

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE LIPASES DE  
SEMENTE DE TRIGO**

**ROGER JUNGES DA COSTA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**  
**MARÇO DE 2009**

# **AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE LIPASES DE SEMENTE DE TRIGO**

**ROGER JUNGES DA COSTA**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Débora de Oliveira, D.Sc

Orientador

---

Prof. Helen Treichel, D.Sc

Orientador

---

Prof. Eliana Setsuka Kamimura, D.Sc

USP

---

Prof. Eunice Valduga, D.Sc

URI – Campus de Erechim

---

Prof. Rogério Luís Cansian, D.Sc

URI – Campus de Erechim

Erechim, 25 de Março de 2009.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho à minha família, por todo amor, apoio e dedicação que me proporcionaram desde o primeiro segundo de minha vida e que com certeza o farão para sempre.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela vida.

Aos meus pais Glênio e Inez, e minha irmã Paula, pois sem dúvida são as pessoas mais importantes da minha vida e sem eles eu não seria nada.

A todos meus familiares que independente de onde eu esteja, estão sempre torcendo por mim.

À minha namorada Mikaela, que antes de tudo é minha amiga, companheira e confidente, a qual me deu força e apoio incondicional durante todo esse período, mesmo a distância.

Às minhas orientadoras Débora e Helen por todo o conhecimento que me foi passado, pelo compromisso, dedicação, amizade, sugestões e debates não somente durante a orientação, mas desde o início do mestrado.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, por toda a informação transmitida, em especial ao Professor Rogério Cansian pelos debates, críticas e sugestões na produção deste trabalho.

À colega de trabalho Morgana, que nunca foi só uma colega, mas sim uma grande amiga em todos os momentos, a qual sem ela não conseguiria desenvolver este trabalho.

À bolsista Deise pela ajuda e dedicação que desempenhou neste trabalho.

Ao Dirceu, Jackson, Bruna e Lucian que também foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que levarei comigo.

A todos os colegas do mestrado, pela amizade e convivência durante estes dois anos.

Aos amigos feitos no Laboratório de Biotecnologia.

Ao pessoal da Central de Materiais, sempre dispostos a ajudar e esclarecer alguma dúvida, sem falar da amizade criada com todos.

À INTECNIAL pelo apoio financeiro.

À URI e ao programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos.

E finalmente a todos que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes durante esse período e que levarei comigo na lembrança.

*"Preocupe-se mais com seu caráter do que com sua reputação, porque seu caráter é o que você realmente é, enquanto a reputação é apenas o que os outros pensam que você é."*

John Wooden

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE LIPASES DE SEMENTE DE TRIGO

Roger Junges da Costa

Março/2009

Orientadores: Débora de Oliveira

Helen Treichel

Estudos com lipases (glicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) de origem vegetal têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, pois sua extração e purificação parcial são desenvolvidas com técnicas simples, são obtidas de material economicamente barato e geralmente exibem particular especificidade. Devido à carência de dados na literatura com base na extração de lipases de semente de trigo, concentração e sua caracterização parcial, desenvolveu-se este trabalho a fim de obter estes resultados em termos de atividade de hidrólise e atividade de esterificação, sendo esta última não estudada por nenhum outro autor. Além desses objetivos, procurou-se realizar um comparativo entre as matérias primas: semente de trigo, gérmen de trigo e semente de trigo germinada. A metodologia do planejamento de experimentos foi utilizada para avaliar os efeitos do tamanho das partículas, da razão sólido:solvente (p/v) e do tempo de extração. O solvente escolhido para extração foi a acetona, e entre as matérias primas estudadas a semente de trigo mostrou-se mais vantajosa. A maior atividade hidrolítica encontrada para o extrato bruto foi de 5,9 U/g numa granulometria de 425  $\mu\text{m}$  (mesh 35), razão sólido:solvente de 30:60 (p/v) e um tempo de extração de 15 horas, aumentando para uma atividade máxima de 14,47 U/g após a concentração deste extrato num tempo de 24 horas de precipitação. Na medida de atividade de esterificação o melhor resultado para o extrato bruto foi de 57,88 U/g numa granulometria de 425  $\mu\text{m}$  (mesh 35), razão sólido:solvente 30:120 (p/v) e num tempo de 5 horas de extração, passando para 208,20 U/g no extrato concentrado em 10 horas de precipitação. Na caracterização parcial o pH ótimo encontrado foi de 5,5 e a temperatura ótima ficou na faixa de 32 a 37°C. A estabilidade desse extrato em freezer (-10°C) e geladeira (4°C) foi mantida durante as 120 horas de estocagem em termos de atividade de esterificação. Já a atividade hidrolítica foi mantida à -10°C durante as 144 horas de monitoramento e cessou após 24 horas de armazenagem à 4°C.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

## EVALUATION OF THE PROCESS OF WHEAT LIPASE EXTRACTION

Roger Junges da Costa

Março/2009

Advisors: Débora de Oliveira

Helen Treichel

Studies with plant lipases (glycerol ester hydrolases – E.C. 3.1.1.3) have been considerably grown in last years because the extraction and partial purification steps can be carried out using simple techniques, they can be obtained by cheap materials and generally shows particular specificity. Due a few data in literature based on extraction of wheat seed lipase, their concentration and partial purification, this work was developed in order to optimize the hydrolytic and esterification activities of the enzymatic extract, being this last never presented in the open literature. Beyond these objectives a comparative study using the raw materials wheat seed, wheat germ and germinated wheat seed was performed. The experimental design methodology was used to evaluate the effects of particle size ( $\mu\text{m}$ ), solid:solvent ratio (w/v) and extraction time (h). The solvent used for enzyme extraction was acetone, and among all raw materials evaluated the wheat seed presented more promising. The higher hydrolytic activity of crude extract was 5.9U/g at a particle size of 425 $\mu\text{m}$  (mesh 35), solid:solvent ratio of 30:60 (w/v) and reaction time of 15 hours, with maximum hydrolytic activity of 14.47U/g to the concentrated extract after 24 hours of precipitation. For esterification activity the best result for crude extract was 57.88U/g in a particle size of 425 $\mu\text{m}$  (mesh 35), solid:solvent ratio of 30:120 (w/v) and reaction time of 5 hours, with a maximum value obtained after 10 hours of precipitation increasing to 208.20U/g in the concentrated extract. In terms of the partial characterization of concentrated extract, the optimum pH and temperatures was found to be 5.5 and 32 – 37°C, respectively. The stability of this extract at freezing temperatures (-10°C) and cooling (4°C) was kept after 120 hours of storage in terms of esterification activity. The hydrolytic activity was kept constant at -10°C during 144 hours of monitoring and diminished considerably after 24 hours at 4°C.

## SUMARIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 LIPASES.....	4
2.2 REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES .....	6
2.3 ESPECIFICIDADE DAS LIPASES.....	8
2.4 APLICAÇÕES DAS LIPASES.....	9
2.5 PRÉ-PURIFICAÇÃO DE LIPASES .....	11
2.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES.....	12
2.7 LIPASES OBTIDAS A PARTIR DE FONTES VEGETAIS .....	13
2.8 APLICAÇÕES DE LIPASES VEGETAIS .....	15
2.9 LIPASE DE TRIGO .....	16
2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 MATERIAIS .....	18
3.2 EQUIPAMENTOS.....	18
3.3 MÉTODOS.....	19
3.3.1 Extração da lipase de semente de trigo .....	19
3.3.2 Testes com outras matérias-primas .....	20
3.3.3 Escolha do solvente .....	21
3.3.4 Determinação da atividade de hidrólise do extrato enzimático .....	21
3.3.5 Determinação da atividade de esterificação do extrato enzimático.....	22
3.3.6 Planejamento experimental.....	23
3.3.6.1 Planejamento seqüencial de experimentos para otimização do processo de extração de lipases em termos de atividade hidrolítica.....	23

3.3.6.2 Planejamento de experimentos para extração de lipases em termos de atividade de esterificação .....	24
3.3.7 Concentração do extrato enzimático bruto por precipitação com sulfato de amônio .....	25
3.3.8 Caracterização parcial da lipase concentrada.....	26
3.3.8.1 Temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado .....	27
3.3.8.2 Estabilidade da lipase concentrada a baixas temperaturas.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 ESCOLHA DO SOLVENTE ORGÂNICO.....	28
4.2 TESTES COM OUTRAS MATÉRIAS-PRIMAS .....	29
4.3 OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA E DE ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO .....	31
4.3.1 Planejamento seqüencial de experimentos para otimização do processo de extração de lipases em termos de atividade hidrolítica.....	31
4.3.2 Planejamento de experimentos para extração de lipases em termos de atividade de esterificação.....	37
4.4 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO POR PRECIPITAÇÃO EM SULFATO DE AMÔNIO.....	44
4.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO .....	46
4.6 ESTABILIDADE DA LIPASE CONCENTRADA A BAIXAS TEMPERATURAS.....	49
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	50
5.1 CONCLUSÕES.....	50
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reações catalisadas por lipases.....	7
Figura 2: Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1,3 específica. ....	8
Figura 3: Gráfico de Pareto do primeiro planejamento experimental completo $2^3$ para a extração de lipase de semente de trigo, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade hidrolítica obtida. ....	32
Figura 4: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o processo de extração de lipase de semente de trigo em função da atividade de hidrólise. ....	35
Figura 5: Gráfico da correlação entre os valores preditos e os valores observados da atividade hidrolítica no processo de extração da lipase de semente de trigo.....	36
Figura 6: Gráfico de Pareto do planejamento experimental completo $2^3$ para a extração de lipase de semente de trigo, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade de esterificação obtida.....	40
Figura 7: Superfície de resposta do comportamento da atividade de esterificação em função da (a) interação entre a granulometria e a razão sólido:solvente, (b) interação entre a granulometria e o tempo de extração e (c) interação entre a razão sólido:solvente e o tempo de extração, no processo de extração da lipase de semente de trigo.....	43
Figura 8: Gráfico de Pareto do planejamento experimental completo $2^2$ da caracterização parcial do extrato enzimático concentrado em termos de pH e temperatura ótimos. ....	47
Figura 9: Superfície de resposta da interação entre o pH e a temperatura para a atividade de hidrólise do extrato enzimático concentrado. ....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fontes biológicas e fornecedores de lipases comerciais.....	5
Tabela 2: Aplicações industriais de lipases.....	9
Tabela 3: Atividades específicas obtidas na precipitação com sulfato de amônio relatadas na literatura.....	12
Tabela 4: Temperaturas e pH ótimos de lipases relatadas na literatura. ....	13
Tabela 5: Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais utilizados no estudo da extração de lipase de semente de trigo para a atividade de hidrólise. ....	24
Tabela 6: Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais para atividade de esterificação no estudo da extração de lipase de semente de trigo. ....	25
Tabela 7: Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental completo $2^2$ para determinação do pH e temperatura ótimos da lipase de semente de trigo concentrada.....	27
Tabela 8: Seleção do solvente para extração de lipase de acordo com a polaridade e tempo de evaporação.....	28
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental completo $2^3$ de 8 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) com as respostas da atividade hidrolítica da lipase do gérmen e da semente de trigo. ....	29
Tabela 10: Resultados obtidos em termos de atividade de hidrólise dos grãos de trigo germinados utilizando ou não o tegumento presente nos mesmos.....	30
Tabela 11: Matriz do planejamento experimental completo $2^2$ de 4 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) juntamente com os pontos axiais referentes à atividade hidrolítica da lipase de semente de trigo.....	33
Tabela 12: Coeficientes de regressão obtidos pelo tratamento estatístico das respostas do processo de extração de lipase de semente de trigo.....	33
Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para a atividade de hidrolítica no processo de extração da lipase de semente de trigo.....	34

Tabela 14: Resultados dos testes preliminares concernentes à atividade de esterificação sem a enzima no tempo zero e com a enzima no tempo zero, utilizando 1 g e 2 g de extrato enzimático. ....	37
Tabela 15: Matriz do planejamento experimental completo $2^3$ de 8 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) com adição dos pontos axiais referentes a atividade de esterificação da lipase de semente de trigo. ....	39
Tabela 16: Coeficientes de regressão obtidos pelo tratamento estatístico das respostas do processo de extração da lipase de semente de trigo. ....	41
Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para a atividade de esterificação no processo de extração da lipase de semente de trigo. ....	42
Tabela 18: Resultados em termos de atividade de hidrólise e esterificação antes e após a precipitação do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio. ....	44
Tabela 19: Resultados em termos de atividade de hidrólise e esterificação (U/g) do extrato concentrado com sulfato de amônio e suas respectivas atividades específicas (U/mg de proteína). ....	45
Tabela 20: Matriz do planejamento experimental completo $2^2$ para a avaliação da temperatura e pH ótimos (valores codificados e reais) com as respostas da atividade hidrolítica para a lipase de semente de trigo concentrada. ....	46
Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) para a atividade de hidrólise do extrato enzimático concentrado. ....	48

## **1 INTRODUÇÃO**

Biocatalisadores ou catalisadores biológicos são proteínas cuja principal função é catalisar reações nos organismos. Estes biocatalisadores são denominados enzimas, e são utilizados como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens como elevada velocidade de reação, utilização de condições brandas, biodegradabilidade, alta especificidade pelo substrato, entre outras (CAMPBELL, 2000).

Dentre as inúmeras enzimas utilizadas atualmente, destacam-se as lipases (que representam 35% das enzimas empregadas), as quais são responsáveis por catalisar reações de hidrólise de triacilgliceróis insolúveis para gerar ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. Além da hidrólise, também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise e lactonização. As lipases (glicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) são originárias de grande número de bactérias, fungos, animais e plantas, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência. As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Antigamente eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para o consumo humano (FROST e MOSS, 1987; CASTRO et al., 2004).

As lipases têm encontrado aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos (aditivos, modificadores de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergente (remoção de gorduras), tratamento de efluentes (remoção de produtos oleosos) e farmacêutica (remédios, digestivos, enzimas para diagnósticos, etc). O potencial uso industrial das lipases em detergentes, biotransformações e reações de interesterificação e transesterificação também têm despertado interesse por essas enzimas. Lipases com especificidade comprovada têm especial importância nas reações de transformação e interesterificação, uma vez que os produtos formados podem ser mais facilmente obtidos por via enzimática do que em processos químicos convencionais (VILLENEUVE, 2003; MALDONADO, 2006).

Atualmente são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos, sob condições de biossegurança extremamente rígidas, devido às facilidades de controle e de aumento de capacidade produtiva dos processos fermentativos, porém o custo de produção ainda é bastante elevado (CARVALHO et al., 2003).

As enzimas microbianas são consideradas mais estáveis do que as extraídas de plantas e animais, porém, quando a aplicação da enzima obtida for destinada a

indústrias alimentícias ou farmacêuticas, há restrições legais e até culturais quanto ao uso de enzimas de fontes animais e em alguns casos de fontes microbianas. Além disso, no caso de enzimas microbianas, é muito difícil obter o certificado de segurança para realizações de experimentos (HASAN et al., 2006).

Com o objetivo de intensificar a utilização de lipases em escala piloto e industrial, estudos de fontes vegetais, como sementes, látex, folhas e caule, têm crescido com o passar dos anos (BOLLER, 1986; MUKHERJEE, 1994; FOGLIA e VILLENEUVE, 1997).

Estudos comprovam que em alguns casos o uso destas enzimas pode ser considerado como uma alternativa às lipases microbianas. Sua extração e purificação parcial são desenvolvidas com técnicas simples, são obtidas de material economicamente barato e geralmente exibem particular especificidade, além de serem tiposeletivas, o que pode ser vantajoso no emprego de enriquecimento específico em um tipo ou classe de ácidos graxos. Contudo, a transferência da escala de laboratório para maiores escalas pode ser problemática, devido a dificuldade em extrair e obter uma quantidade suficiente da lipase vegetal pois a mesma encontra-se em baixa quantidade na sua fonte (VILLENEUVE, 2003).

Dentre as lipases obtidas a partir de sementes, as mais estudadas têm sido as de arroz, mamona, canola, aveia, trigo, entre outras. Nesse trabalho optou-se por utilizar a semente de trigo como matéria-prima devido a sua grande capacidade de cultivo em âmbito regional, facilidade de obtenção e, devido ao fato de estudos anteriores, terem mostrado uma grande especificidade da lipase presente nesse cereal.

