



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL –
UFERSA/UFRN**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS PROVENIENTES DE
ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO**

CAMILA MÍRYAN DE OLIVEIRA FERREIRA

MOSSORÓ / RN – BRASIL
Agosto / 2015

CAMILA MÍRYAN DE OLIVEIRA FERREIRA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS
PROVENIENTES DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Matias

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Agosto – 2015

Catálogo de Publicação na Fonte
Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA – BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO
TEIXEIRA – CAMPUS MOSSORÓ

Ferreira, Camila Miryan de Oliveira.

Isolamento e seleção de bactérias lipolíticas provenientes de água residual de abatedouro / Camila Miryan de Oliveira Ferreira. - Mossoró, 2015.

63f: il.

1. Biotecnologia enzimática. 2. Lipase. 3. Bactéria - abatedouro. I.
Título

RN/UFERSA/BOT/927

CDD 660.634 F383I

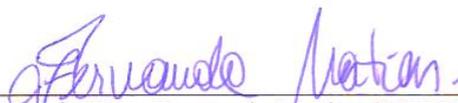
CAMILA MÍRYAN DE OLIVEIRA FERREIRA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS
PROVENIENTES DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO**

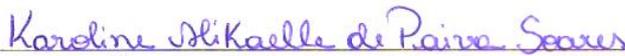
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM 26 / 08 / 2015

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Fernanda Matias (UFERSA)
Co-Orientador



Profa. Dra. Karoline Mikaelle de Paiva Soares (UFERSA)
Primeiro Membro (Primeiro Tutor)



Profa. Dra. Lidianne Leal Rocha (UFERSA)
Segundo Membro (Segundo Tutor)

Dedico este trabalho aos
meus pais, Genilson e
Lenilda.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais
evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

A Deus, que além do dom da vida, nunca me desampara nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Genilson e Lenilda, e à minha irmã, Ana Carolina, por todo suporte, incentivo, carinho e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro, pela oportunidade e todo apoio ao longo desses dois anos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Fernanda Matias, que me acompanhou durante esta jornada, obrigada pela oportunidade de fazer parte do seu time, por todos os ensinamentos, puxões de orelha, paciência e dedicação.

À minha banca, Profa. Dra. Lidianne Leal Rocha e Profa. Dra. Karoline Mikaelle de Paiva Soares, por terem aceitado o convite, e por toda ajuda e contribuição neste trabalho.

Ao meu grande amigo e colega de mestrado, Carlos, que sempre me ajudou quando precisei, e que dividiu comigo as angústias e dificuldades ao longo desses anos.

Ao meu amigo e namorado, Raclenir, que sempre me incentiva a crescer e conquistar novos caminhos, e que me proporcionou muitos bons momentos, obrigada por todo apoio e suporte ao longo deste ano.

A todos os meus colegas do LABIN, pela ajuda nos trabalhos de bancada, pela amizade, e por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e agradável.

A todos do LABMOR, em especial a Alexandre, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Taffarel Melo Torres e ao colega Rodrigo, por gentilmente cederem o termociclador sempre que precisei.

A todos do LEMIC pela ajuda e suporte, sempre que precisei, para a realização das minhas atividades de bancada.

Ao Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró S/A – AFIM, pelas amostras cedidas e por me receberem tão bem em seu estabelecimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Animal, em especial a Prof. Dr. Liz Carolina da Silva Lagos Cortês Assis, pela oportunidade de fazer parte desta pós-graduação, e por toda ajuda e suporte.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 Modelo estrutural das α/β hidrolases. Folhas- β (1-8) estão representadas como setas azuis; α -hélices (A-F) como bastões vermelhos. Os círculos vermelhos indicam a posição relativa dos aminoácidos da tríade catalítica.... 20
- Figura 2 Principais depositantes em tecnologias envolvendo lipases bacterianas..... 34
- Figura 3 Evolução no depósito de patentes com lipases bacteriana nos últimos anos..... 34

CAPÍTULO II

- Figura 1 Teste enzimático com corante Rodamina B, para a identificação de linhagens produtoras de lipase. (A) ABAD01 (B) ABAD05 (C) ABAD07 (D) ABAD09 (E) ABAD12 (F) ABAD17 (G) ABAD20 (H) ABAD21 (I) ABAD23..... 53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Lipases comerciais e suas aplicações.....	33
----------	---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Meio de Cultura Mínimo.....	50
Tabela 2	Solução de Micronutrientes.....	50
Tabela 3	Meio Basal de Sais Minerais.....	51
Tabela 4	Solução de Sais Traços.....	51
Tabela 5	Diversidade morfológica das linhagens promissoras isoladas de amostras de água residual de abatedouro.....	54

