirato, seguindo a método de Lineweaver-Burk.

Foi avaliada a especificidade de soja purificada e os resultados estão apresentados na Figura 9.

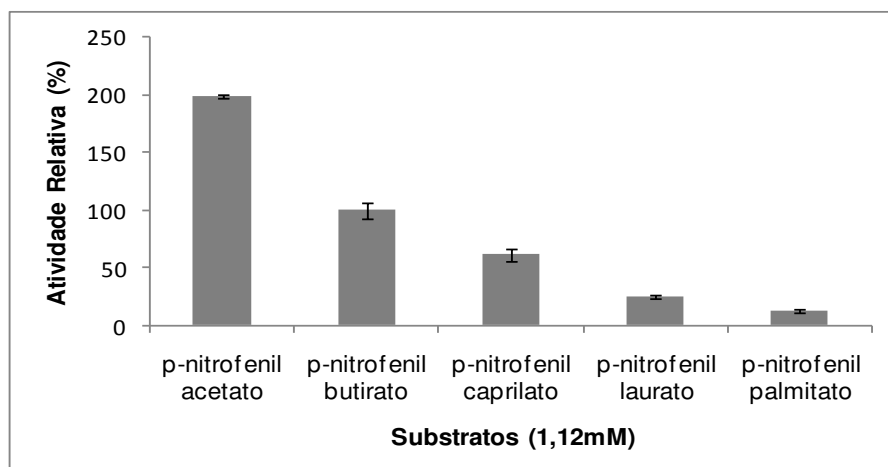


Figura 9: Especificidade da esterase de soja em relação ao substrato. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.b

A esterase de soja purificada apresentou a seguinte ordem de preferência pelos substratos pNPA>(pNPB)>pNPC>pNPL>pNPP sendo que o mesmo perfil foi observado para a enzima bruta. A esterase de cevada estudada por Kubicka et al. (2000) apresentou grande afinidade por ácidos graxos de cadeia curta especialmente ésteres de ácido acético.

Liaquat e Apeten (2000) estudaram a síntese de diferentes ésteres aromáticos por lipase de milho, e observaram que esta lipase apresentou maior afinidade por substratos de cadeia curta na seguinte ordem: ácido acético (2C) > ácido butírico (4C) > ácido caprólico (6C), em meio orgânico usando isopentanol, após 72 horas de reação. Os autores relataram que enzimas lipolíticas que demonstram maior afinidade por ácidos graxos de cadeia curta, têm grande potencial para aplicação na síntese de ésteres aromáticos.

4. Conclusão

A esterase de soja *Glycine max* apresentou algumas características interessantes, tais como estabilidade em pH e elevada atividade em pH alcalino, estabilidade e atividade em temperatura mediana e elevada afinidade por ácidos graxos de cadeia curta. Estas e outras características conferem à esterase de soja, grande potencial para aplicação industrial.

Referências

- Barros, M; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 15-29, 2010.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- Enujiagha, V. N. et al. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). **Food Chemistry**, v. 88, p. 405-410, 2004.
- Fojan, P; Jonson, P. H.; Petersen, M. T. N.; Petersen, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, p. 1033-1041, 2000.
- Huang, A. H. C.; Moreal, R. A. Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. **Planta**, v. 141, p. 111-116, 1978.
- Isbilir, S. S.; Ozcan, M. H.; Yagar, H. Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds. **Journal of the American Oil**, v. 85, p. 227-233, 2008.
- Kermasha, S.; van de Voort, F. R. Characterization of French bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 19, p. 23-27, 1986.
- Kubicka, E.; Grabska, J.; Jedrychowski, L.; Czyz, B. Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 301-304, 2000.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- Liaquat, M. Apenten, R. K. O. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. **Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology**, v. 65, p. 295-299, 2000.
- Panda, T; Gowrishanker, B. S. Production and applications of esterases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 67, p. 160-169, 2005.
- Polizelli, P. P.; Tiera, M. J.; Bonilla-Rodriguez, G. O. Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 749-753, 2008.

Rakhimov, M. M.; Dzhanbaeva, N. R. Yuldashev, P. K. Specificity of the lipase from cottonseed. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 6, p. 616-619, 1970.

Sadeghipour, H. R.; Bhatla, S. C. Light-enhanced oil body mobilization in sunflower seedlings accompanies faster protease action on oleosins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 309-316, 2003.

Sagiroglu A. and Arabaci N., Purification and characterization of lipase from sunflower seed, **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 35, No. 1, 37 (2005).

Staubmam, R.; Ncube, I.; Gübitz, G. M.; Steiner, W.; Read, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.

Sammaour, R. H. Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipid body linseed lings. **Turkish Journal of Botany**, v. 29, p. 177-184, 2005.

Yesiloglu, Y.; Baskurt, L. Partial purification and characterization of almond seed lipase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 397-410, 2008.