O trigo é um cereal da família das gramíneas, do gênero *Triticum* spp., que compreende cerca de 24 espécies, das quais as mais extensivamente cultivadas são *Triticum aestivum* e *Triticum durum*, sendo o cereal mais importante na alimentação humana, nas regiões de clima temperado. O gérmen de trigo, local onde estão localizadas as lipases, corresponde de 2,5 a 3,5% do grão, e é considerado um subproduto da indústria de farinhas (OSÓRIO, 1992).

Com base no exposto anteriormente, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a extração de lipases de semente de trigo. Para tal, a metodologia de planejamento de experimentos foi utilizada visando estabelecer condições operacionais que maximizassem as atividades lipásicas (hidrólise e esterificação) dos extratos brutos enzimáticos, sendo que esta última não foi encontrada em nenhum estudo na literatura, demonstrando assim a importância e o caráter inovador deste trabalho. A partir deste ponto, as seguintes etapas foram também desenvolvidas:

- Estudo da extração da lipase do gérmen do trigo e do trigo germinado.
- Definição de metodologia para a concentração do extrato enzimático bruto;
- Determinação da temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado;
- Avaliação da estabilidade do extrato enzimático concentrado a baixas temperaturas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo busca abordar, primeiramente, o estado da arte com relação às lipases, tipos de reações catalisadas por esta classe de enzima, sua especificidade em relação aos principais substratos por elas convertidos bem como as principais aplicações atualmente direcionadas a estes biocatalisadores. Em um segundo momento, uma revisão da literatura acerca de lipases vegetais e, mais especificamente, de semente de trigo, é apresentada visando embasar cientificamente o presente trabalho.

### 2.1 LIPASES

As lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases que têm como função biológica primordial catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeias longas e insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol (FREIRE et al., 1997; CASTRO et al., 2004).

As lipases (glicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) estão presentes na natureza sendo produzidas por várias plantas, animais e microrganismos, atuando sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (MACRAE e HAMMOND, 1985; CASTRO et al., 2004; ABDEL-FATTAH e GABALLA, 2008).

Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (FROST e MOSS, 1987). Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos, sob condições de biossegurança extremamente rígidas, devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção (CARVALHO et al., 2003).

Estas enzimas são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, com atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C e faixa de valores de pH de 5 a 9, com um ótimo freqüentemente situado entre 6 e 8 (MACRAE e HAMMOND, 1985; CASTRO et al., 2004; ABDEL-FATTAH e GABALLA, 2008). Apresentam peso molecular entre 20 e 60 KDa e são consideradas glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo (CARVALHO et al., 2003).

Lipases são de importância particular em biotecnologia em função de suas diversas aplicações em indústrias de alimentos, detergentes biológicos, aplicações médicas e na produção enzimática de substâncias químicas lipofílicas. Lipases termoestáveis apresentam um importante papel em processos industriais com temperaturas empregadas que excedem 50°C. Muitas lipases termoestáveis têm sido purificadas, caracterizadas e clonadas para usos na indústria de detergentes e no tratamento de esgoto doméstico (JAEGER e REETZ, 1998; SCHMID e VERGER, 1998; LEE et al., 1999; CHO et al., 2000; SINCHAIKUL et al., 2001; SHARMA et al., 2002; EWIS et al., 2004; ABDEL-FATTAH e GABALLA, 2008).

As enzimas microbianas são consideradas mais estáveis do que as extraídas de plantas e animais, porém, quando a aplicação da enzima obtida for destinada a indústrias alimentícias ou farmacêuticas, há restrições legais e até culturais quanto ao uso de enzimas de fontes animais e em alguns casos de fontes microbianas. Além disso, no caso de enzimas microbianas, é muito difícil obter o certificado de segurança para realizações de experimentos (HASAN et al., 2006).

A Tabela 1 apresenta uma compilação acerca de algumas fontes de lipases industriais e seus respectivos fornecedores comerciais (FABER, 2000; NEGISHI et al., 2003; HUANG e TSAI, 2004; SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; HAN et al., 2003; MARIA et al., 2002; KONTKANEN et al., 2004).

Tabela 1: Fontes biológicas e fornecedores de lipases comerciais.

<b>Fonte biológica</b>	<b>Fornecedor</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Fluka, Novozymes, Röhm
<i>Aspergillus</i> sp.	Novozymes
<i>Candida antarctica</i> A	Boehringer, Fluka, Novozymes
<i>Candida antarctica</i> B	Fluka, Novozymes, Boehringer
<i>Candida cylindracea</i>	Meito
<i>Candida rugosa</i>	Aldrich, Altus, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Meito Sangyo, Sigma, Roche
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Boehringer, Biocatalysts, Fluka, Novozymes
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano, Biocatalysts, Fluka
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano, Boehringer, Fluka, Mitsubishi, Röhm, Sigma
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Sigma
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano, Sigma
Gérmen de trigo	Fluka, Sigma
Pâncreas de suíno	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Röhm, Sigma

Em proteínas, quatro níveis de estruturas podem ser distinguidos. A estrutura primária refere-se à seqüência de aminoácidos, dando uma completa descrição das ligações covalentes da proteína. A estrutura secundária refere-se às formas de cadeias polipeptídicas,  $\alpha$ -hélices (ligações peptídicas em forma helicoidal) ou  $\beta$ -hélices (segmento da cadeia peptídica interage com outra em paralelo). As estruturas terciárias e quaternárias são descritas como sendo uma configuração tridimensional devido às interações não-covalentes entre os aminoácidos das cadeias polipeptídicas (HENDRICKX et al., 1998).

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática foram determinadas em 1990 (JAEGER e REETZ, 1998). Desde então, mais de onze estruturas de lipases já foram determinadas, das quais, com exceção da lipase pancreática, todas são de origem microbiana (JAEGER e REETZ, 1998; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

De acordo com SCRIBAN (1985), a atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária ou quaternária, por isso, todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento, alteração do pH, pressão), dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento.

## 2.2 REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como a esterificação, que consiste na formação de ligações éster, a partir de um álcool e um ácido carboxílico, sob condições microaquosas. Também podem catalisar reações de transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água no meio reacional também é um dos fatores determinantes para cada classe de reação. A Figura 1 demonstra as reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006).

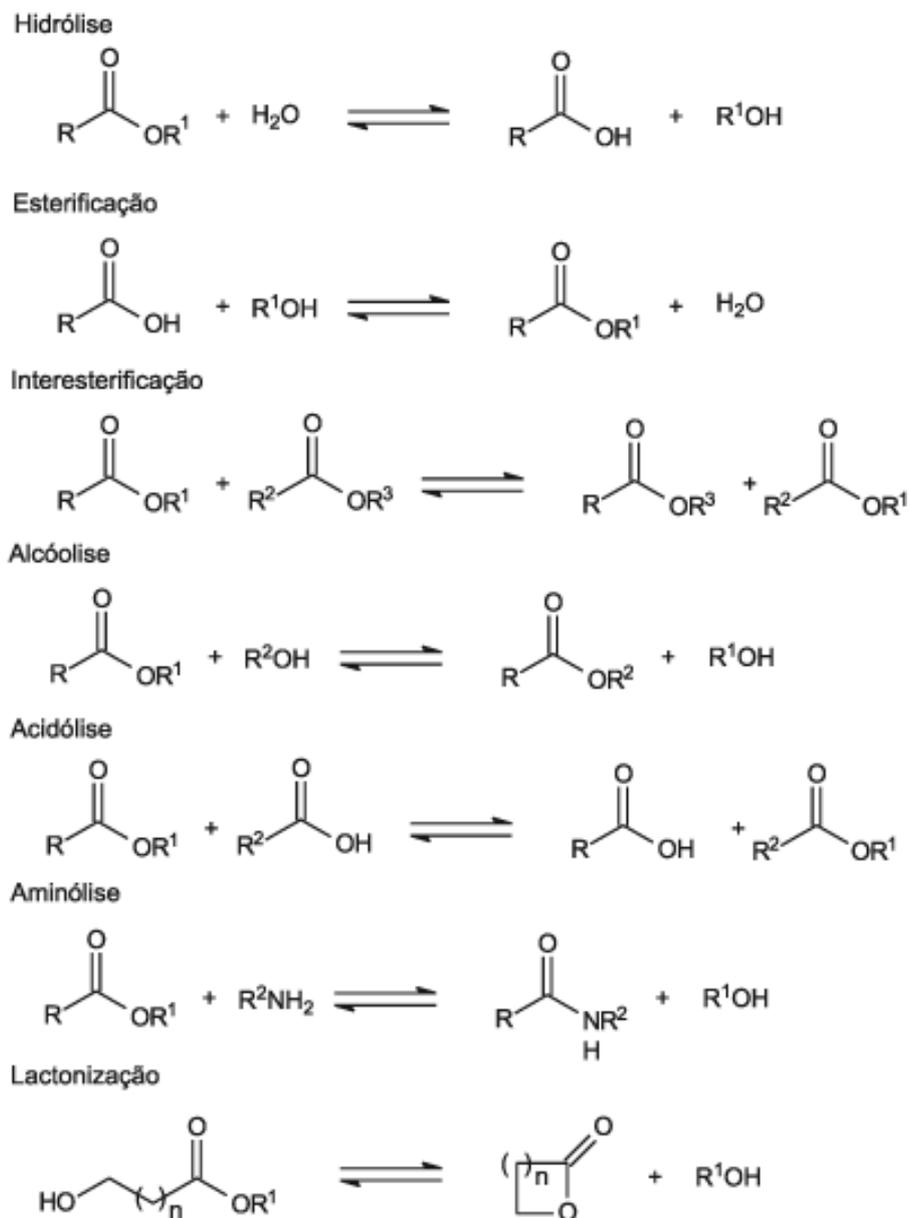


Figura 1: Reações catalisadas por lipases.

O uso deste biocatalisador em aminólise de ésteres, em meios anidros, tem sido bem sucedido na síntese de peptídeos e amidas de ácidos graxos. Esses resultados são promissores para a utilização de tecnologia de lipases em síntese de peptídeos opticamente ativos, polímeros, surfactantes e novos detergentes com baixo custo (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998; PAIVA e MALCATA, 1997; GANDHI, 1997; YAHYA et al., 1998; PANDEY et al., 1999; GHOTRA et al., 2002). A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese,

mas é independente de sua atividade de interesterificação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais.

### 2.3 ESPECIFICIDADE DAS LIPASES

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998; FABER, 1997). As lipases podem ser divididas em 3 grupos (FABER, 2000):

- Regiosseletivas:

Lipases não-específicas → hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;

Lipases 1,3-específicas → hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (Figura 2).

- Tipo-seletivas: com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturações do grupo acila.

- Enantiosseletivas: capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica.

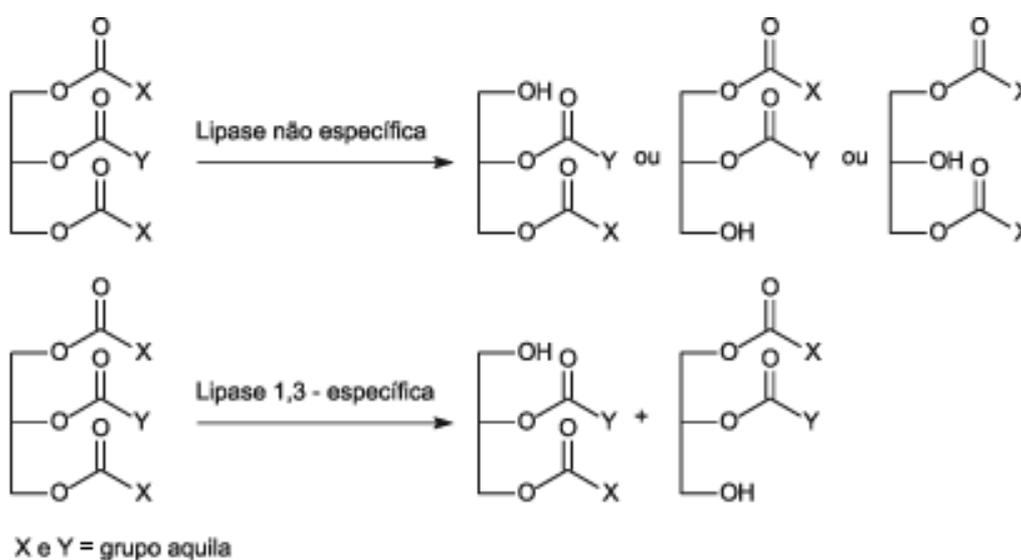


Figura 2: Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1,3 específica.

A especificidade estrutural ou regioseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato (CHOI et al., 1999). Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima, ou seja, de sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais. Desse modo, a catálise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir formas enantiômeras. Neste sentido, as lipases têm sido empregadas para resolução de racematos, resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos opticamente puros (JAEGER e EGGERT, 2002; JAEGER e REETZ, 2000; CHOI et al., 1999; FADNAVIS e KOTESHWAR, 1997).

## 2.4 APLICAÇÕES DAS LIPASES

O crescente interesse no uso de lipases encontra-se principalmente em aplicações industriais de larga escala, incluindo formulações de detergentes, degradação de óleos e gorduras, sínteses farmacêuticas e produção de cosméticos.

Embora atualmente as aplicações das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes também das reações de síntese e transesterificação e das características enântio e régio seletivas das lipases vêm se estabelecendo nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (CASTILHO et al., 2000). A Tabela 2 apresenta algumas aplicações industriais das lipases (MALDONADO, 2006).

Tabela 2: Aplicações industriais de lipases.

<b>Indústria</b>	<b>Aplicação</b>
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira
Cervejaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídeos
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue
Papel	Tratamento de polpas de celulose
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Juntamente com as proteases e carbohidrases, as lipases são consideradas o terceiro maior grupo de enzimas tendo como base o volume total de vendas. O uso comercial de lipases é um negócio de bilhões de dólares que abrange uma grande variedade de diferentes aplicações (JAEGER et al., 1999). A maioria das enzimas utilizadas industrialmente é de origem microbiana e vem sendo produzidas por fermentação submersa aeróbia convencional, a qual possibilita um maior controle das condições de crescimento do que a realizada em estado sólido (CHEETHAM, 1995).

O âmbito para a aplicação de lipases na indústria oleoquímica é enorme. Óleos e gorduras são produzidos no mundo a uma escala de aproximadamente 60 milhões de toneladas por ano e uma substancial parte (2 milhões por ano) são utilizadas em processos que consomem uma grande quantidade de energia como hidrólise, glicerólise e alcoólise. Outra aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica, e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos isômeros (R ou S) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico (HASAN et al., 2006).

Na reação de hidrólise, a alta especificidade das lipases pelo triglicerídeo com relação ao tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo propicia um grande número de aplicações dentro da área de alimentos. Aromatizantes para uso em alimentos destinados ao consumo humano e animal têm sido obtidos através da hidrólise parcial de triglicerídeos. Processos comerciais incluem a modificação enzimática da gordura do leite bem como o desenvolvimento de preparações enzimáticas para utilização na produção de queijos (MALCATA et al., 1990).

A reação de esterificação entre polióis e ácidos graxos livres é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. As velocidades relativas da reação direta (hidrólise) e inversa (esterificação) são usualmente controladas pela atividade de água da mistura reacional (OLIVEIRA et al., 2006).

A ação de lipases sobre ligações éster têm sido estudada e realizada em diferentes sistemas e contextos, com o intuito de explorar as vantagens deste catalisador natural. Regioseletividade, estereoespecificidade, especificidade pelo substrato e baixo consumo de energia são algumas das características que fazem com que os processos catalisados por lipases se tornem mais atrativos do que os processos convencionais não enzimáticos (PRAZERES et al., 1993).

## 2.5 PRÉ-PURIFICAÇÃO DE LIPASES

A etapa de purificação é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores níveis de atividade enzimática. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Após a obtenção do extrato enzimático bruto, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (MALDONADO, 2006).

A precipitação normalmente é utilizada como etapa inicial de isolamento, sendo o fracionamento com sulfato de amônio o método mais empregado (MARTINS, 2001). Esta metodologia consiste em uma das técnicas de concentração de proteínas, para separação das mesmas dos outros compostos do meio. A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação, no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4°C). A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume de precipitado (BORZANI et al., 2001).