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO

Ferreira, Camila Míryan de Oliveira. Isolamento e Seleção de Bactérias Lipolíticas Provenientes de Amostras de Água Residual De Abatedouro. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO: O crescente interesse na produção de lipases está especialmente relacionado ao grande potencial biotecnológico que estas enzimas apresentam. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de longas cadeias de triglicérides transformando-os em glicérides e ácidos graxos. As lipases microbianas têm recebido grande atenção, constituindo um dos mais importantes grupos de enzimas para a aplicação biotecnológica nos mais variados setores industriais. Diante do potencial promissor destas enzimas e sabendo-se que micro-organismos fazem uso de óleos e gorduras como fonte de carbono para a produção de lipase, este trabalho teve como objetivo o isolamento de bactérias produtoras de lipase, a partir de amostras de águas residuais de abatedouro, por meio de enriquecimento e crescimento em meio de cultura. Foram recuperadas 68 linhagens morfológicamente distintas ao longo do experimento. Posteriormente, as linhagens produtoras de lipase foram selecionadas por meio do teste enzimático com corante fluorescente de Rodamina B, a qual resulta na produção de um complexo fluorescente pela produção de lipases nas placas. Os resultados mostraram nove linhagens promissoras no teste enzimático: ABAD01, ABAD05, ABAD07, ABAD09, ABAD12, ABAD17, ABAD20, ABAD21 e ABAD23. Os resultados obtidos refletem a importância em se estudar o potencial biotecnológico da microbiota associada aos ambientes com alto teor lipídico para a prospecção de linhagens produtoras de lipases, e suas futuras aplicações industriais e na produção animal.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima, Lipase, Bactéria, Abatedouro.

ISOLATION AND SELECTION OF LIPOLYTIC BACTERIA FROM WASTEWATER SLAUGHTERHOUSE

Ferreira, Camila Míryan de Oliveira. Isolamento de Bactérias Lipolíticas Provenientes de Amostras de Água Residual De Abatedouro. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

ABSTRACT: The growing interest in the production of lipases relates especially to the great biotechnological potential that these enzymes have. Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis of long chain triglyceride transforming them into glycerides and fatty acids. Microbial lipases have been addressed in constituting one of the most important groups of enzymes for biotechnological applications in several industrial sectors. Because of the promising potential of these enzymes and knowing that microorganisms use oils and fats as a carbon source for the production of lipases, this study aimed the isolation of lipase-producing bacteria from wastewater samples slaughterhouse through enrichment and growth in culture medium. A total of 68 morphologically distinct strains were recovered throughout the experiment. Subsequently, the lipase producing strains were selected by enzyme assay with the fluorescent dye Rhodamine B, which results in a fluorescent complex by the production of lipases in the plates. The results showed nine promising strains in the enzymatic test: ABAD01, ABAD05, ABAD07, ABAD09, ABAD12, ABAD17, ABAD20, ABAD21 and ABAD23. Likewise, reflecting the importance of studying the biotechnological potential of the microbial community associated to environments with high lipid content for the study of strains that produce lipases, with applications in the industry and in animal production.

KEYWORDS: Enzyme, Lipase, Bacteria, Slaughterhouse.

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
2. CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO: LIPASES BACTERIANAS	17
2.1. LIPASES: ASPECTOS GERAIS	17
2.1.1. pH e Temperatura	18
2.1.2. Estabilidade em solventes orgânicos.....	18
2.1.3. Detergentes e tensoativos	19
2.1.4. Efeito de íons metálicos	19
2.1.5. Inibidores da lipase.....	19
2.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	19
2.3. CLASSIFICAÇÃO	21
2.4. FONTES DE LIPASE	22
2.5. PRODUÇÃO DE LIPASE.....	23
2.5.1. Detecção.....	23
2.5.2. Fermentação.....	24
2.5.3. Purificação.....	24
2.5.5. Cultura de células imobilizadas e nanolipases.....	26
2.5.6. Lipases por bactérias geneticamente modificadas.....	27
2.6. APLICAÇÕES DAS LIPASES	28
2.6.1. Lipases no processamento de óleos e gorduras.....	28
2.6.2. Lipases na indústria de alimentos	28
2.6.3. Lipases em Detergentes.....	29
2.6.4. Lipases na Indústria de papel.....	29
2.6.5. Lipases como biosensores.....	29
2.6.6. Lipases em cosméticos e perfumaria.....	30
2.6.7. Lipases em aplicações médicas	30
2.6.8. Lipases na indústria de biodiesel.....	30
2.6.9. Lipase em abatedouros e frigoríficos.....	31
2.7. PERFIL ECONÔMICO	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
4. CAPÍTULO II – ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO	45
INTRODUÇÃO	48

MATERIAL E MÉTODO	49
RESULTADO E DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	60

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica consiste na produção e utilização de enzimas de origem microbiana. Embora alguns biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, micro-organismos, em particular, são requisitados como fontes produtoras de enzimas (BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

Os micro-organismos são encontrados em diferentes tipos de habitats, adaptados a diferentes condições climáticas, de temperatura e salinidade, que influenciam em sua atividade e distribuição geográfica. Além disso, tornam-se mais atrativos para uso em processos industriais devido a sua diversidade metabólica, maior facilidade de obtenção desse material (micro-organismos), e às suas propriedades cinéticas de produção de diferentes enzimas, fazendo com que esses organismos fossem mais explorados como fonte enzimática nas últimas décadas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; STEELE; STOWERS, 1991).