Cumprir mencionar que, independente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a pré-purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica, mantendo o aumento sempre dentro de uma faixa (KOBBLITZ, 2003).

Na literatura são relatados vários trabalhos sobre precipitação de lipases com sulfato de amônio, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3: Atividades específicas obtidas na precipitação com sulfato de amônio relatadas na literatura.

Autor/ ano/ saturação	Fonte	Atividade do extrato enzimático	Atividade específica (U/mg de proteína)
BENJAMIN e PANDEY (2000) (20% a 100%)	<i>Candida rugosa</i>	18,14 U/mL	3,88
BACHA et al. (2005) (60%)	Lipase de pâncreas de avestruz	116000 U	521
SHARMA et al. (2002) (30% a 70%)	<i>Bacillus</i> sp. RSJ – 1	2425 U	44,82
KANWAR et al. (2002) (60%)	<i>Pseudomonas</i>	14,75 U	19,46
SHU et al. (2006) (70%)	<i>Antrodia cinnamomea</i>	188,7 U	12,7
PASTORE et al. (2003) (70%)	<i>Rhizopus</i> sp.	135600 U	103

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES

As lipases constituem o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, por causa da versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em grandes quantidades (HASAN et al., 2006). Neste sentido, a caracterização destas enzimas (extrato bruto, extrato concentrado, enzima purificada ou enzima imobilizada) é de extrema importância para o estabelecimento das condições de aplicação, como temperatura e pH ótimos (ALONSO, 2001), e a estabilidade da atividade enzimática em função da temperatura e do pH bem como durante seu armazenamento a baixas temperaturas.

Alguns trabalhos apresentados na literatura demonstram que as faixas de atuação de lipases em função do pH e da temperatura podem variar de acordo, principalmente, com a fonte (animal, vegetal ou microbiana) de obtenção, tornando esta etapa fundamental após a otimização da produção de determinada lipase. A Tabela 4 mostra alguns trabalhos da literatura com relação a pH e temperatura ótimos de diversas lipases.

Tabela 4: Temperaturas e pH ótimos de lipases relatadas na literatura.

Autor/ ano	Fonte	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo
BENJAMIN e PANDEY (2000)	<i>Candida rugosa</i>	40	7,0
MARTINS (2001)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	45	9,0
PASTORE et al. (2003)	<i>Rhizopus sp.</i>	40	6,0 – 6,5
PINHEIRO (2006)	<i>Penicillium verrucosum</i>	44	7,0
SHU et al. (2006)	<i>Antrodia cinnamomea</i>	45	8,0
SAGIROGLU e ARABACI (2005)	Semente de girassol ( <i>Heliantus annuus L.</i> )	50	7,5
GIORDANI et al. (1991)	Látex de mamão ( <i>Carica papaya</i> )	55	8,0
CARO et al. (2001)	Caule e folha do abacaxi ( <i>Ananas comosus</i> )	55	8,0
GIORDANI et al. (1991)	Látex de trovisco <i>Euphorbia characias</i>	45	8,0

## 2.7 LIPASES OBTIDAS A PARTIR DE FONTES VEGETAIS

Com o objetivo de intensificar a utilização de lipases em escala piloto e industrial, estudos de fontes vegetais como sementes, látex, folhas e caule, têm

crescido com o passar dos anos (BOLLER, 1986; MUKHERJEE, 1994; FOGLIA e VILLENEUVE, 1997). Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e de óleos de sementes, localizadas em diferentes tecidos e normalmente ativadas durante a germinação (MUKHERJEE, 1994).

Estudos revelaram que as lipases de sementes geralmente apresentam uma tiposeletividade pelo ácido graxo dominante da respectiva semente, tendo como exemplo a lipase de *Vernonia galamensis*, uma planta nativa da África, a qual mostrou especificidade pelo ácido vernólico (VILLENEUVE, 2003).

Muitas plantas oleaginosas contêm lipases com várias atividades lipolíticas, sendo as mais estudadas as que provêm da aveia, canola e mamona. A lipase de mamona (*Ricinus communis*) possui um grande diferencial, pois possui atividade na sua semente, sem a necessidade de germinação. Alguns estudos mostraram que esta enzima tem uma preferência pela hidrólise do ácido ricinoleico o qual constitui cerca de 90% do óleo da semente da mamona, porém não possui nenhuma regioseletividade (LIN et al., 1986).

A lipase da canola (*Brassica napus*), a qual localiza-se na parte lipídica da semente, também tem sido estudada e, de acordo com HILLS et al. (1990), é capaz de discriminar ácidos graxos insaturados cis-4 e cis-6. Outras lipases também foram detectadas em várias sementes oleaginosas como amendoim, linhaça e soja. Entre os cereais, o mais estudado provavelmente é a aveia (*Avena sativa*). Por exemplo, PIAZZA et al. (1992) estudaram a seletividade ácido graxa dessa lipase utilizando triacilgliceróis puros e homogêneos. Os autores observaram que esta lipase não apresenta especificidade posicional, pois hidrolisou ésteres primários e secundários. Sobre a tiposeletividade, os autores mostraram que os ácidos oléico, linoleico ou linolênico foram hidrolisados preferencialmente em comparação com os ácidos palmítico, petroselênico ou esteárico. Foi então concluído que a lipase de aveia possui uma especificidade bastante similar à observada na lipase de *Geotrichum candidum*. Além dessa fonte vegetal, também já é comercialmente disponível a lipase de gérmen de trigo, porém possui atividade principalmente em triacilgliceróis de cadeia curta, como a triacetina e a tributirina (VILLENEUVE, 2003).

MUKHERJEE (1994) classificou as lipases vegetais da seguinte forma:

1. Lipases verdadeiras ou lipases triacilglicerol (EC 3.1.1.3) - que catalisam a hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis, principal constituinte de lipídios do tecido de estocagem presente nas sementes;
2. Acil-hidrolases não específicas - que apresentam uma combinação de fosfolipases A1 (EC 3.1.1.32), A2 (EC 3.1.1.4), B (EC 3.1.1.5), glicolipases,

sulfolipases e que hidrolisam ácidos graxos esterificados em fosfoglicerídios e galactoglicerídios. Neste grupo estão também as monoacilglicerol lipases, que hidrolisam ácidos graxos esterificados em monoacilgliceróis;

3. Fosfolipase C (EC 3.1.4.3) e D (EC 3.1.4.4) - que hidrolisam ligações fosfodiéster entre glicerol e grupamento fosfato, em diferentes posições.

## 2.8 APLICAÇÕES DE LIPASES VEGETAIS

Teoricamente, lipases extraídas a partir de vegetais parecem ser bastante atrativas devido ao baixo custo envolvido em sua obtenção, fácil purificação e o fato de serem obtidas de fontes naturais sem a necessidade de tecnologias de genética molecular para sua produção. Porém, o fato de que as lipases de sementes estarem geralmente presentes em baixos níveis na sua fonte nativa, faz com que seu uso extensivo em escala piloto ou industrial seja dificultado.

Um exemplo de lipase com potencial aplicação como biocatalisador é a lipase da mamona (*Ricinus communis*). Essa enzima foi utilizada em reações de esterificação de ácidos graxos com glicerol ou em reações de hidrólise de diferentes óleos vegetais, nos quais os parâmetros que influenciavam o rendimento final foram avaliados, como por exemplo, a razão molar de substratos, temperatura, quantidade de água e concentração da lipase (VILLENEUVE, 2003).

O avanço dos estudos na obtenção de lipases de outras fontes vegetais vem se mostrando muito interessante, pois em vários casos já é possível considerar o uso destas enzimas como alternativa às lipases microbianas. Esta mudança está ocorrendo porque o isolamento e purificação parcial desta enzima utiliza técnicas simples; as mesmas serem tiposeletivas, o que pode ser vantajoso no emprego de enriquecimento específico em um tipo ou classe de ácidos graxos. Contudo, a transferência da escala de laboratório para maiores escalas pode ser problemática devido principalmente à baixa quantidade de lipases presentes na sua fonte vegetal. Uma maneira de evitar esse problema é focar as pesquisas para novas fontes de lipases vegetais e desenvolver novas aplicações, utilizando subprodutos da indústria ou resíduos agroindustriais, procurando outras propriedades além da atividade lipolítica (VILLENEUVE, 2003).

## 2.9 LIPASE DE TRIGO

Características referentes à extração da lipase de trigo, sua concentração, caracterização e purificação foram pouco desenvolvidas no meio científico e não há grande conhecimento sobre essa enzima, porém alguns autores possuem trabalhos publicados sobre este tema. Foi relatado que essa lipase foi isolada pela primeira vez em 1948, e mesmo este fato ter ocorrido há 60 anos atrás, as inúmeras propriedades, características, sua atividade hidrolítica, atividade de esterificação, além de sua estabilidade estrutural ainda não foram estudadas (SINGER e HOFSTEE, 1948).

Devido a estes fatos, neste trabalho optou-se por desenvolver um protocolo para a extração de lipases de semente de trigo, visando estabelecer condições operacionais que maximizassem as atividades lipásicas (hidrólise e esterificação) dos extratos brutos enzimáticos, utilizando a semente de trigo como matéria-prima devido a sua grande capacidade de cultivo em âmbito regional, facilidade de obtenção e, devido ao fato de estudos anteriores, terem mostrado uma grande especificidade da lipase presente nesse cereal. Além disso, objetivou-se também estudar a extração da lipase do gérmen do trigo e do trigo germinado, definir uma metodologia para a concentração do extrato enzimático bruto, determinar a temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado e avaliar a estabilidade do extrato enzimático concentrado a baixas temperaturas.

A semente de trigo contém inúmeras vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas. Por essa razão, tem sido amplamente utilizado nas indústrias alimentícias, médica e de rações. Contudo, seu uso integral é limitado pela sua instabilidade durante a estocagem, devido à presença de enzimas hidrolíticas e oxidativas (KAPRANCHIKOV et al., 2004). O alto conteúdo de lipases no gérmen de trigo resulta na liberação de ácidos graxos livres, os quais estão envolvidos numa cadeia de reações, levando ao aparecimento de rancidez no produto. Por essa razão, o problema da estabilidade desses produtos vem atraindo a atenção de muitos cientistas (ZYABLOVA, 2000).

O estudo das propriedades físico-químicas e dos mecanismos de ativação das lipases é um problema comum. A solução gira em torno de pesquisas a fim de encontrar melhores maneiras de regular a atividade enzimática e desenvolver meios racionais para estabilizar as lipases de semente de trigo (KAPRANCHIKOV et al., 2004).

## 2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na revisão da literatura apresentada no decorrer deste capítulo, pôde-se apresentar uma explanação sobre a importância da busca por lipases de diferentes fontes, em particular as de origem vegetal, bem como sua potencial utilização pela indústria devido sua alta especificidade e principalmente ao baixo custo de produção.

Poucos trabalhos sobre a atividade hidrolítica e de esterificação de lipase de semente de trigo estão disponíveis na literatura. O conhecimento das características dessas lipases como condições de extração, pH e temperaturas ótimas de atuação e estabilidade quando armazenadas a baixas temperaturas são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações.

Acrescentar novos resultados à lacuna encontrada na literatura neste tema específico e novos meios de extrair a lipase da semente de trigo, estudar sua atividade hidrolítica e a inovadora utilização em medidas de atividade de esterificação para possível futura aplicação como catalisador na síntese de biodiesel, são alguns dos objetivos deste trabalho. Levando-se em conta estes fatos e também devido à grande produção de trigo no Brasil e à relevância na obtenção de produtos de alto valor agregado a partir de resíduos agroindustriais, configurou-se a proposta deste trabalho, a qual é justificada científica e tecnologicamente, realizada conforme metodologia descrita no próximo capítulo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente capítulo aborda a descrição dos materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à otimização da extração, concentração e caracterização parcial da lipase obtida de semente de trigo.

#### 3.1 MATERIAIS

Os principais reagentes e soluções utilizados neste trabalho estão listados abaixo:

- Gérmen de trigo tostado (comercial) – MaisVitta;
- Sementes de trigo (*T. aestivum* Embrapa - Guamirim), doadas pela Empresa de Sementes Estrela de Erechim – RS;
- Acetona P.A. (Fmaia);
- Ácido láurico (Vetec);
- Álcool etílico (Fmaia);
- Álcool n-propílico (Synth);
- Azeite de oliva (ARISCO);
- Goma arábica ou goma acácia (Próton Química);
- Sulfato de amônio (Synth);
- Solução acetona:etanol (1:1 v/v);
- Solução NaOH 0,04 N;
- Solução NaOH 0,01 N;
- Solução tampão fosfato de sódio 0,1 M;
- Solução tampão acetato 0,1 M;
- Solução tampão Tris-aminometano 0,1 M.

#### 3.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Mixer (Black&Decker, modelo SB40);
- Papel filtro qualitativo nº 2;
- Peneiras (Bertel);
- Agitador de peneiras (DE LEO);
- pHmetro digital PG2000 (GEHAKA);
- Banho ultratermostato (Nova Ética);
- Câmara de germinação (Menoncin);
- Centrífuga refrigerada (Nova Técnica);
- Espectrofotômetro (Agilent 8453);
- Incubadora com agitação orbital (Marconi – MA 410);
- Liofilizador (EDWARDS);
- Moinho de facas (Marconi MA – 340);
- Shaker (Nova Técnica, NT 713);
- Titulador automático (Mettler Toledo, DL50).

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Extração da lipase de semente de trigo

Para a extração da lipase de semente de trigo, avaliou-se três fatores: granulometria das sementes trituradas (mesh), razão sólido:solvente (p/v) e tempo de extração/contato. Através dessas variáveis, foram realizados planejamentos experimentais, apresentados e descritos posteriormente no item 3.3.6.

As sementes de trigo foram trituradas em moinho de facas – Marconi MA – 340 e peneiradas em diferentes faixas granulométricas. Estas amostras (30 g) foram colocadas em um erlenmeyer com uma quantidade de acetona P.A. refrigerada, e mantida sob agitação em shaker à 150 rpm, com uma temperatura de 4°C, durante o tempo definido pelo planejamento. Após o período de agitação, as amostras foram filtradas a vácuo em papel filtro nº 2, com funil de Büchner, e lavadas com acetona P.A. (refrigerada) numa quantidade igual ao dobro da utilizada anteriormente. As amostras desengorduradas foram mantidas em frasco aberto em capela de exaustão por aproximadamente 15 horas para a evaporação da acetona residual. Ao extrato

bruto enzimático assim obtido foram realizadas as medidas de atividade de hidrólise e esterificação (LIAQUAT e OWUSU APENTEN, 2000, modificado).

### 3.3.2 Testes com outras matérias-primas

Paralelamente ao estudo da extração da lipase da semente do trigo, também foram realizados testes com o gérmen de trigo comercial e com o trigo germinado para efeito de comparação e também para avaliar em qual fonte a atividade lipásica era maior.

No caso do gérmen de trigo a matéria-prima utilizada foi obtida comercialmente (MaisVitta) em supermercado da região, e foi aplicado o primeiro planejamento experimental realizado com a semente de trigo. Este planejamento está exposto na Tabela 5 que será demonstrada posteriormente. As medidas de atividade de hidrólise e esterificação também foram realizadas conforme citado nos itens 3.3.4 e 3.3.5, respectivamente.

A realização de testes com trigo germinado foi feito devido à alguns autores (NCUBE et al., 1995; VILLENEUVE, 2003; CAVALCANTI et al., 2007) citarem que as únicas sementes que não necessitariam de germinação seriam a de mamona (*Ricinus communis* L.) e a de *Vernonia galamensis*, sendo que todas as outras necessitam desse procedimento previamente à extração da enzima.