O custo de produção das enzimas microbianas de uma maneira geral é bem menor do que os utilizados para produzir enzimas vegetais e animais. Devido a independência de injunções sazonais e geográficas, o tempo de produção é muito mais curto para sua obtenção, permitindo assim a utilização de diversos substratos mais baratos e conseqüentemente de um maior rendimento da produção através da otimização das condições utilizadas nos diversos processos fermentativos (SAID; PIETRO, 2002; HAKI; RAKSHIT, 2003).

As enzimas são substâncias orgânicas, conhecidas como biocatalisadores para múltiplas reações químicas, que aumentam a velocidade das reações e são muito eficientes do ponto de vista energético, pois operam a temperaturas e pressões moderadas, além de atuarem também em uma faixa relativamente ampla de valores de pH. Devido a essas características, as enzimas são exploradas comercialmente nas indústrias de detergentes, alimentos, farmacêuticas, diagnósticos, química fina, entre outras (NELSON; COX, 2006; DETTMER, 2012).

Além da extraordinária especificidade e poder catalítico, essas biomoléculas possuem diversos aspectos positivos que as distinguem dos catalisadores químicos: alta velocidade de reação, podendo atingir velocidade de 10^6 a 10^{12} vezes maiores; as reações catalisadas enzimaticamente apresentam condições mais brandas de temperatura, pressão e pH (geralmente catálises químicas requerem condições extremas); maior especificidade de reação; e capacidade de regulação em resposta às concentrações de outras substâncias que não os seus substratos, como controle alostérico, modificação covalente de enzimas e variação nas quantidades de enzimas sintetizadas (VOET; VOET; PRATT, 2000).

As enzimas podem ser classificadas em seis classes, de acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB - *International Union of Biochemistry*), com base nas reações catalisadas: oxidorreduções, transferases, liases, isomerases, ligases e hidrolases. Nesta última, encontram-se as enzimas que catalisam as reações de hidrólises, são elas: as esterases, proteases e lipases.

As lipases atuam sobre as ligações éster (E.C.3.1.1) e catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001). Em adição, também catalisam reações de esterificação, isto é, síntese reversa a partir de longas cadeias de ácidos graxos e glicerol. Outra reação catalisada por lipase é a interesterificação, reação onde um ácido graxo, um álcool ou um éster reagem com o triacilglicerídeos produzindo diferentes triacilglicerídeos. Dependendo do substrato da reação, esta também pode ser chamada de alcoólise, acidólise ou transesterificação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008; SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001).

Lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases microbianas são as mais estudadas e utilizadas industrialmente por serem mais estáveis, produzidas com menor custo e alta velocidade de síntese (FARIA, 2010). Atualmente, sabe-se que diversas espécies bacterianas são produtoras de lipases, sendo as mais importantes do ponto de vista industrial, aquelas pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, sobressaindo-se esta última (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; RATHI et al., 2002; VARGAS et al., 2004; WATANABE et al., 1977).

Existem diversos métodos, quantitativos e qualitativos, para avaliação da produção de enzimas com atividades lipolíticas. Dentre os mais conhecidos, inclui-se a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrão (tributirina, trioleína, etc), Tween 80 e corantes, como a Rodamina B, que possibilita a visualização da reação de hidrólise pela produção de um complexo fluorescente (DAMASO et al., 2008; KOUKER; JAEGER, 1987).

Os benefícios econômicos e estratégicos que os micro-organismos, potencialmente exploráveis, têm dado para o desenvolvimento de biotecnologias abrangem diversas aplicações como: produção de compostos químicos (etanol, ácido acético, biogás, plásticos biodegradáveis, bioconversões na indústria de alimentos e farmacêutica), produtos para agricultura (bioinseticidas, inoculantes agrícolas), enzimas para diversos setores industriais, com destaque para a indústria de detergentes e alimentícia (lipases, proteases, amilases) e compostos de interesse médico e veterinário (antibióticos, antitumorais, hipocolesterolêmicos,

imunossupressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários) (BARNUM, 1998; CANHOS; MANFIO, 2002).

Micro-organismos que sobrevivem em ambientes com alto teor de matéria orgânica, produzem enzimas capazes de metabolizar estes compostos, e usá-lo como fonte de carbono para o seu metabolismo. Com isso, bactérias isoladas das amostras de água contaminada com matéria orgânica (rica em lipídios) possuem a capacidade de produzir compostos lipolíticos, pois sua sobrevivência depende da sua capacidade de metabolizar estes compostos para realizar suas reações vitais. Levando em consideração esta afirmação, estes ambientes revelam-se como interessantes fontes para a prospecção de micro-organismos produtores de lipase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNUM, S. **Biotechnology: an introduction**. Wadsworth Publishing Company: Beolmont, 1998. 225p.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p.506

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Diretrizes e Estratégicas do Fundo Setorial de Biotecnologia**. Comitê Gestor do Fundo Setorial de Biotecnologia, Centro de Referência em Informação Ambiental. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2002.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S.C.; FREIRE. D. M. G; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.676-68, 2008.