Para a realização da germinação, 100 g de sementes foram adicionadas em um béquer com água destilada por 24 horas à temperatura ambiente, e posteriormente foram dispostas em placas com algodão umedecido e levadas à uma câmara de crescimento durante 48 horas, com temperatura controlada (25°C) e com fotoperíodo de 12 horas. Após esse processo avaliou-se a necessidade de retirar ou não o tegumento. Em seguida, as sementes (20 g) foram maceradas em almofariz com ajuda de um pistilo e adicionados às sementes 100 mL de tampão fosfato de sódio (ALFENAS, 1998, modificado). Este procedimento era realizado em banho de gelo, e após 30 minutos de maceração a mistura era mantida em repouso durante uma hora. Decorrido este tempo, a mistura era filtrada e o filtrado então era utilizado na medida de atividade de hidrólise. Como esta amostra já estava diluída em tampão, a emulsão para a atividade de hidrólise precisava ser mais concentrada, contendo 10% de azeite de oliva e 20% de goma arábica, ao invés de 5 e 10%, como na metodologia original (item 3.3.4). Em um erlenmeyer eram adicionados 10 mL desta emulsão juntamente

com 10 mL do filtrado, e eram então colocados em shaker seguindo o procedimento de determinação de atividade de hidrólise.

Para o trigo germinado não foi realizada a medida da atividade de esterificação devido à grande presença de água na solução de tampão fosfato de sódio, visto que a atividade de esterificação necessita de ambientes microaquosos para ser verificada.

### 3.3.3 Escolha do solvente

Anteriormente ao uso da acetona na metodologia de extração, foram realizados testes com 4 tipos de solventes diferentes com intuito de escolher o melhor solvente para a extração da lipase, baseados nas suas polaridades e no tempo de evaporação. Os solventes testados foram: n-hexano (Fmaia); acetona (Fmaia); butanol (Merck) e etanol (Fmaia).

A utilização de um solvente orgânico é necessária para a remoção de lipídios da semente, visto que KAPRANCHIKOV et al. (2004) demonstraram em seus estudos que a retirada prévia dos lipídios do trigo aumentou em até 1,8 vezes a atividade lipásica.

A metodologia de extração realizada foi a mesma citada anteriormente no item 3.3.1. Nesta etapa, foi utilizado 30 g da semente moída (tamanho da partícula de 500 µm) juntamente com 90 mL do solvente, em um tempo de extração de 10 horas. Após este tempo de extração, a atividade lipásica foi mensurada, conforme descrito a seguir.

### 3.3.4 Determinação da atividade de hidrólise do extrato enzimático

Para determinar a atividade de hidrólise foi utilizado como substrato azeite de oliva (5% p/v) emulsionado por 3 minutos com goma arábica (10% p/v) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 18 mL desta emulsão e 2 g do extrato enzimático bruto, agitando-se em incubadora com agitação orbital por 15 minutos à 37°C e 150 rpm. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida com a adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). As amostras foram então tituladas com uma solução de NaOH (0,04 N) até pH 11. Os brancos reacionais foram preparados com 18 mL de emulsão e após decorrido o

tempo de agitação foram adicionados 20 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v), 2 g de extrato enzimático e também foram titulados com NaOH (0,04 N) até pH 11 (PINHEIRO, 2006, modificado).

Uma unidade de atividade de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, e pode ser determinada através da equação 1 (LEAL, 2000).

$$A_H = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (1)$$

Onde:

$A_H$  = atividade hidrolítica (U/g);

$V_a$  = volume da amostra titulada (mL);

$V_b$  = volume do branco titulado (mL);

$m$  = massa da amostra usada na reação (g);

$t$  = tempo de reação (minutos);

$N$  = normalidade da solução de NaOH.

### 3.3.5 Determinação da atividade de esterificação do extrato enzimático

A atividade de esterificação das lipases foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação entre o ácido láurico e n-propanol com razão molar ácido/álcool de 1:1 à temperatura de 40°C, com o extrato enzimático a 10% (p/p) mantido sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da amostra (2 g) ao meio reacional, em um reator de vidro aberto de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático à 40°C. Alíquotas de 150  $\mu\text{L}$ , em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero (sem amostra) e após 40 minutos de reação e diluídas em 20 mL de acetona/etanol (1:1 v/v) com a finalidade de cessar a reação. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01 N até pH 11.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas (FEIHRMANN, 2005, modificado). A atividade de esterificação foi calculada através da equação a seguir:

$$A_E = \frac{(V_0 - V_{40}) \cdot N \cdot 1000 \cdot V_t}{t \cdot m \cdot V_a} \quad (2)$$

Onde:

$A_E$  = atividade de esterificação (U/g);

$N$  = normalidade da solução de NaOH;

$V_0$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

$V_{40}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min. de reação (mL);

$V_t$  = volume total (reagentes no reator);

$V_a$  = volume da alíquota utilizada na titulação;

$m$  = massa de amostra utilizada na reação (g);

$t$  = tempo de reação em minutos.

### 3.3.6 Planejamento experimental

Com base em alguns estudos prévios e dados obtidos na literatura (MUKHERJEE e KIEWITT, 1996; GANDHI e MUKHERJEE, 2001; KAPRANCHIKOV et al., 2004; ENUJIUGHA et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2007), definiu-se como variáveis independentes de estudo a granulometria dos grãos triturados (mesh), a razão sólido:solvente (p/v) e o tempo de extração. Para um melhor entendimento do procedimento experimental adotado, os planejamentos experimentais empregados serão apresentados em termos de atividade de hidrólise e de esterificação, os quais estão apresentados a seguir.

#### 3.3.6.1 Planejamento seqüencial de experimentos para otimização do processo de extração de lipases em termos de atividade hidrolítica

Primeiramente foi realizado um planejamento experimental completo  $2^3$ , com triplicata do ponto central, avaliando os efeitos da granulometria das sementes (mesh), a razão sólido:solvente e o tempo de extração.

Após avaliar estatisticamente as respostas obtidas nesse planejamento, foi desenvolvido um segundo planejamento experimental central rotacional com 2 fatores, a granulometria e o tempo. A razão sólido:solvente foi fixada em 30:60.

As variáveis e níveis dos planejamentos experimentais realizados estão apresentados na Tabela 5, onde os códigos 1,41 (positivo e negativo) correspondem aos valores dos pontos axiais.

Tabela 5: Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais utilizados no estudo da extração de lipase de semente de trigo para a atividade de hidrólise.

Variáveis	Níveis				
	Primeiro planejamento experimental				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Granulometria (mesh)	-	16	32	35	-
Razão sólido:solvente (p/v)	-	30:60	30:90	30:120	-
Tempo (h)	-	5	10	15	-
	Segundo planejamento experimental				
Granulometria (mesh)	28	32	35	42	48
Tempo (h)	8	10	15	20	22

### 3.3.6.2 Planejamento de experimentos para extração de lipases em termos de atividade de esterificação

Da mesma maneira que apresentado anteriormente, foi realizado um planejamento experimental completo  $2^3$ , com a utilização dos pontos axiais, tendo como variáveis a granulometria, razão sólido:solvente (p/v) e o tempo. Esses fatores e seus níveis estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais para atividade de esterificação no estudo da extração de lipase de semente de trigo.

Variáveis	Níveis				
	Primeiro planejamento experimental				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Granulometria (mesh)	9	16	32	35	60
Razão sólido:solvente (p/v)	30:39,6	30:60	30:90	30:120	30:140,4
Tempo (h)	1,6	5	10	15	18,4

Os resultados obtidos em termos de atividade de hidrólise e esterificação foram tratados estatisticamente pelo software Statistica 6.0.

### 3.3.7 Concentração do extrato enzimático bruto por precipitação com sulfato de amônio

Depois de otimizada a condição de extração, uma determinada quantidade desse extrato ( $\approx 120$  g) foi colocada em béqueres de 500 mL com adição de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0). Acrescentou-se sulfato de amônio até a saturação desejada (60%). Esta etapa foi realizada com agitador magnético em banho de gelo ( $4^{\circ}\text{C}$ ) com controle de pH (7,0), ajustado com adição de NaOH 20% até completa dissolução do sal.

Após este processo a solução foi filtrada em gaze e o filtrado obtido foi então colocado em tubos de centrífuga, permanecendo pelo tempo determinado no estudo à  $-10^{\circ}\text{C}$  em um congelador para a precipitação da amostra. Para a determinação da melhor condição de concentração do extrato enzimático, foi utilizada a concentração de saturação em sulfato de amônio já descrita na literatura (60%) (MENONCIN et al., 2008), variando-se somente o tempo de precipitação (5, 10, 15 e 24 horas).

Decorrido o tempo da precipitação, as amostras eram então centrifugadas a 8000 rpm por 30 minutos a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante era descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (SHU et al., 2006).

As amostras foram então liofilizadas por 48 horas até peso constante, e mediram-se as atividades de hidrólise e esterificação para determinar qual a melhor condição de precipitação. Estas foram armazenadas em geladeira para posterior medida da quantidade de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para a determinação de proteínas pelo método de Bradford foi utilizado Reagente de Bradford e uma curva padrão de albumina (1 mg/mL).

Para a medida de proteína era utilizada a seguinte metodologia: a amostra era pesada (0,5 g do extrato concentrado) e diluída em 1 mL de água deionizada. A mesma era agitada em vórtex e em seguida retirava-se uma alíquota de 100 µL e diluía-se em 2,5 mL de água deionizada. Novamente a mistura era agitada em vórtex e era retirada uma alíquota de 100 µL. Adicionava-se 5 mL do Reagente de Bradford, agitava-se em vórtex e a mistura era deixada em repouso durante 2 minutos. Após esse período eram feitas as leituras em espectrofotômetro à 595 nm.

A concentração de proteína era calculada conforme Equação 3:

$$[ ] \text{ prt} = \frac{\text{Abs}}{\text{fator}} \cdot d \quad (3)$$

onde:

[ ] prt = Concentração de proteína (mg prot./mL);

Abs = Absorbância lida nas amostras a 595nm;

d = Diluição das amostras;

fator = valor obtido na curva de calibração.

### 3.3.8 Caracterização parcial da lipase concentrada

A caracterização de enzimas (extrato bruto, extrato concentrado, enzima purificada ou enzima imobilizada) é de suma importância para o estabelecimento das condições de aplicação, como temperatura e pH ótimos e a estabilidade da atividade enzimática durante seu armazenamento a baixas temperaturas, uma vez que tais condições podem ter uma grande variação de acordo com a origem e os meios de produção utilizados.

### 3.3.8.1 Temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado

Na determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para a atividade lipásica do extrato enzimático concentrado, foi realizado um planejamento experimental completo  $2^2$  com triplicata do ponto central, totalizando 7 experimentos.

A metodologia para medida de atividade de hidrólise foi a mesma citada no item 3.3.4, com a diferença que no momento do preparo da emulsão, tampões com diferentes pH foram utilizados. Para o pH de 5,5 o tampão utilizado foi o tampão acetato, para o pH de 8,5 foi o tampão tris-aminometano e para o pH 7,0 tampão fosfato de sódio. Além disso, as amostras foram incubadas em diferentes temperaturas por 15 min a 150 rpm em agitador orbital. As faixas de pH e temperatura estudadas estão apresentadas na Tabela 7. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 7: Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental completo  $2^2$  para determinação do pH e temperatura ótimos da lipase de semente de trigo concentrada.

Níveis	Temperatura (°C)	pH
-1	32	5,5
0	37	7,0
+1	42	8,5

### 3.3.8.2 Estabilidade da lipase concentrada a baixas temperaturas

Após a concentração da enzima com sulfato de amônio na condição maximizada, os extratos foram armazenados (amostras de 2 g) à temperatura de 4°C e -10°C, sendo medida a atividade de hidrólise nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas e a esterificação em 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de estocagem, a fim de acompanhar a estabilidade da atividade da lipase concentrada à baixas temperaturas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, concernente à extração da lipase de semente de trigo, gérmen de trigo e grão germinado, sua concentração e posterior caracterização parcial dos extratos enzimáticos obtidos.

### 4.1 ESCOLHA DO SOLVENTE ORGÂNICO

Os parâmetros levados em consideração para a escolha do solvente a ser utilizado na etapa de extração da lipase de semente de trigo foram a polaridade e o tempo de evaporação. Os valores obtidos para cada solvente sob consideração são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Seleção do solvente para extração de lipase de acordo com a polaridade e tempo de evaporação.

<b>Solvente</b>	<b>Polaridade (k')</b>	<b>Tempo de Evaporação</b>
Acetona	5,4	Menos de 2 horas
Etanol	5,2	Menos de 4 horas
Butanol	3,9	Menos de 12 horas
Hexano	0,06	Mais de 24 horas

Através desta avaliação foi definida a acetona como melhor solvente entre os testados. Como pode ser observado, a acetona apresenta maior polaridade em relação aos outros solventes e rápida evaporação, permitindo viabilizar o processo de extração em um menor intervalo de tempo. Este mesmo solvente também foi utilizado para extração de lipase a partir de sementes por LIAQUAT e OWUSU APENTEN (2000) e para a semente de girassol por SAGIROGLU e ARABACI (2005).

## 4.2 TESTES COM OUTRAS MATÉRIAS-PRIMAS

A partir da definição do melhor solvente, deu-se seqüência ao trabalho estudando as diferentes matérias-primas possíveis de serem utilizadas para a extração da lipase de trigo, sendo que os resultados obtidos são apresentados a seguir.

Foi realizado um planejamento experimental para o estudo da atividade de hidrólise do gérmen de trigo comercial, e a metodologia para extração juntamente com a análise da atividade de hidrólise foram iguais às submetidas às sementes, e os níveis e variáveis foram os mesmos apresentados na Tabela 5. A Tabela 9 apresenta os resultados da atividade de hidrólise para o gérmen e a semente de trigo.

Tabela 9: Matriz do planejamento experimental completo  $2^3$  de 8 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) com as respostas da atividade hidrolítica da lipase do gérmen e da semente de trigo.

Experimento	Granulometria (mesh)	Razão sólido:solvente (p/v)	Tempo (h)	At. Hidrólise (U/g)	
				Gérmen de trigo	Semente de trigo
1	-1 (16)	-1 (30:60)	-1 (5)	0,79	0,72
2	+1 (35)	-1 (30:60)	-1 (5)	1,35	1,12
3	-1 (16)	+1 (30:120)	-1 (5)	0,31	0,85
4	+1 (35)	+1 (30:120)	-1 (5)	1,20	0,38
5	-1 (16)	-1 (30:60)	+1 (15)	2,45	2,53
6	+1 (35)	-1 (30:60)	+1 (15)	0,97	0,75
7	-1 (16)	+1 (30:120)	+1 (15)	1,21	1,23
8	+1 (35)	+1 (30:120)	+1 (15)	0,66	1,98
9	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	0,68	1,24
10	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	0,46	1,47
11	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	0,91	1,11

A atividade de hidrólise também foi estudada para o grão germinado com o tegumento e retirando o tegumento que surge no momento da germinação, e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados obtidos em termos de atividade de hidrólise dos grãos de trigo germinados utilizando ou não o tegumento presente nos mesmos.

Experimento	Tegumento	At. Hidrólise (U/g)
1	Sem	0,66±0,06
2	Com	1,07±0,08

Como pode ser observado na Tabela 9, os valores de atividade de hidrólise para o gérmen de trigo nos ensaios 3, 5, 7, 8, 9, 10 e 11, foram inferiores quando comparados aos resultados obtidos no mesmo planejamento experimental para as sementes. Isso pode ter ocorrido devido ao gérmen de trigo ser comercializado tostado. Como consta na literatura (FURLONG, 2000), altas temperaturas desnaturam proteínas, fazendo com que as enzimas sejam inativadas, por isso suspeita-se que o tratamento térmico sofrido pelo gérmen tenha desnaturado essas lipases. A solução para esse problema seria a utilização de gérmen de trigo *in natura*, porém não foi encontrado em nenhum estabelecimento comercial da região. A justificativa para este fato é que devido a atividade lipásica, o gérmen oxida muito rapidamente, fazendo com que este tipo de produto necessite de um tratamento térmico para sua comercialização.

Também foram realizados alguns testes para a atividade de esterificação, utilizando como parâmetros de extração os valores onde a atividade encontrada para a semente foi maior. Os resultados obtidos variaram de 4,9 a 26,8 U/g, sendo também menores que os valores encontrados para as sementes, conforme resultados que serão apresentados posteriormente.

Desta forma, decidiu-se por não dar continuidade ao estudo utilizando gérmen de trigo comercial, seguindo o trabalho somente para a semente de trigo.

Na Tabela 10 os resultados de atividade de hidrólise utilizando tanto a semente com o tegumento quanto sem o tegumento também foram bastante baixos quando comparados aos valores obtidos para as sementes (Tabela 9). Este fato pode ter ocorrido devido à semente de trigo não precisar da germinação para a ativação das enzimas, como cita VILLENEUVE (2003), e também como na germinação há um consumo de energia por parte da planta para seu crescimento, pode ser que a parte lipídica seja toda absorvida, consumindo assim também as lipases presentes.

Da mesma maneira que com o gérmen, decidiu-se finalizar os estudos com o trigo germinado e prosseguir o trabalho utilizando a semente de trigo.

### 4.3 OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA E DE ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

#### 4.3.1 Planejamento seqüencial de experimentos para otimização do processo de extração de lipases em termos de atividade hidrolítica

Após a consecução do primeiro planejamento experimental, a atividade de hidrólise do extrato obtido a partir de semente de trigo foi determinada em cada condição. As respectivas respostas estão demonstradas na Tabela 9.

Através dos resultados obtidos, observa-se que o experimento 5 conduziu ao maior valor de atividade de hidrólise, seguido do experimento número 8. Também verifica-se que no ponto central os valores mostraram-se bastante próximos, demonstrando assim a reprodutibilidade dos experimentos. Com esses valores, fez-se o tratamento estatístico e pôde-se constatar que, num nível de significância de 90%, as variáveis significativas foram o tempo e a interação da granulometria com a razão sólido:solvente. O gráfico de Pareto obtido (Figura 3) permite observar o efeito de cada variável avaliada no primeiro planejamento experimental.

Observando-se este gráfico, percebe-se que a razão sólido:solvente não apresentou efeito significativo, o que levou a fixar o seu valor, no segundo planejamento experimental, no mínimo que foi estudado neste 1º planejamento (30:60), tendo em vista também um menor gasto de solvente orgânico.

Mesmo a granulometria não apresentando significância, o efeito da interação Granulometria x Razão sólido:solvente foi significativo e positivo. Analisando os resultados obtidos nesses experimentos e devido a estudos prévios (CAVALCANTI et al., 2007), decidiu-se continuar estudando os diferentes tamanhos das partículas para verificar o efeito desta variável. Desta forma, no 2º planejamento experimental, a variável granulometria teve seu nível deslocado para o maior nível estudado anteriormente que foi de 425 µm (mesh 35).

Como o tempo apresentou um efeito positivo, decidiu-se estudar diferentes valores, todos próximos das 15 horas, devido às melhores respostas estarem nos experimentos que utilizaram este tempo e também por ser semelhante ao período (16 horas) utilizado para a extração de lipase de semente de mamona (*Ricinus communis* L.) (CAVALCANTI et al., 2007).

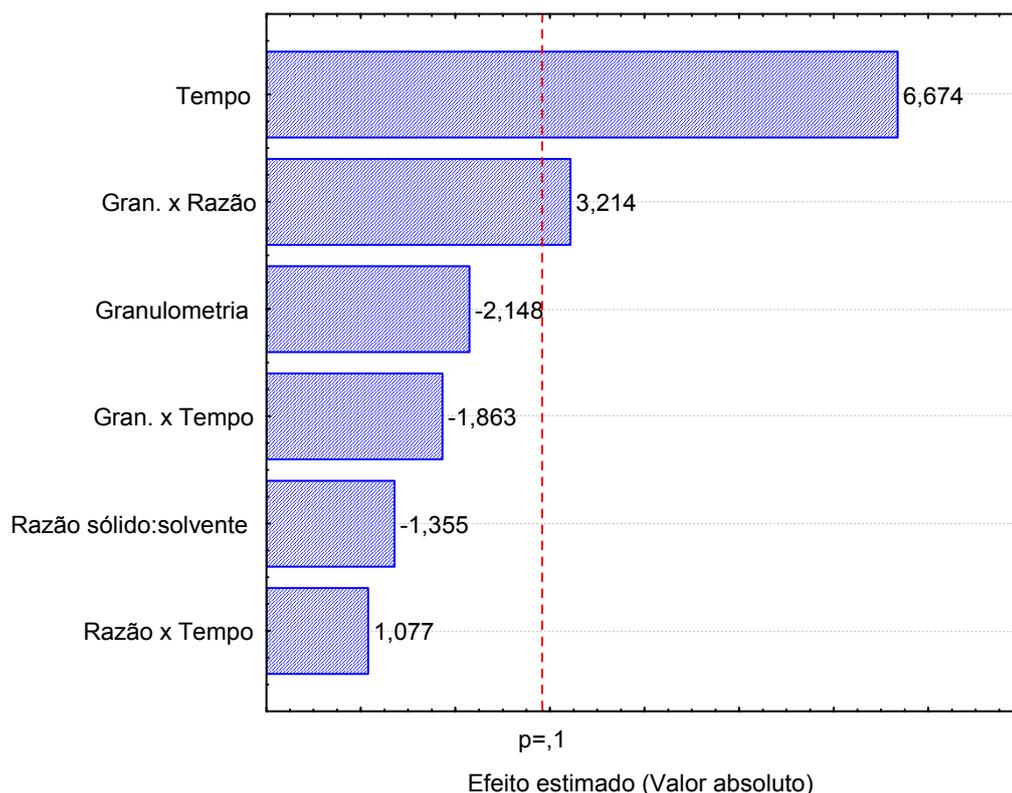


Figura 3: Gráfico de Pareto do primeiro planejamento experimental completo  $2^3$  para a extração de lipase de semente de trigo, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade hidrolítica obtida.

No desenvolvimento do segundo planejamento experimental, os resultados de atividade de hidrólise permitiram concluir que as maiores atividades hidrolíticas foram obtidas nas condições experimentais referentes ao ponto central. Essa resposta nos permite prever a proximidade das condições ótimas para a extração. Fez-se necessário então o estudo de pontos axiais para que o modelo empírico em termos de atividade hidrolítica da lipase de semente de trigo fosse validado. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos no 2º planejamento experimental completo, contendo agora dois fatores, totalizando 7 experimentos, com a adição das respostas para os pontos axiais.

Tabela 11: Matriz do planejamento experimental completo  $2^2$  de 4 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) juntamente com os pontos axiais referentes à atividade hidrolítica da lipase de semente de trigo.

Experimento	Granulometria (mesh)	Tempo (h)	At. Hidrólise (U/g)
1	-1 (32)	-1 (10)	1,44
2	+1 (42)	-1 (10)	4,40
3	-1 (32)	+1 (20)	1,37
4	+1 (42)	+1 (20)	0,60
5	0 (35)	0 (15)	4,85
6	0 (35)	0 (15)	5,26
7	0 (35)	0 (15)	5,90
8	-1,41 (28)	0 (15)	1,52
9	+1,41 (48)	0 (15)	0,63
10	0 (35)	-1,41 (8)	2,71
11	0 (35)	+1,41 (22)	0,63

Após a determinação das respostas de atividade de hidrólise mostradas na Tabela 11, os dados foram tratados estatisticamente com a finalidade de obter um modelo matemático empírico através dos coeficientes de regressão e também a consecução da superfície de resposta otimizada. A Tabela 12 apresenta as variáveis e seus respectivos coeficientes de regressão.

Tabela 12: Coeficientes de regressão obtidos pelo tratamento estatístico das respostas do processo de extração de lipase de semente de trigo.

	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(2)	p
Média	5,337	0,307	17,368	0,00006
Granulometria(L)	0,116	0,188	0,617	0,68233
Granulometria(Q)	-1,989	0,225	-8,844	0,00157
Tempo (L)	-0,852	0,188	-4,523	0,02454
Tempo (Q)	-1,690	0,225	-7,518	0,00323
Gran. (L) x Tempo (L)	-0,933	0,266	-3,508	0,05680

( $p \leq 0,05$ )

Através dessa tabela pode-se observar que as únicas variáveis não significativas foram a granulometria(L) e a interação Gran. x Tempo, porém como o valor de p da interação Gran. x Tempo é muito próximo do nível de significância (0,05), decidiu-se manter essa variável no modelo empírico codificado. Também foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos fatores estudados, e suas respostas são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para a atividade de hidrolítica no processo de extração da lipase de semente de trigo.

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F calculado
Regressão	39,01	4	9,75	19,66
Resíduo	2,97	6	0,49	
Falta de ajuste	2,40	4		
Erro puro	0,56	2		
Total	41,98	10		

Coefficiente de correlação:  $R=0,96$ ,  $F_{0,95; 4;6} = 4,53$

Com um coeficiente de correlação de  $R = 0,96$  à um nível de significância de 95%, e com um valor de F calculado (19,66) maior que o F tabelado (4,53), foi possível validar estatisticamente o modelo empírico, o qual utiliza os valores dos coeficientes de regressão das variáveis significativas, que estão dispostas na Tabela 12. O modelo matemático empírico codificado está demonstrado na Equação 4, e através da validação do modelo tornou-se possível a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.

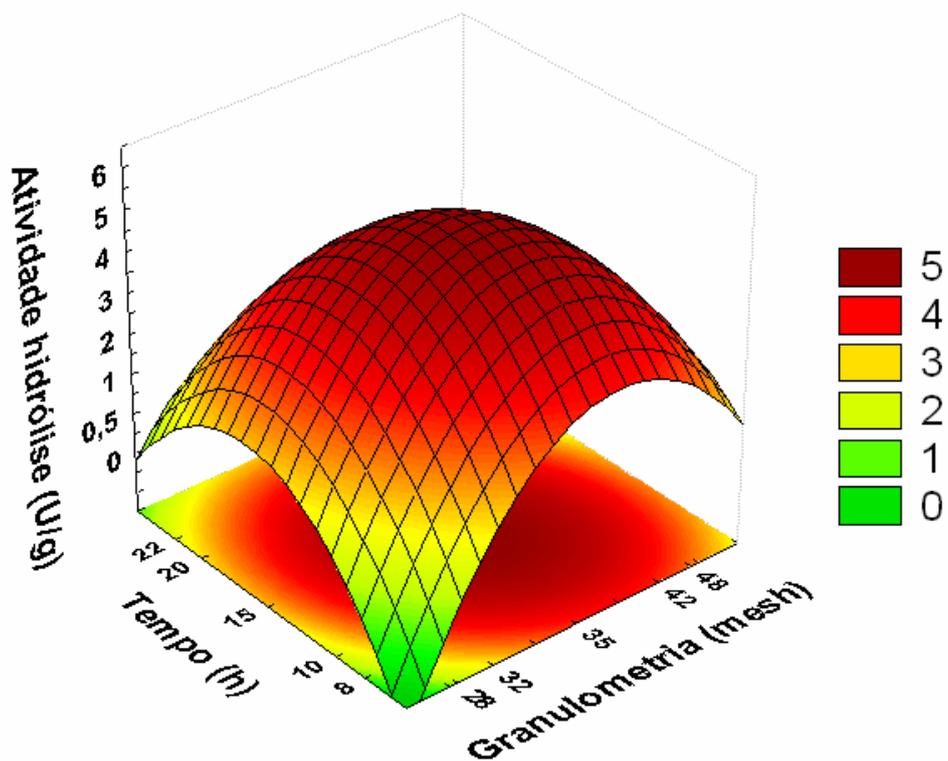
$$Y = 5,337 - 1,989.G^2 - 0,852.T - 1,690.T^2 - 0,933.G.T \quad (4)$$

Onde:

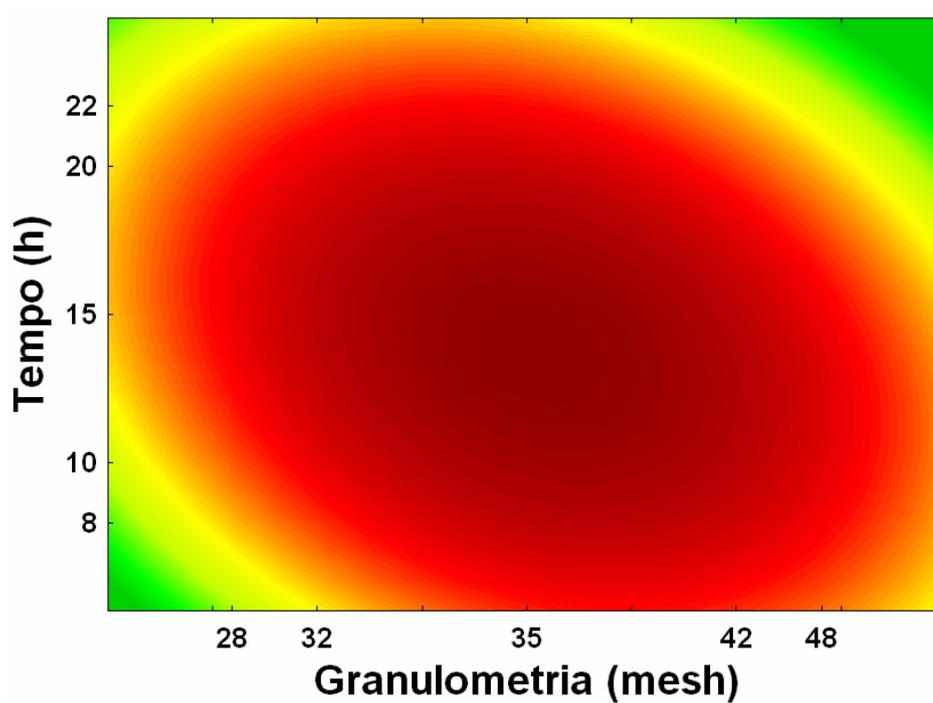
Y: Atividade hidrolítica (U/g);

G: Valor codificado para a granulometria (mesh);

T: Valor codificado para o tempo (h).



(a)



(b)

Figura 4: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o processo de extração de lipase de semente de trigo em função da atividade de hidrólise.

Como se pode observar nestes gráficos, foi obtida uma otimização do processo de extração, onde os melhores resultados de atividade de hidrólise se encontram na parte superior e central, correspondente ao ponto central do planejamento experimental. O gráfico com os valores observados e preditos pelo modelo empírico, apresentado na Figura 5, demonstra a boa correlação obtida entre os valores teóricos e os obtidos na prática ( $R = 0,96$ ).

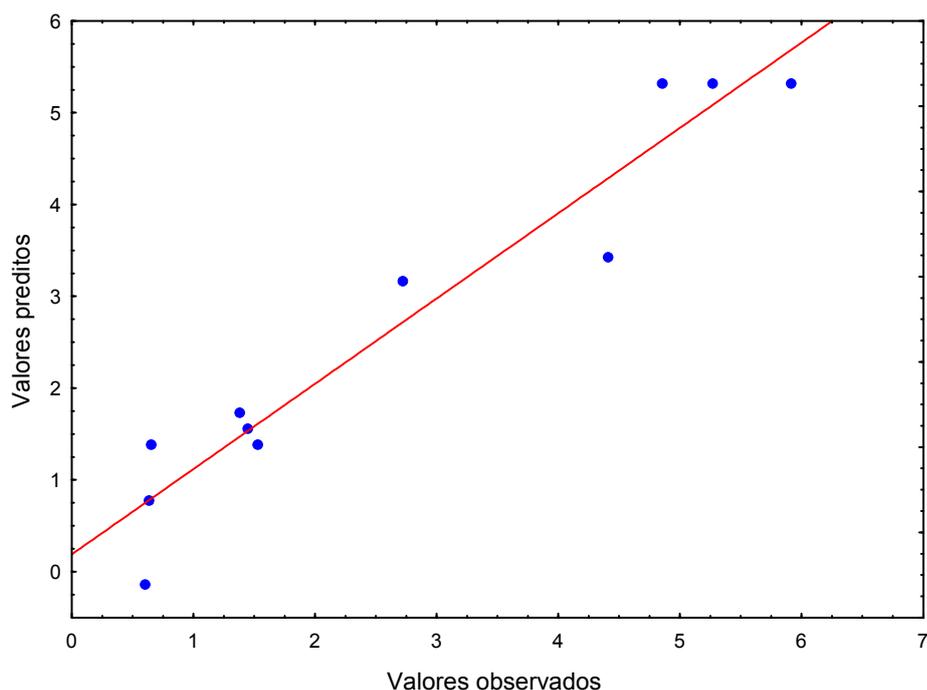


Figura 5: Gráfico da correlação entre os valores preditos e os valores observados da atividade hidrolítica no processo de extração da lipase de semente de trigo.