DETTMER, A. **Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro**. 2012. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado). Porto Alegre, 2012.

FARIA, L. A. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lípase extracelular de Colletotrichum gloesporioides produzida por fermentação em substrato líquido**. 2010. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially importante thermostable enzymes: a review, **Biosource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

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

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger** - Princípios de Bioquímica. 4ª ed, São Paulo: Savier, 2006. p.1202.

RATHI, P.; GOSWAMI, V.K.; SAHAL, V.; GUPTA, R.; Statistical médium ptimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. **Journal of Applied Microbiology**. v.93. p. 930-936. 2002

SAID, S; PIETRO, R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos Editora, 2002. p.121.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662. 2001.

STEELE, D.B.; STOWERS M. D. Techniques for selection of industrially important microorganisms, **Annual Reviews Microbiology**, v. 45, p.89-106. 1991.

VARGAS, V.A.; DELGADO, O.D.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lipase producing micro-organisms from a Kenyan alkaline soda lake. **Biotechnology Letters**. v.26. p. 1565-1568. 2004.

VOET, D.; VOET, J.G; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre, ARTEMED, 2000. p.931.

WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing micro-organisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. **Agricultural and. Biological Chemistry**. v.41. p.1353-1358. 1977.

2. CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO: LIPASES BACTERIANAS

2.1. LIPASES: ASPECTOS GERAIS

As lipases (*triacilglicerol acilhidrolase*, E.C 3.1-1.3) são enzimas que pertencem à classe das hidrolases (E.C.3.1) e que atuam sobre as ligações éster (E.C.3.1.1). Essas enzimas catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol de cadeia longa liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis (THAKUR, 2012).

Além de promover a hidrólise dos triacilgliceróis, as lipases catalisam reações de esterificação, isto é, síntese reversa a partir de longas cadeias de ácidos graxos e glicerol. Outra reação catalisada por lipase é a interesterificação, que refere-se a troca de radicais acilo entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou entre dois ésteres (transesterificação) (LOPES, et al 2011).

Todas estas reações citadas ocorrem em ambientes com baixo teor de água ou preferencialmente na presença de solventes orgânicos, e servem para alterar as propriedades físicas do óleo ou gordura, e produzir novos ésteres (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (PANDEY et al., 1999).

O desempenho catalítico das lipases para realizar as suas reações é possível graças a algumas propriedades como biodegradabilidade, elevada especificidade e alta eficiência, que faz com que o uso das lipases como biocatalisadores industriais aumente a cada ano. As características mais desejadas de uma lipase são a sua capacidade de utilizar todos os mono, di e trigliceróis, bem como os ácidos graxos livres em transesterificação; a baixa inibição do produto; atividade e rendimento elevados em meios não aquosos; baixo tempo de reação; resistência a temperatura, pH e álcool; e reutilização da enzima imobilizada (VERMA; KANWAR, 2008)

Os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Outras razões para o potencial biotecnológico de lipases microbianas são a sua estabilidade em solventes orgânicos e exibição de forma ativa sem o auxílio de cofatores. O fato da enzima não ser tóxica ao meio ambiente leva à sua grande contribuição para a indústria de alimentos (JAEGER; REETZ, 1998; KUMAR; SHARMA; KANWAR, 2012).

2.1.1. pH e Temperatura

As lipases bacterianas têm um pH ótimo neutro ou alcalino, com algumas exceções, como a lipase obtida a partir de *Pseudomona fluorescens* SIK W1 que apresenta um pH ácido ótimo de 4,8. No entanto, existem ainda lipases, como a do *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B. atrophaeus* SB-2 e *B. licheniformis* SB-3 que são ativos sobre uma ampla gama de pH 3-12 (BRADDOO; SAXENA; GUPTA, 1999; LITHAUER; GINSTER; SKEIN, 2002). Lipases bacterianas têm, geralmente, temperatura ótima no intervalo de 30-60 °C (LITHAUER; GINSTER; SKEIN, 2002). Porém, estabilidade térmica da enzima a partir de *Bacillus sp.* foi reforçada com a adição de estabilizadores, tais como etileno-glicol, sorbitol, glicerol, com retenção da atividade enzimática por até 150 minutos de incubação a 70 °C (NAWANI; KAUR, 2000).

A estabilidade térmica é uma característica vantajosa para aplicação das lipases no ramo industrial, tendo em vista que a maioria dos processos fazem uso de temperaturas extremas. Lipases oriundas de bactérias termofílicas apresentam essa estabilidade, tornando-se atrativas nos processos industriais (JAEGER; REETZ, 1998). Destacam-se também as lipases com atividades em baixas temperaturas, provenientes de micro-organismos psicrófilos, pois esta propriedade é de grande importância na síntese de intermediários orgânicos quirais termossensíveis (JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008).