Os valores de atividades de hidrólise (5,9 U/g) obtidos nestes experimentos são superiores aos obtidos em estudos de KAPRANCHIKOV et al. (2004), que foi de 0,195 U/g em termos de atividade hidrolítica para a lipase de gérmen de trigo em suas melhores condições experimentais, embora estes autores tenham utilizado óleo de oliva purificado e polivinil álcool (PVS) na preparação da emulsão.

Devido à baixa quantidade de lipídios na constituição da semente de trigo, as atividades hidrolíticas foram significativamente baixas quando comparadas a sementes que possuem alto grau de ácidos graxos. Exemplificando, SAGIROGLU e ARABACI (2005) encontraram uma atividade hidrolítica de 920 U/g para a lipase de semente de

girassol (*Heliantus annuus L.*). Já para CAVALCANTI et al. (2007), a atividade de hidrólise para a semente de mamona (*Ricinus communis L.*) foi de 28 U/g. Em um estudo sobre a lipase de arroz (*Oryza sativa*), que possui baixa concentração de lipídios, da mesma forma que o trigo, uma atividade hidrolítica de 0,85 U/g foi obtida, apesar do ácido graxo hidrolisado ter sido a tributirina (PRABHU et al., 1999).

#### 4.3.2 Planejamento de experimentos para extração de lipases em termos de atividade de esterificação

Durante o desenvolver da metodologia para a medida de atividade de esterificação, surgiram alguns problemas principalmente no que diz respeito à reprodutibilidade, e por consequência algumas dúvidas com relação a alguns pontos específicos desse método, como por exemplo qual a quantidade de amostra a ser utilizada, o volume das alíquotas a serem retiradas do meio reacional e a medida do tempo zero ser realizado com ou sem a presença da enzima. Por esses motivos decidiu-se realizar alguns testes preliminares para definição da metodologia de dosagem da atividade de esterificação. Os resultados obtidos nesta etapa estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados dos testes preliminares concernentes à atividade de esterificação sem a enzima no tempo zero e com a enzima no tempo zero, utilizando 1 g e 2 g de extrato enzimático.

Alíquota	Amostra	At. Esterificação (U/g)	At. Esterificação (U/g)
		(Sem enzima t <sub>0</sub> )	(Com enzima t <sub>0</sub> )
		Média ± DP	Média ± DP
100 µL	1 g	45,58 <sup>c</sup> ±1,86	43,97 <sup>c</sup> ±1,07
	2 g	57,07 <sup>a</sup> ±0,82	34,60 <sup>d</sup> ±0,52
150 µL	1 g	41,90 <sup>c</sup> ±0,67	46,11 <sup>bc</sup> ±3,14
	2 g	53,29 <sup>ab</sup> ±3,24	44,34 <sup>c</sup> ±0,69

\*Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Realizando uma comparação entre os diferentes testes, observa-se que o experimento sem a enzima no tempo zero, utilizando 2 gramas de amostra e alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi estatisticamente igual ao valor encontrado para o experimento nas mesmas condições, exceto pela alíquota de 150  $\mu\text{L}$ , apresentando os melhores valores de atividade de esterificação nesses testes.

Pode-se notar também que utilizando uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$ , com adição da enzima no tempo zero numa quantia de 2 gramas, a atividade de esterificação foi a menor encontrada diferindo de todos os outros resultados.

Como não houve diferença significativa entre os experimentos que tiveram os maiores valores de atividade de esterificação, decidiu-se dar continuidade à metodologia padrão, a qual utiliza uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  sem a adição da enzima no tempo zero, modificando apenas a quantidade de enzima que passou de 1 para 2 g.

No caso da retirada da alíquota de 200  $\mu\text{L}$ , a formação de um precipitado na solução tornava a titulação problemática, resultando assim em erros no desenvolvimento do experimento.

Após o esclarecimento obtido através dos testes realizados na medida de atividade de esterificação, realizou-se um planejamento experimental completo  $2^3$ , seguido de um ajuste para um modelo de segunda ordem utilizando a análise dos pontos axiais. A Tabela 15 apresenta os valores de atividade de esterificação determinados em cada condição estudada.

Analisando os resultados, concluiu-se que a melhor atividade foi de 57,88 U/g, correspondendo à uma granulometria de 425  $\mu\text{m}$  (mesh 35), razão sólido:solvente de 30:120 (p/v) e um tempo de reação de 5 horas. Esse resultado em relação à razão sólido:solvente já era esperado, pois quanto maior a quantidade de solvente, maior é a superfície de contato dos grãos triturados com este solvente, facilitando a extração da enzima, e conseqüentemente, o tempo necessário para extração será menor.

Já para a granulometria, os resultados nos levam a concluir que quanto menor o tamanho da partícula, maiores serão os valores de atividades. Estes resultados também eram esperados, pois sendo uma enzima intracelular, quanto menor a granulometria utilizada, maior é a possibilidade de obtê-la, embora se tenha um limite no tamanho desta partícula. Como se pode observar no experimento 13 onde a granulometria era de 250  $\mu\text{m}$  (mesh 60), a atividade de esterificação foi menor em relação a atividade onde a granulometria era 425  $\mu\text{m}$  (mesh 35), possivelmente porque em granulometrias muito pequenas há o predomínio da parte farinácea (amido) do grão de trigo.

Tabela 15: Matriz do planejamento experimental completo  $2^3$  de 8 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) com adição dos pontos axiais referentes a atividade de esterificação da lipase de semente de trigo.

Experimento	Granulometria (mesh)	Razão sólido:solvente (p/v)	Tempo (h)	At. Esterificação (U/g)
1	-1 (16)	-1 (30:60)	-1 (5)	7,06
2	+1 (35)	-1 (30:60)	-1 (5)	31,43
3	-1 (16)	+1 (30:120)	-1 (5)	19,53
4	+1 (35)	+1 (30:120)	-1 (5)	57,88
5	-1 (16)	-1 (30:60)	+1 (15)	29,16
6	+1 (35)	-1 (30:60)	+1 (15)	55,32
7	-1 (16)	+1 (30:120)	+1 (15)	23,41
8	+1 (35)	+1 (30:120)	+1 (15)	35,93
9	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	22,58
10	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	21,20
11	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	21,89
12	-1,68 (9)	0 (30:90)	0 (10)	7,60
13	+1,68 (60)	0 (30:90)	0 (10)	44,03
14	0 (32)	-1,68 (30:39,6)	0 (10)	10,98
15	0 (32)	+1,68 (30:140,4)	0 (10)	19,41
16	0 (32)	0 (30:90)	-1,68 (1,6)	31,39
17	0 (32)	0 (30:90)	+1,68 (18,4)	14,72

Através da Tabela 15 também é possível observar que os valores de atividade para os experimentos 4 e 6 foram bastante próximos, o que levou ao estudo da viabilidade do processo, visto que num dos ensaios a quantidade de solvente era maior, porém em um tempo de extração menor e vice-versa. Levando-se em conta então uma futura aplicação a nível industrial e a possibilidade de recuperação do solvente, decidiu-se como parâmetros para extração os valores apresentados no experimento 4.

Embora exista certa variância entre as respostas apresentadas na Tabela 15, os valores de atividade de esterificação foram maiores quando comparados aos da atividade de hidrólise. Esta constatação é bastante importante para este trabalho, pois esses resultados são considerados promissores, além de que não foi encontrado na

literatura nenhum estudo com essa enzima a respeito de análise de atividade de esterificação.

Os valores apresentados na Tabela 15 foram tratados estatisticamente à um nível de significância de 95%, e as variáveis significativas estão demonstradas no gráfico de Pareto (Figura 6).

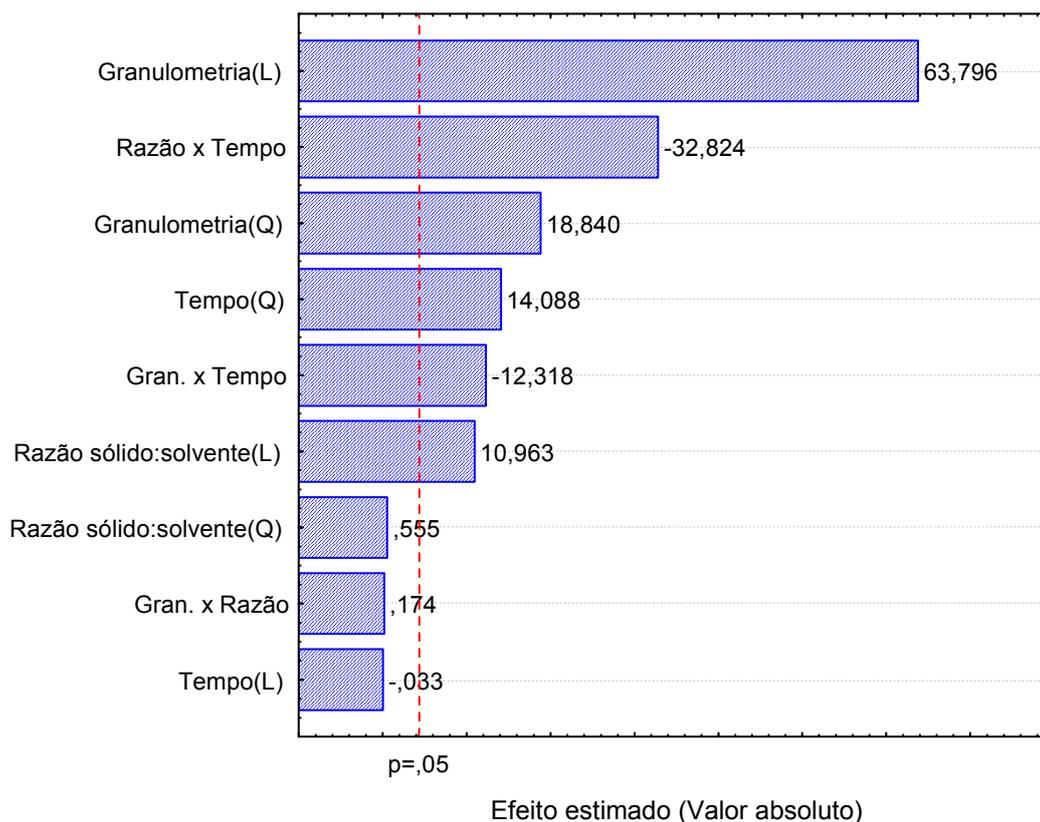


Figura 6: Gráfico de Pareto do planejamento experimental completo  $2^3$  para a extração de lipase de semente de trigo, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade de esterificação obtida.

Através da Figura 6 percebe-se que as variáveis significativas obtidas foram a granulometria (L e Q), a razão sólido:solvente (L), o tempo (Q) e as interações da granulometria com o tempo e da razão com o tempo.

Após estas constatações, decidiu-se avaliar os coeficientes de regressão para a obtenção do modelo matemático empírico do experimento. As variáveis e os valores dos coeficientes de regressão estão na Tabela 16.

Posteriormente ao estudo dos coeficientes de regressão, realizou-se também a análise de variância (ANOVA) das respostas obtidas (Tabela 17), a qual tornou possível a validação do modelo visto que o valor de F calculado (6,33) foi maior que o F tabelado (3,21). Além disso, a obtenção de um bom coeficiente de correlação ( $R = 0,88$ ) à um nível de significância de 95%, validou o modelo matemático apresentado na Equação 5 e conseqüentemente a construção da superfície de resposta.

Tabela 16: Coeficientes de regressão obtidos pelo tratamento estatístico das respostas do processo de extração da lipase de semente de trigo.

	<b>Coef. de regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	21,147	0,397	53,195	0,0003
Granulometria (L)	11,916	0,186	63,796	0,0002
Granulometria (Q)	3,877	0,205	18,840	0,0028
Razão (L)	2,047	0,186	10,963	0,0082
Razão (Q)	0,114	0,205	0,555	0,6344
Tempo (L)	-0,006	0,186	-0,033	0,9762
Tempo (Q)	2,899	0,205	14,088	0,0050
Gran. (L) x Razão (L)	0,042	0,243	0,174	0,8777
Gran. (L) x Tempo (L)	-3,005	0,243	-12,318	0,0065
Razão (L) x Tempo (L)	-8,007	0,243	-32,824	0,0009

( $p \leq 0,05$ )

$$Y = 21,147 + 11,916.G + 3,877.G^2 + 2,047.R + 2,899.T^2 - 3,005.G.T - 8,007.R.T \quad (5)$$

Onde:

Y: Atividade de esterificação (U/g);

G: Valor codificado para a granulometria (mesh);

R: Valor codificado para a razão sólido:solvente (p/v);

T: Valor codificado para o tempo (h).

Após a apresentação do modelo matemático, foi construída a superfície de resposta das interações entre as variáveis estudadas no processo de extração da lipase de semente de trigo em função dos resultados de atividade de esterificação (Figura 7).

Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para a atividade de esterificação no processo de extração da lipase de semente de trigo.

<b>Fatores</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	2813,42	6	468,90	6,33
Resíduo	740,72	10	74,07	
Falta de ajuste	739,76	8		
Erro puro	0,95	2		
Total	3554,14	16		

Coefficiente de correlação:  $R=0,88$ ,  $F_{0,95; 6; 10} = 3,21$

Através da Figura 7(a) pode-se observar que, independente da razão sólido:solvente, quanto menor o tamanho da partícula (maiores granulometrias) maior serão os valores de atividade de esterificação. Essa observação já era esperada, pois de acordo com a análise das variáveis significativas, essa interação não mostrou significância.

Já na Figura 7(b) pode-se concluir que em granulometrias maiores (menor tamanho da partícula) e em baixos tempos de extração, os valores de atividade de esterificação são superiores. Também se pode observar que mesmo em baixos tempos, mas em granulometrias menores (partículas maiores), a atividade reduz consideravelmente, demonstrando assim a grande influência e importância deste parâmetro.

Como pode se observar na Figura 7(c), os melhores valores de atividade de esterificação encontram-se onde o tempo de extração foi mais elevado e a razão sólido:solvente foi menor, e também onde o tempo foi mais baixo e a razão sólido:solvente foi mais elevada. Esta resposta possui coerência, pois com uma grande quantidade de solvente, não é necessário tanto tempo para a extração. Já em baixas quantidades de solvente, o tempo requerido de contato com o extrato deve ser maior.

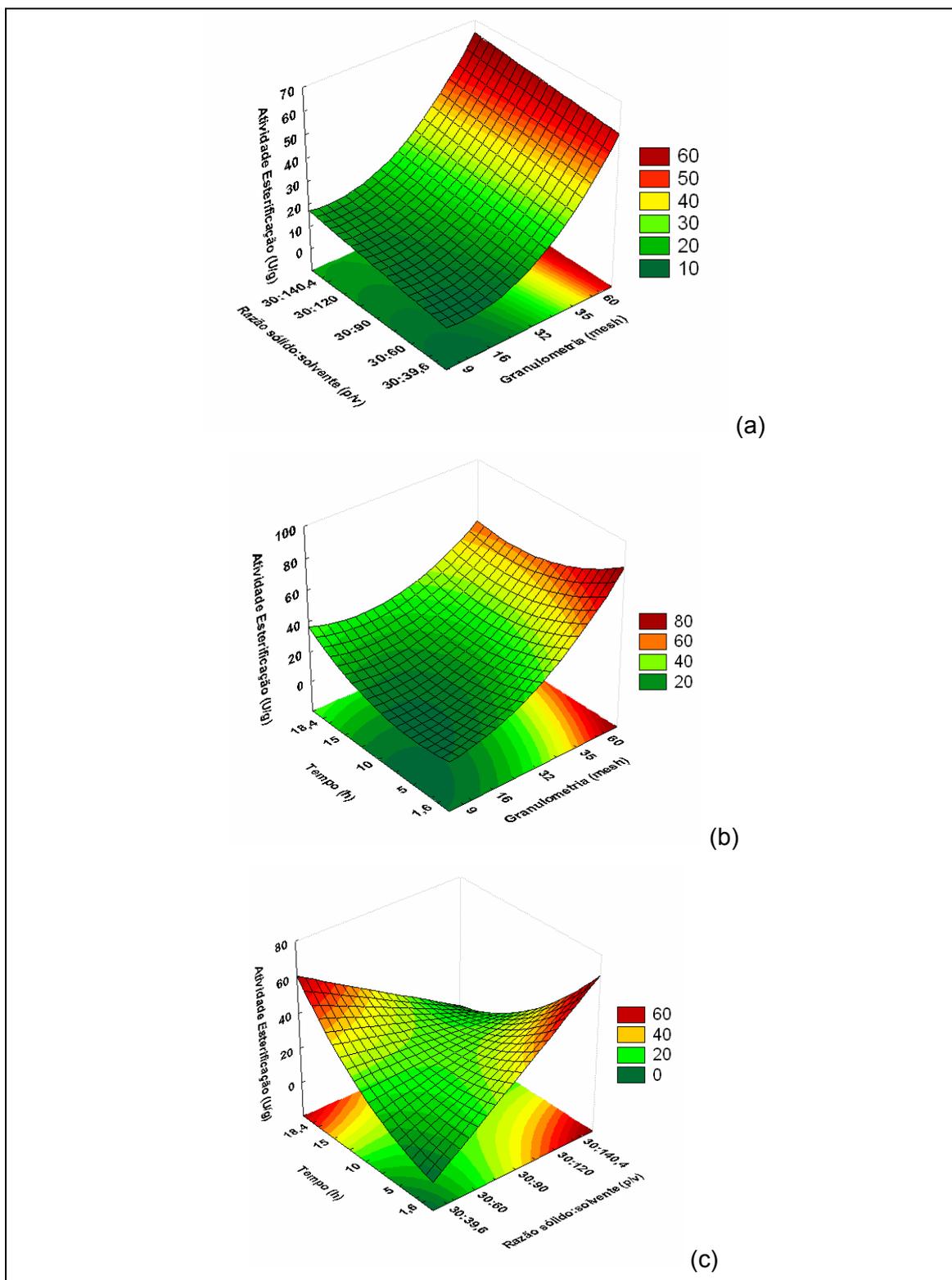


Figura 7: Superfície de resposta do comportamento da atividade de esterificação em função da (a) interação entre a granulometria e a razão sólido:solvente, (b) interação entre a granulometria e o tempo de extração e (c) interação entre a razão sólido:solvente e o tempo de extração, no processo de extração da lipase de semente de trigo.

#### 4.4 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO POR PRECIPITAÇÃO EM SULFATO DE AMÔNIO

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada a fim de obter a lipase da semente de trigo concentrada e conseqüentemente aumentar sua atividade hidrolítica e de esterificação. Como parâmetros para a extração, foram utilizados as melhores condições observadas para cada tipo de medida (hidrólise e esterificação), e posteriormente realizou-se a concentração desse extrato. A saturação escolhida foi de 60% como descrito na literatura (MENONCIN et al., 2008) e foram avaliados diferentes tempos de precipitação. A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos antes e após a precipitação.

Tabela 18: Resultados em termos de atividade de hidrólise e esterificação antes e após a precipitação do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio.

Experimento	Variável	At. de Hidrólise (U/g)		At. de Esterificação (U/g)	
	Tempo (h)	Antes precipitação	Após precipitação	Antes precipitação	Após precipitação
1	5	3,00	5,80	38,80	197,81
2	10	4,80	1,73	33,56	208,20
3	15	3,38	9,58	34,17	94,67
4	24	3,52	14,47	43,67	26,86

Como pode ser observado no exposto acima, a maioria dos valores de atividade aumentaram após a precipitação, exceto no tempo de 10 horas para a atividade de hidrólise e de 24 horas para a atividade de esterificação.

Analisando somente a atividade de hidrólise, o melhor resultado foi obtido no experimento 4, onde a atividade aumentou de 3,52 U/g para 14,47 U/g, correspondendo à um aumento de mais de 4 vezes. Comparando esse resultado com o apresentado por KAPRANCHIKOV et al. (2004), o presente trabalho demonstrou um maior valor de atividade hidrolítica, visto que os autores obtiveram uma atividade de 5 U/g para a precipitação com sulfato de amônio em presença de polietileno glicol (PEG).

Com relação à atividade de esterificação os melhores resultados foram observados nos menores tempos de precipitação, onde o maior valor foi de 208,20 U/g

em um tempo de 10 horas, correspondendo a um aumento de 6,2 vezes em relação à atividade antes da precipitação. Esses resultados são de grande importância, pois não foi encontrado nenhum estudo na literatura correspondente a concentração da lipase de semente de trigo avaliando a medida de atividade de esterificação.

A partir do extrato enzimático concentrado obtido, partiu-se para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e conseqüentemente o cálculo das atividades específicas dos extratos concentrados. Esses resultados estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados em termos de atividade de hidrólise e esterificação (U/g) do extrato concentrado com sulfato de amônio e suas respectivas atividades específicas (U/mg de proteína).

<b>Experimento</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>At. hidrólise (U/g)</b>	<b>At. específica (U/mg prot.)</b>	<b>At. esterificação (U/g)</b>	<b>At. específica (U/mg prot.)</b>
1	5	5,80	0,18	197,81	6,85
2	10	1,73	0,05	208,20	7,79
3	15	9,58	0,35	94,67	3,29
4	24	14,47	0,64	26,86	1,19

Observando os resultados apresentados na Tabela 19, nota-se que para a atividade de hidrólise, a melhor atividade específica foi no experimento correspondente à 24 horas de precipitação com sulfato de amônio (0,64 U/mg de proteína). Novamente comparando esses valores obtidos com a única literatura que também estudou a concentração da lipase de semente de trigo (KAPRANCHIKOV et al., 2004), o presente trabalho apresentou uma relativa superioridade aos 0,014 U/mg de proteína obtido pelos referidos autores.

Para a atividade de esterificação, a maior atividade específica foi no experimento 2 (7,79 U/mg de proteína) seguida do experimento 1 (6,85 U/mg de proteína). Esses valores mostraram-se bastante próximos, confirmando assim que para se obter uma maior atividade no extrato concentrado, deve-se realizar esta etapa nos menores tempos estudados. Cabe ressaltar novamente que estas respostas apresentadas são inovadoras, pioneiras e promissoras para a atividade de

esterificação da lipase de semente de trigo visto que não há nenhum estudo dessa natureza na literatura.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO

Após a determinação das melhores condições para a concentração do extrato enzimático bruto, foi realizado um planejamento experimental para estudar o efeito de diferentes pH e temperaturas na medida de atividade de hidrólise a fim de caracterizar o pH ótimo e a temperatura ótima do extrato concentrado. A Tabela 20 apresenta a matriz do planejamento com suas respectivas respostas na atividade de hidrólise e atividade específica.

Tabela 20: Matriz do planejamento experimental completo  $2^2$  para a avaliação da temperatura e pH ótimos (valores codificados e reais) com as respostas da atividade hidrolítica para a lipase de semente de trigo concentrada.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	At. Hidrólise (U/g)	At. específica (U/mg prot.)
1	-1 (5,5)	-1 (32)	10,00	0,33
2	-1 (5,5)	+1 (42)	9,22	0,30
3	+1 (8,5)	-1 (32)	3,32	0,11
4	+1 (8,5)	+1 (42)	6,11	0,20
5	0 (7,0)	0 (37)	7,46	0,33
6	0 (7,0)	0 (37)	8,01	0,35
7	0 (7,0)	0 (37)	7,31	0,32

Com os resultados da atividade hidrolítica do extrato concentrado, utilizou-se o tratamento estatístico dessas respostas e, à um nível de significância de 95%, as variáveis significativas foram o pH e a interação entre o pH e a temperatura. Como pode ser visto pelo gráfico de Pareto (Figura 8), o pH apresentou um efeito negativo, o que significa que as maiores atividades foram no nível inferior de pH (5,5), o que também é demonstrado nos experimentos 1 e 2 da Tabela 20 onde estão localizadas as maiores atividades hidrolíticas.

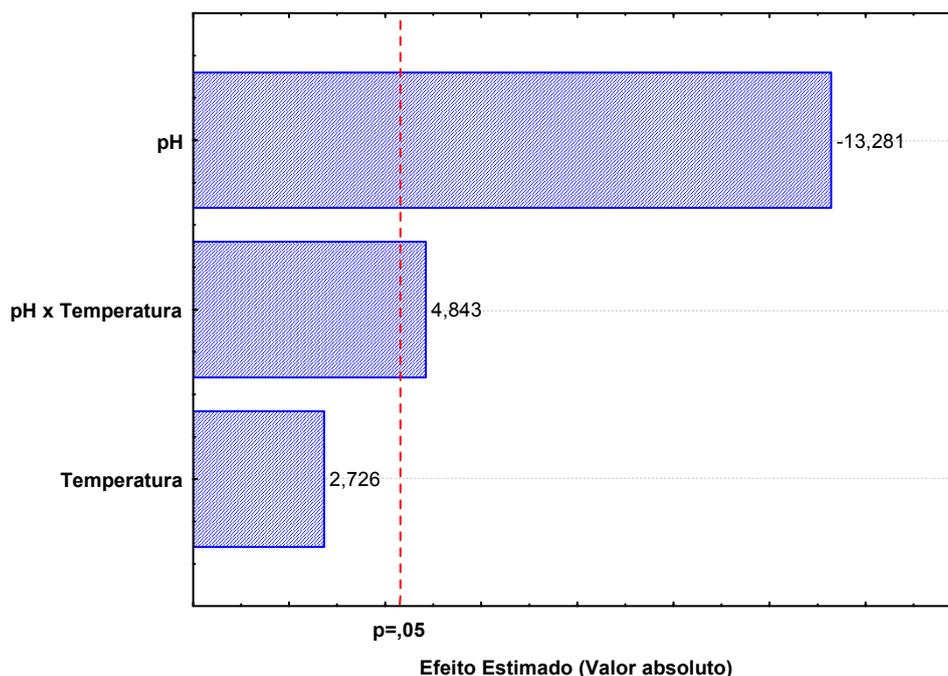


Figura 8: Gráfico de Pareto do planejamento experimental completo  $2^2$  da caracterização parcial do extrato enzimático concentrado em termos de pH e temperatura ótimos.

Com o tratamento estatístico, também se obteve os valores dos coeficientes de regressão a fim de apresentar um modelo matemático para o estudo do pH ótimo e da temperatura ótima do extrato concentrado. Porém primeiramente é necessário validar o modelo através do estudo da análise de variância (ANOVA), a qual está apresentada na Tabela 21. O modelo foi validado à um nível de significância de 95%, visto que o valor de  $F_{calc}$  foi maior que o tabelado e também devido a obtenção de um alto coeficiente de correlação (0,97).

O modelo matemático codificado da atividade de hidrólise para o extrato enzimático concentrado em função do pH ótimo e da temperatura ótima está apresentado na Equação 6.

$$Y = 7,347 - 2,447 \cdot \text{pH} + 0,892 \cdot \text{pH} \cdot \text{Temperatura} \quad (6)$$

Onde:

Y: Atividade hidrolítica (U/g).

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) para a atividade de hidrólise do extrato enzimático concentrado.

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F calculado
Regressão	27,14	2	13,57	33,93
Resíduo	1,59	4	0,39	
Falta de ajuste	1,32	2		
Erro puro	0,27	2		
Total	28,74	6		

Coefficiente de correlação:  $R=0,97$ ,  $F_{0,95; 2; 4} = 6,94$

Após a validação estatística do modelo empírico através da análise de variância, tornou-se possível a construção da superfície de resposta da interação entre o pH e a temperatura, a qual está apresentada na Figura 10. Neste gráfico é possível observar que os melhores valores de atividade de hidrólise para o extrato enzimático concentrado se encontram onde o pH é baixo ( $\pm 5,5$ ) e as temperaturas estão na faixa de 37 a 32°C.

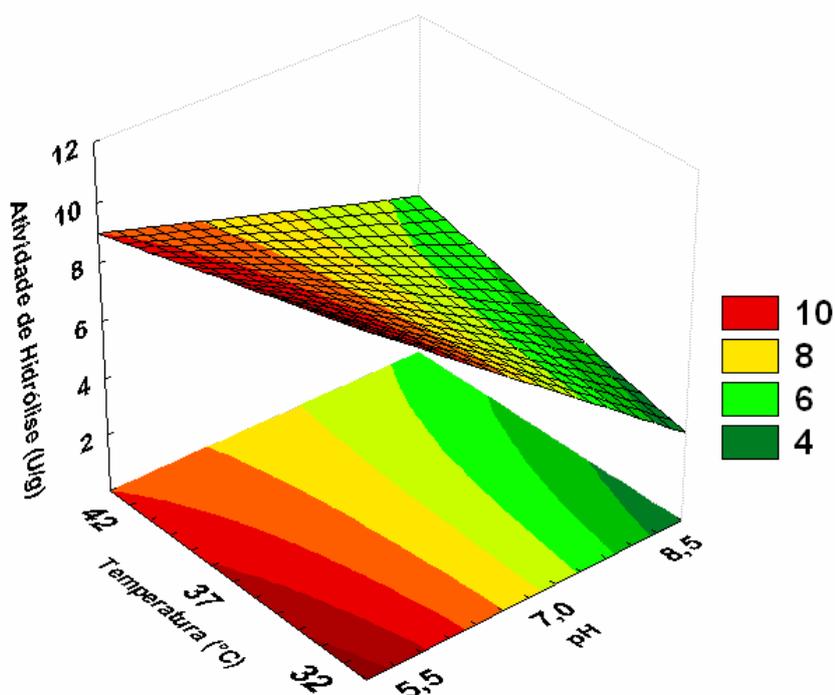


Figura 9: Superfície de resposta da interação entre o pH e a temperatura para a atividade de hidrólise do extrato enzimático concentrado.

O presente trabalho difere dos citados na literatura, os quais relatam temperaturas ótimas na faixa de 45 a 55°C e pH variando de 7,5 a 8,0 para lipases de fontes vegetais (GIORDANI et al., 1991; CARO et al., 2001; SAGIROGLU e ARABACI, 2005). CAVALCANTI et al. (2007) obtiveram melhores atividades de hidrólise para a semente de mamona não germinada em pH ácidos ( $\pm 4,0$ ), e em uma temperatura ótima de 30°C na hidrólise da tributirina. Estes últimos resultados ajudam a consolidar as respostas obtidas neste trabalho, principalmente pelo fato das metodologias de extração serem bastante semelhantes. Outra constatação é que a maioria das lipases, tanto vegetais quanto microbianas apresentam seu ótimo em pH neutros à alcalinos, o que não acontece com a lipase de semente de trigo, tornando esta enzima com potencial uso em processos que requerem condições ácidas onde poucas enzimas são capazes de se manterem ativas.

#### **4.6 ESTABILIDADE DA LIPASE CONCENTRADA A BAIXAS TEMPERATURAS**

A estabilidade do extrato enzimático concentrado à baixas temperaturas foi avaliado submetendo as amostras à temperatura de geladeira e de freezer. Este estudo é bastante importante para analisar a estabilidade e o comportamento da enzima, bem como o percentual de atividade inicial mantida ao longo do armazenamento.

Foram realizadas as medidas de atividade de hidrólise e de esterificação em temperatura de geladeira ou resfriamento (4°C) e em temperatura de freezer ou congelamento (-10°C).

A atividade de hidrólise foi monitorada nos tempos zero, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, sendo que as amostras mantidas em geladeira (4°C) mantiveram atividade hidrolítica somente até 24 horas de estocagem. Já nas amostras levadas à temperatura de congelamento (-10°C), a atividade hidrolítica permaneceu durante as 144 horas de monitoramento.