2.1.2. Estabilidade em solventes orgânicos

Os solventes orgânicos são mais vantajosos do que os seus homólogos inorgânicos ou a água, quando utilizados em sistemas de reação envolvendo biocatalisadores. Eles ajudam a aumentar a solubilidade dos substratos, auxiliam na recuperação dos produtos e no deslocamento do equilíbrio na direção direta em reações sintéticas (ZHANG et al, 2009). As lipases tolerantes a solventes orgânicos são tidas como catalisadores eficazes na síntese de reações de transesterificação, de biopolímeros e produção de biodiesel (DIZGE et al, 2009). A estabilidade e a atividade de lipase são geralmente testadas na presença de solventes orgânicos como isopropanol, metanol, etanol, acetona, glicerol, n-hexano, n-heptano, n-octano, n-decano, benzeno, tolueno, xileno, estireno, benzeno, etilbenzeno, ciclo-hexano, dimetilsulfóxido, tetra-hidrofurano, clorofórmio e ácido acético (CADIRCI; YASA, 2009; ZHANG et al, 2009). A partir da literatura disponível, pode-se inferir quais lipases são geralmente estáveis em solventes orgânicos, pois lipases de diferentes fontes apresentam diferentes graus de tolerância para vários solventes orgânicos, e sua exploração comercial assim exige uma análise aprofundada de tolerância contra estes solventes.

2.1.3. Detergentes e tensoativos

Os agentes tensoativos aumentam a interface lipídio-água, aumentando assim a taxa lipolítica. No entanto, essa regra não se aplica a todos os casos. Além disso, o efeito de agentes tensoativos é dependente da concentração. Por exemplo, a altas concentrações de Tween-80 (1%), inibiram a produção de lipases por *B. pumilus*, enquanto sua concentração a 0,5% provocou a máxima produção de lipase (ZHANG et al, 2009). O SDS exibiu efeito inibidor na lipase, enquanto o Triton X-100 e o Tween aumentou a velocidade da reação (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 2003; LIANGHUA; LIMING, 2005). O efeito contrário foi observado por Dutta e Ray (2009), SDS exibiu efeito estimulante, enquanto Triton e Tween inibiu a atividade da lipase.

2.1.4. Efeito de íons metálicos

Íons de metal além de conferir termoestabilidade às lipases, podem estimular ou inibir a produção da enzima microbiana (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2008). Cátions de metal, particularmente de Ca^{2+} , desempenham papéis importantes na estrutura e função de enzimas, e algumas das lipases são estritamente dependentes de cálcio. Este efeito pode ser atribuído a alterações estruturais impostas pela ligação de Ca^{2+} para a enzima (EL KHATTABI et al, 2003). Íons de Ca^{2+} ativam a enzima, enquanto Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} inibe fortemente a sua atividade (KUMAR; KANWAR, 2011).

2.1.5 Inibidores da lipase

A atividade da lipase é inibida drasticamente por Co^{++} , Ni^{++} , Hg^{++} , e Sn^{++} ; e é ligeiramente inibido por Zn^{++} , Mg^{++} , EDTA, SDS (SAXENA et al, 1999). Esses inibidores têm sido utilizados no estudo das propriedades estruturais e mecânicas das lipases. Além disso, a procura de inibidores de lipase é também de interesse farmacológico. Compostos que não atuam diretamente no sítio ativo mas inibem a atividade da lipase, alterando a sua conformação ou propriedades interfaciais são definidos como inibidores não-específicos. Tensoativos, sais biliares e proteínas pertencem a este grupo de inibidores. No entanto, os agentes tensoativos e os sais biliares ativam a enzima, em alguns casos (VERMA, 2012).

2.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

Desde 1990, com a resolução das primeiras estruturas tridimensionais (lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana) através da técnica de cristalografia de

Raios-X, o entendimento sobre os mecanismos de atuação das lipases começou a ser desvendado. Daí por diante, mais de onze estruturas de lipases já foram determinadas, em sua maioria, de origem microbiana.

As lipases têm sido relatadas como proteínas monoméricas com peso molecular entre ~19kDa (lipase de *Bacillus subtilis*) e ~97 kDa (*Aeromonas sobria*), embora já tenha sido relatada uma lipase de alto peso molecular produzida por *Candida deformans*, com 207 kDa (CYGLER; SCHRAG, 1997).

A estrutura tridimensional de todas as lipases já descritas é do tipo α/β -hidrolases (Figura 1). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por folhas β paralelas rodeadas por porções em α -hélice (DE PASCALE et al, 2008). Embora as lipases se diferenciem amplamente no número de aminoácidos da sequência primária, todas elas apresentam uma tríade catalítica composta por resíduos de Ser (serina), His (histidina) e Asp (aspartame). Este sítio ativo é recoberto, na maioria das lipases, por um domínio hidrofóbico (*lid*). Na presença de uma concentração mínima de substrato, o *lid* se desloca, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta (na maioria das lipases) expondo-se ao solvente, tornando o sítio ativo disponível para a ligação com substrato (ANGKAWIDJAJA; KANAYA, 2006).

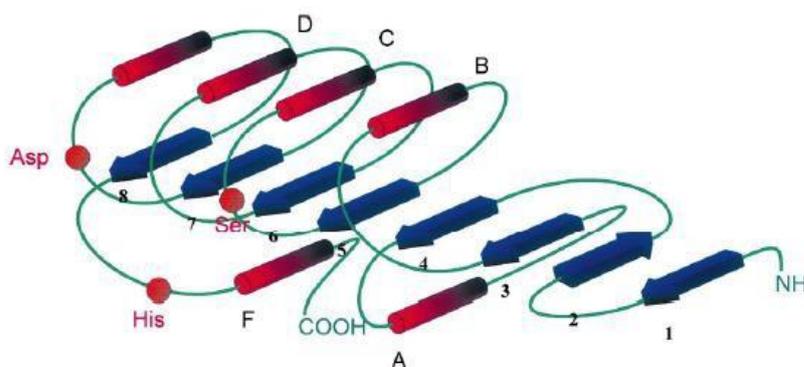


Figura 1 – Modelo estrutural das α/β hidrolases. Folhas- β (1-8) estão representadas como setas azuis; α -hélices (A-F) como bastões vermelhos. Os círculos vermelhos indicam a posição relativa dos aminoácidos da tríade catalítica.

Fonte: Bornscheuer, 2002

Estruturas tridimensionais de algumas lipases foram determinadas e encontram-se depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information-www.ncbi.nlm.nih.gov/) e em outros bancos de dados como o LED (*The Lipase Engineering Database*) (<http://www.led.uni-stuttgart.de/>).

2.3. CLASSIFICAÇÃO

As enzimas lipolíticas bacterianas foram classificadas em 8 famílias e a maior família delas foi dividida em seis subfamílias por Arpigny e Jaeger (1999). Esta classificação baseou-se nas sequências conservadas de DNA (motivos) e nas propriedades biológicas das enzimas.

Família I: encontram-se as lipases verdadeiras, que compreende em sua maioria as lipases de *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Staphylococcus*. Estas lipases possuem um pentapeptídeo catalítico convencional Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly.

Família II: abrange as lipases que não exibem o pentapeptídeo convencional, mas sim uma sequência de Gly-Asp-Ser-Leu no sítio ativo. Também estão inclusas nessa família as esterases de *Streptomyces*, *Aeromonas* e *Salmonella*.

Família III: estas lipases apresentam uma dobra canônica de α/β -hidrolases e contém uma tríade catalítica típica. Também mostram aproximadamente 20% de similaridade com a sequência de aminoácidos do fator ativador de plaquetas em humanos (PAF-AH). Compreende as lipases extracelulares de *Streptomyces* sp.

Família IV: lipases que apresentam semelhança com as lipases hormônio sensível (HSL) de mamíferos.

Família V: compreende as lipases de bactérias mesófilas, como *P. oleovorans* e *Haemophilus influenza*, bem como as lipases de micro-organismos adaptadas ao frio (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) e ao calor (*Sulfolobus acidocaldarius*).

Família VI: nesta família encontram-se as menores esterases, com uma massa molecular na faixa de 23-26 kDa. A forma ativa da enzima é um dímero, e esta hidrolisa substratos pequenos com uma especificidade ampla, e não exhibe nenhuma atividade para os triglicéridos de cadeia longa

Família VII: são as lipases e as esterases grandes (~55 kDa), e sua sequência de aminoácidos é homóloga à da acetil colina esterases de eucarióticas.

Família VIII: este grupo é formado por três enzimas com cerca de 380 resíduos de comprimento. Estas lipases são semelhantes aos β -lactamases.

As sequências de outras enzimas que não foram agrupadas em nenhuma das oito superfamílias descritos por Arpigny e Jaeger (1999) foram arbitrariamente classificadas como nova família 9 e 10.

2.4. FONTES DE LIPASE

Tradicionalmente, as lipases eram obtidas do pâncreas de animais. A descoberta foi feita por Claude Bernard, em 1856 e anos mais tarde, aumentou o interesse pelas lipases microbianas devido às dificuldades de acesso ao material de origem animal (HASAN; SHAN; HAMEED, 2006). As lipases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos. Lipases microbianas ganharam atenção especial na indústria devido à sua estabilidade, seletividade, e ampla especificidade de substrato (THAKUR, 2012).

Lipases microbianas comerciais são produzidas a partir de bactérias, fungos e actinomicetos (BABU; RAO, 2007). As fontes microbianas são mais atrativas para a produção enzimática devido à facilidade com que podem ser cultivadas em massa e geneticamente manipuladas (HASAN; SHAN; HAMEED, 2006). Ainda segundo os mesmos autores, os fungos se apresentam como melhores produtores de lipases, no entanto, as linhagens bacterianas são constantemente avaliadas e os meios de produção de lipases melhorados. Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura.

Desde os primeiros estudos com lipases bacterianas em estirpes de *Serratia marescens* e *Pseudomonas aeruginosa* em 1901 (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), novas espécies de bactérias produtoras de lipases tem sido estudada.