Já para a esterificação, a atividade foi medida nos tempos zero, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, e as amostras mantiveram atividade até 120 horas de armazenamento tanto em geladeira quanto em freezer.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível concluir que:

- O melhor solvente para extração da lipase de semente de trigo foi a acetona, devido sua rápida evaporação e maior polaridade, concordando com o que foi exposto na literatura;
- O emprego do planejamento de experimentos na otimização da extração e avaliação da atividade de hidrólise e esterificação de lipase de sementes de trigo se mostrou eficiente para o estudo das variáveis granulometria das sementes trituradas, razão sólido:solvente e o tempo de extração;
- Nos testes com gérmen de trigo comercial e trigo germinado não se obteve nenhum resultado significativo em relação à atividade de hidrólise e esterificação;
- A maior atividade hidrolítica obtida para o extrato enzimático bruto foi 5,9 U/g em uma granulometria de 425  $\mu\text{m}$  (mesh 35), 15 horas e razão sólido:solvente 30:60 (p/v), com um coeficiente de correlação de 0,96 ( $p \leq 0,05$ );
- A maior atividade de esterificação obtida foi de 57,88 U/g para o extrato enzimático bruto em uma granulometria igual a da atividade de hidrólise, razão sólido:solvente de 30:120 (p/v) e tempo de extração de 5 horas, com  $R=0,88$ ;
- Utilizando uma condição de saturação de 60%, o melhor tempo de precipitação para a atividade de hidrólise foi de 24 horas, obtendo um valor de 14,47 U/g, a qual foi 4 vezes maior que a encontrada para o extrato bruto;
- Para a atividade de esterificação, nas mesmas condições de saturação citadas acima, o maior valor de atividade foi de 208,20 U/g em um tempo de precipitação de 10 horas, sendo este resultado em torno de 6 vezes maior que a atividade para o extrato bruto;
- Nas melhores condições de concentração do extrato enzimático, os valores de atividade específica para a atividade de hidrólise foi de 0,64 U/mg de proteína e 7,79 U/mg de proteína para a atividade de esterificação.
- A caracterização parcial do extrato enzimático concentrado em termos de atividade hidrolítica foi válida à um nível de significância de 95%, onde o pH

ótimo encontrado foi de 5,5 e a temperatura ótima se encontra na faixa de 32 a 37°C.

- Durante a estocagem em baixas temperaturas, numa temperatura de 4°C (geladeira) a atividade de hidrólise foi mantida durante 24 horas, cessando após esse período. Já a atividade de esterificação manteve-se durante 120 horas de monitoramento;
- Em temperatura de congelamento (-10°C) a atividade hidrolítica perdurou durante as 144 horas de armazenagem, e em um período de 120 horas foi mantida a atividade de esterificação do extrato concentrado.

## **5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A partir dos resultados obtidos neste trabalho sugere-se para trabalhos futuros:

- O estudo do pH e temperatura de estabilidade do extrato concentrado;
- Purificação do extrato enzimático concentrado;
- Utilização da técnica de SDS-PAGE a fim de determinar o peso molecular da lipase estudada, bem como identificar qual a lipase majoritária da semente de trigo;
- Testar a especificidade dessa lipase frente a diferentes ácidos graxos;
- Estudar a possibilidade desta enzima ser utilizada como catalisador na produção do biodiesel através de sua atividade de esterificação;
- Aplicação de técnicas de imobilização da lipase para futura utilização em processos biotecnológicos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R.; GABALLA, A. A.; *Identification and over-expression of a thermostable lipase from Geobacillus thermoleovorans Toshki in Escherichia coli*; Microbiological Research; v.163; p. 13-20; 2008.

ALFENAS, A. C.; *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*; p. 88-91; 1998.

ALONSO, F. O. M.; *Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por Yarrowia lipolytica (IMUFRJ 50682)*; Dissertação de Mestrado; Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; Rio de Janeiro; 2001.

BACHA, A. B.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; MILED, N.; REINBOLT, J.; MEJDOUB, H.; *Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase*; Enzyme and Microbial Technology; v.37; p. 309-317; 2005.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A.; *Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from Candida rugosa produced in solid state fermentation*; Brazilian Archives of Biology and Technology; v.44; p. 213-221; 2000.

BOLLER, T.; *Plant Proteolytic Enzymes*; vol. 1; 1986.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; *Processos Fermentativos e Enzimáticos – Biotecnologia Industrial*; v.3; p. 377-378; 2001.

BRADFORD, M. M.; *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-drye binding*; Analytical Biochemistry; v.72, p. 248-254; 1976.

CAMPBELL, M. K.; *Bioquímica*; 3ª Edição; Porto Alegre: Artmed; 2000.

CARO, Y.; DHUIQUE-MAYER, C.; TURON, F.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J.; *The biocatalytic activity of bromelain in ester synthesis reaction: difference between the intrinsic lipase activity and thermal catalysis*; Biotechnology Letters; v.23; p. 2035-2039; 2001.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M.; *Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados*; Química Nova; v. 26; p. 75-80; 2003.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR., G. L.; FREIRE, D. M. G.; *Economic analysis of lipase production by Penicillium restrictum in solid state and submerged fermentations*; Biochemical Engineering Journal; v.4; p. 239-247; 2000.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; *Modificação de óleos e gorduras por biotransformação*; Química Nova; v.27; p. 146-156; 2004.

CAVALCANTI, E. D. C.; MACIEL, F. M.; VILLENEUVE, P.; LAGO, R. C. A.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G.; *Acetone powder from dormant seeds of Ricinus communis L.*; Applied Biochemistry and Biotechnology; v.136-140; p. 57-65; 2007.

CHEETHAM, P. S. J.; *The applications of enzymes in industry*; Handbook of enzyme biotechnology; p. 419-522; 1995.

CHO, A. R.; YOO, S. K., KIM, E. J.; *Cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of a thermophilic lipase from Bacillus thermoleovorans ID-1*; FEMS Microbiology Letters.; v.186; p. 235-238; 2000.

CHOI, C. Y.; PARK, H. J.; CHOI, W. J.; HUH, E. C.; LEE, E. Y.; *Production of Optically Active Ketoprofen by Direct Enzymatic Esterification*; Journal of Bioscience and Bioengineering; v.87; p. 545-547; 1999.

ENUJIUGHA, 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(3); p. 405-410; 2004.

EWIS, H. E.; ABDELAL, A. T.; LU, C. D.; *Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from Geobacillus stearothermophilus*; Gene; v.31; p. 187-195; 2004.

FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*; vol. 3; 3ª Edição; Editora Springer Berlin; 1997.

FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*; 2000.

FADNAVIS, N. W.; KOTESHWAR, K.; *Remote control of stereoselectivity: lipase catalyzed enantioselective esterification of racemic  $\alpha$ -lipoic acid*; Tetrahedron: Asymmetry; v.8(2); p. 337-339; 1997.

FEIHRMANN, A. C.; *Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados*; Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim; Erechim – RS; 2005.

FOGLIA, T. A.; VILLENEUVE, P.; *Carica papaya Latex-Catalyzed Synthesis of Structured Triacylglycerols*; Journal of the American Oil Chemists Society; v.74(11); p.1447-1450; 1997.

FREIRE, D. M. G., GOMES, M. P., BOM, S. P. E.; *Lipase production by a new promising strain of Penicillium restrictum*; Journal of the Brazilian Society for Microbiology, v. 28; p. 6-12; 1997.

FROST, G. M.; MOSS, D. A.; *Production of enzymes by fermentation*; Biotechnology Enzyme Technology; v. 7; p. 654; 1987.

FURLONG, E. B.; *Bioquímica: um enfoque para alimentos*; v.único; p. 55-57; Edgraf; Rio Grande; 2000.

GANDHI, N. N.; *Applications of Lipase*; Journal of the American Oil Chemists' Society; v.74; p. 621-634; 1997.

GANDHI, N. N.; MUKHERJEE, K. D.; *Synthesis of designer lipids using papaya (Carica papaya) latex lipase*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; v.11(4); p. 271-277; 2001.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. C.; *Lipid shortenings: A review*; International Food Research Journal; v.35; p. 1015; 2002.

GIORDANI, R.; MOULINA, A.; VERGER, R.; *Tributyrolylglycerol hydrolase activity in Carica papaya and other lattices*; Phytochemistry; v.30(4); p. 1069-1072; 1991.

HAN, S. J.; BACK, J. H.; YOON, M. Y.; SHIN, P. K.; CHEONG, C. S.; SUNG, M. H.; HONG, S. P.; CHUNG, I. Y.; HAN, Y. S.; *Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from Acinetobacter species SY-01*; Biochimie; v.85(5); p. 501-510; 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.; *Industrial applications of microbial lipases*; Enzyme and Microbial Technology; v.39; p. 235-251; 2006.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; WEEMAES, C.; *Effects of high pressure on enzymes related to food quality*; Trends in Food Science & Technology; p. 197-203; 1998.

HILLS, M. J.; KIEWITT, I.; MUKHERJEE, K. D.; *Lipase from Brassica Napus L. Discriminates Against cis-4 and cis-6 Unsaturated Fatty Acids and Secondary and Tertiary Alcohols*; Biochimica et Biophysica Acta; v.1042(2); p. 237-240; 1990.

HUANG, S. H.; TSAI, S. W.; *Kinetic resolution of (R,S)-ethyl 2-hydroxyl-4-phenylbutyrate via lipase-catalyzed hydrolysis and transesterification in isooctane*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; v.28; p. 65-69; 2004.

JAEGER, K-E; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T.; *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*; Annual Review Microbiology; v.53: p. 315-351; 1999.

JAEGER, K-E; EGGERT, T.; *Lipases for biotechnology*; Current Opinion in Biotechnology; v.13(4); p. 390-397; 2002.

JAEGER, K-E; REETZ, M. T.; *Microbial lipases from versatile tools for biotechnology*; Trends in biotechnology; v.16; p. 396-403; 1998.

JAEGER, K-E; REETZ, M. T.; *Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry*; Current Opinion in Chemical Biology; v.4; p. 68-73; 2000.

KANWAR, L.; KUMAR, B.; GOSWAMI, P.; *Production of a Pseudomonas in n-alkane substrate and its isolation using and improved ammonium sulfate precipitation technique*; Bioresource Technology; v. 84; p. 207-211; 2002.

KAPRANCHIKOV, V. S.; ZHEREBTSOV, N. A.; POPOVA, T. N.; *Purification and characterization of lipase from (Triticum aestivum L.) germ*; Applied Biochemistry and Microbiology; v.40; p. 84-88; 2004.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T.; *Biotransformation with lipases*; A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology; v.8A, p. 38; 1998.

KOBLITZ, M. G. B.; *Purificação de lipase de Rhizopus sp e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis*; Tese de Doutorado; UNICAMP; São Paulo; 2003.

KONTKANEN, H.; TENKANEN, M.; FAGERSTRÖM, R.; REINIKAINEN, T.; *Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations*; Journal of Biotechnology; v.108; p. 51-59; 2004.

LEAL, M. C. M. R.; *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*; Tese de Mestrado; COPPE/UFRJ; Rio de Janeiro – RJ; 2000.

LEE, D. W.; KOH, Y. S.; KIM, K. J.; Kim, B. C.; CHOI, H. J.; KIM, D. S.; SUHARTONO, M. T.; PYUNA, Y. R.; *Isolation and characterization of a thermophilic lipase from Bacillus thermoleovorans ID-1.*; FEMS Microbiology Letters; v.179; p. 393-400; 1999.

LIAQUAT, M.; OWUSU APENTEN, R. K.; *Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media*; Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology; v.65(2); p. 295-299; 2000.

LIN, Y. H.; YU, C.; HUANG, A. H. C.; *Substrate Specificities of Lipases from Corn and Other Seeds*; Archives Biochemistry Biophysics; v.244; p. 346-356; 1986.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C.; *Present and future applications of lipase*; Biotechnology and Genetic Reviews; v.3; p. 193-217; 1985.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HIL, C. G.; AMUNDSON, C. H.; *Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review*; Journal of the American Oil Chemists' Society; v. 67; p. 890-910; 1990.

MALDONADO, R. R.; *Produção, Purificação e Caracterização da lipase de Geotrichum candidum obtida a partir de meios industriais*; Dissertação de Mestrado; UNICAMP; São Paulo; 2006.

MARIA, P. D.; MARTINEZ-ALZAMORA, F.; MORENO, S. P.; VALERO, F.; RUA, M. L.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R.; *Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other*

*hydrolases in crude preparations*; Enzyme and Microbial Technology; v.31; p. 283-288; 2002.

MARTINS, T. S.; *Produção e purificação de lipases de Yarrowia lipolytica (IMUFRJ 50682)*; Dissertação de mestrado; Universidade Federal de Rio de Janeiro – UFRJ; Rio de Janeiro – RJ; 2001.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. de; LUCCIO, M. Di; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; *Study of the extraction, concentration and partial characterization of lipases obtained from Penicillium verrucosum using solid state fermentation of soybean bran*; Food and Bioprocess Technology; DOI 10.1007/s11947-008-0104-8; 2008.

MUKHERJEE, K. D.; *Plant lipases and their application in lipid biotransformations*; Progress in Lipid Research; v.33; p. 165-174; 1994.

MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I.; *Specificity of Carica papaya latex as biocatalyst in the esterification of fatty acids with 1-butanol*; Journal of Agricultural and Food Chemistry; v.44, p. 1948-1952; 1996.

NCUBE, I.; GITLESEN, T.; ADLERCREUTZ, P.; READ, J. S.; MATTIASSON, B.; *Fatty acid selectivity of a lipase purified from Vernonia galamensis seed*; Biochimica et Biophysica Acta; v.1257; p. 149-156; 1995.

NEGISHI, S.; SHIRASAWA, S.; ARAI, Y.; SUZUKI, J.; MUKATAKA, S.; *Activation of powdered lipase by cluster water and the use of lipase powders for commercial esterification of food oils*; Enzyme and Microbial Technology; v.32; p. 66-70; 2003.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, V.; FREIRE, D. M. G.; *Influence of compressed fluids treatment on the activity of Yarrowia lipolytica lipase*; Journal of Molecular Catalysis Enzymatic; v.39; p. 117-123; 2006.

OSÓRIO, E. A.; *A cultura do trigo*; Editora Globo; São Paulo; 1992.

PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X.; *Integration of Reaction and Separation with Lipases: An Overview*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; v.3; p. 99-109; 1997.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T.; *The realm of microbial lipases in biotechnology*; Applied Biochemistry and Biotechnology; v.29; p.119-131; 1999.

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

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B.; *Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por uma nova linhagem de Rhizopus sp.*; Ciência e Tecnologia de Alimentos; v.23; p. 135-140; 2003.

PIAZZA, G. J.; BILYK, A.; BROWER, D. P.; HAAS, M. J.; *The Positional and Fatty Acid Selectivity of Oat Seed Lipase in Aqueous Emulsions*; Journal of the American Oil Chemists' Society; v.69; p. 978-981; 1992.

PINHEIRO, T. L.; *Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando Penicillium verrucosum como microrganismo*; Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim; Erechim – RS; 2006.

PRABHU, A. V.; TAMBE, S. P.; GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; *Rice bran lipase : Extraction, activity and stability*; Biotechnology Progress; v.15; p.1083-1089; 1999.

PRAZERES, D. M. F.; GARCIA, F. A. P.; CABRAL, J. M. S.; *Ultrafiltration membrane reactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media*; Biotechnology and Bioengineering; v.41; p. 761-770; 1993.

SAGIROGLU, A.; ARABACI, N.; *Sunflower Seed lipase: extraction, purification and characterization*; Preparative Biochemistry and Biotechnology; v.35; p. 37-51; 2005.

SCHMID, R. D.; VERGER, R.; *Lipases: interfacial enzymes with attractive applications*; Angewandte Chemie International Edition; v.37; p. 1608-1633; 1998.

SCRIBAN, E.; *Biotecnologia*; p. 498; Editora Manole Ltda; São Paulo; 1985.

SHARMA, R.; SONI, S.; VOHRA, R.; GUPTA, L.; GUPTA, J.; *Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic Bacillus sp. RSJ-1*; Process Biochemistry; v.37; p. 1075-1084; 2002.

SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, G. C.; *Purification and partial characterization of a lipase from Antrodia cinnamonea*; Process Biochemistry; v.41; p. 734-738; 2006.

SINCHAIKUL, S.; SOOKKHEO, B.; PHUTRAKUL, S.; PAN, F.-M.; CHEN, S. T.; *Optimization of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1: over-expression, purification and characterization*; Protein Expression Purification; v.22; p. 388-398; 2001.

SINGER, T. P.; HOFSTEE, B. H. J.; *Studies on wheat germ lipase*; I. Methods of estimation, purification and general properties of the enzyme; Archives Biochemistry Biophysics; v.18; p. 229-244; 1948.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; *Improvement in lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil*; Enzyme and Microbial Technology; v.33; p. 97-103; 2003.

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.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; *Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions*; Enzyme and Microbial Technology; v.23; p. 438-450 ; 1998.

ZYABLOVA, T.V.; *Development and Scientific Basis of Economic Storage of Wheat Germ*; *Cand. Sc. (Techn.) Dissertation*; Voronezh: Voronezhskaya gos. tekhnologich; 2000.