Diversas espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* sp., tem sido relatadas na literatura como produtoras de lipases: *Pseudomonas aeruginosa* (MADAN; MISHRA, 2010); *P. fluorescens* (YANG; ZHANG; YAN, 2009), *Bacillus pumilus* (SANGEETHA; GEETHA; ARULPANDI, 2010a), *B. thermocatenuatus* (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 2003), *B. subtilis* (AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010), *B. licheniformis* (SANGEETHA; GEETHA; ARULPANDI, 2010b), *B. coagulans* (MNISI; LOUW; THERON, 2005), *B. cereus* (DUTTA; RAY, 2009) e *B. halodurans* (RAMCHURAN et al., 2006).

Outros gêneros como *Acinetobacter* (LI; CHENG; CHEN; 2004), *Staphylococcus* (TALON; MONTEL; BERDAGUE, 1996), *Streptococcus* (TRIPATHI et al., 2004), *Burkholderia* (WANG; YU; XU, 2009), *S. marescens* (LONG et al., 2007), *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* e *Chromobacterium* (RIAZ et al., 2010) também foram relatados.

As lipases bacterianas podem ser intracelulares, extracelulares ou ligadas a membrana. As estirpes de *Bacillus clausii* que produzem apenas lipase intracelular podem crescer apenas em glicerol e lipídeos simples, mas não sobre os triglicerídeos de cadeia longa (LEE; PARK, 2008). Ertugrul, Donmez e Takac (2007) observaram a produção de lipase tanto intracelular e

extracelular em *Bacillus* sp. Foi relatado a produção de lipase extracelular como consequência da secreção de lipase intracelular acumulada por chaperonas ligadas à membrana (BOEKEMA et al. 2007).

2.5. PRODUÇÃO DE LIPASE

2.5.1. Detecção

A análise quantitativa é importante para comparar as atividades lipolíticas de vários isolados. Não existe um método universal de ensaio de lipase. A escolha de um determinado método dependerá das necessidades específicas do usuário. Para o ensaio de qualquer enzima, a sensibilidade, a disponibilidade de substratos, e a facilidade do processo têm de ser consideradas (HENDRICKSON, 1994).

A atividade de lipase tem sido determinada através da quantificação dos ácidos graxos liberados durante a hidrólise mediada pela enzima. Estes produtos podem ser determinados por métodos físico-químicos avaliando-se o desaparecimento do substrato ou a formação dos produtos da reação. Dentre os métodos que avaliam o desaparecimento do substrato podem ser citados a nefelometria e turbidimetria, tensiometria interfacial, microscopia de força atômica e espectroscopia de infravermelho. Os principais métodos que avaliam o aparecimento dos produtos da reação de hidrólise compreendem ensaios indiretos da liberação de prótons (indicadores coloridos e titulometria), análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos derivados do glicerol (ensaio colorimétricos, fluorimétricos, cromatográficos, enzimáticos, microscopia eletrônica por detecção in situ) e análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos sintéticos (ensaio radioativos, colorimétricos, fluorimétricos) e métodos imunológicos, entre outros (BEISSON et al., 2000; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009).

Dentre estes vários métodos que podem ser usados para seleção de micro-organismos produtores de lipases extracelulares, é comumente encontrado nos trabalhos a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrão (tributirina, trioleína, etc), Tween 80 e corantes que possibilitam a visualização da reação de hidrólise (DAMASO et al., 2008). Alguns autores citam o uso do corante fluorescente de Rodamina B, a qual resulta na produção de um complexo fluorescente pela produção de lipases nas placas, facilitando a visualização das colônias produtoras de enzima (KOUKER; JAEGER, 1987; KIM et al., 2001).

2.5.2. Fermentação

As lipases bacterianas podem ser produzidas tanto por fermentação em estado sólido como por fermentação submersa (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2008; ALKAN et al, 2007). As lipases, assim como outras enzimas de interesse industrial, têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa, que faz uso de um meio de cultura líquido (MARTINS, 2001). Entretanto, a fermentação em estado sólido, que utiliza extratos sólidos com baixas porcentagens de água em sua composição, pode ser uma alternativa muito interessante quando se utiliza como meio de fermentação um rejeito de baixo custo (GUTARRA; CASTILHO; FREIRE, 2005; ALONSO, 2001).

A produção de lipase atinge seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento (ZAREVUCKA, et al, 2005). A atividade lipolítica diminui rapidamente após alcançar o nível máximo, pois ocorre a proteólise catalisada por proteases produzidas durante a fase de crescimento celular (DALMAU et.al., 2000).

2.5.3. Purificação

O processo *downstream* (etapas após a fermentação) é fundamental para qualquer processo de fermentação e envolve etapas de isolamento e purificação para se obter um produto puro e homogêneo (NANDINI; RASTOGI, 2009). Devido às lipases comerciais serem geralmente extracelulares, os processos de purificação, apesar de extensos, são mais simplificados quando comparados a enzimas cuja produção é intracelular. O sobrenadante isento de células, que é considerado como a fonte bruta de enzima é submetido a passos de purificação preliminar, como ultrafiltração (QUYEN; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 2003), secagem por pulverização a partir de leite em pó ou goma arábica (FICKERS et al., 2006), sulfato de amônio fracionamento (KIM et al., 2001) e/ou precipitação utilizando solventes orgânicos gelados como o etanol, éter e acetona (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2008). Esta purificação inicial é seguida pela purificação utilizando uma combinação de técnicas cromatográficas. Um único passo de purificação cromatográfica geralmente não será suficiente para obter uma enzima de elevada pureza (SAXENA et al., 2003).

No caso de enzimas intracelulares, diferentes métodos podem ser empregados para a sua extração, os quais dependem da força física da parede celular dos micro-organismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse. Métodos mecânicos, físicos, químicos, enzimáticos e a combinação destes podem ser aplicados (PADIT; HARRISON; FARKADE, 2005).

2.5.4. Fatores que afetam a produção de lipase

O processo de obtenção das lipases envolve numerosas variáveis que vão desde a composição do meio (incluindo tipo e concentração de fontes de carbono e de nitrogênio) até as condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (KUMAR et al., 2005; JAEGER; EGGERT, 2002).

Sua produção, assim como qualquer processo de fermentação, requer fontes de carbono e de nitrogênio. A maioria dos estudos de produção de lipase não fazem uso de açúcares simples, em vez disso, utilizam substratos lipídicos como única fonte de carbonos (ZHANG et al., 2009).

A produção de lipase é geralmente estimulada pela presença de uma fonte de carbono (indutor) presente no meio de cultivo, e a quantidade de lipase produzida é escassa (LEE et al, 2001). Assim, óleos vegetais (KUMAR et al, 2005), Tween 20/80 (LI; CHENG; CHEN, 2004), hexadecano (BOEKEMA et al, 2007) e os triglicerídeos sintéticos como tributirina e tripalmitina (RAHMAN; SALLEH; BASRI, 2006) são utilizados como indutores na produção de lipase. Altas concentrações de ácidos graxos livres ou óleo vegetal reprimem a síntese de lipase (LI; CHENG; CHEN, 2004).

Outro componente que também apresenta efeitos na produção de lipases são as fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas. A peptona, uma fonte orgânica, tem sido relatada por aumentar a produção de lipase. Outras fontes orgânicas podem citadas: água de maceração de milho, farinha de soja, aminoácidos, triptona, extrato de levedura e ureia. As fontes inorgânicas utilizadas são os sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos podem ser utilizados. Ao contrário das fontes de carbono, fontes de nitrogênio não têm sido relatados como inibidores na produção de lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Os elementos traços são geralmente componentes estruturais das enzimas. Íons como Mg, Fe, Ca, Cu, Co, Na, K, Mn e Zn parecem influenciar positivamente a produção de lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Lin, Wang e Sung (2006) reportaram que a adição de Ca, Mg, Fe, Na e K aumentaram a produção de lipase, enquanto Cu, Zn e Li apresentaram efeito inibitório na produção da enzima.

A presença de surfactante é um importante pré-requisito para a produção máxima de lipase. A atividade catalítica das lipases é regulada pela ativação interfacial, uma propriedade observada quando o substrato lipídico começa a formar uma emulsão que apresenta, assim, uma interface para a enzima agir. A adição de um agente tensoativo diminui a tensão superficial entre a fase orgânica e aquosa na mistura de reação, e aumenta a taxa de emulsificação (WU;

TSAI, 2004). Os agentes tensoativos geralmente utilizados são de Tween, Triton-X 100 (POGAKU et al, 2010).

Outro fator importante na produção de lipases é o pH do meio de crescimento. Pois ele tanto pode induzir mudanças morfológicas no organismo quanto pode favorecer a secreção enzimática (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Cada micro-organismo apresenta um valor de pH ótimo para o crescimento, que muitas vezes não é o mesmo para produção de lipases. É possível que ocorram variações nos valores de pH durante o cultivo, os quais podem ser influenciados tanto pelo micro-organismo e pela composição do meio, quanto pelos demais parâmetros da fermentação (PINHEIRO, 2006).

Os micro-organismos também têm sua faixa de temperatura de crescimento e produção de lipase ideal, portanto para se obter boas condições para o crescimento e produção de enzimas, torna-se indispensável o controle da temperatura ideal, haja visto que em um processo fermentativo, o calor é produzido tanto pelo metabolismo microbiano quanto pela agitação do sistema (ALONSO, 2001).

Os processos fermentativos, em sua maioria, são aeróbicos e desta forma o fornecimento de oxigênio se torna indispensável. A demanda de oxigênio em uma fermentação seja ela a nível industrial ou laboratorial, é normalmente suprida pela agitação e aeração do meio fermentativo. A produtividade de muitas fermentações para produção de lipases ou outros metabólitos pode ser influenciada pela disponibilidade do oxigênio, portanto, qualquer fator que possa interferir nesta disponibilidade do oxigênio para as células microbianas deve ser considerado (ALONSO, 2001).

2.5.5. Cultura de células imobilizadas e nanolipases

O custo de produção de processos envolvendo enzimas como catalisadores também envolve a produção do próprio catalisador, por isso a sua reutilização se torna necessária para se obter um processo mais econômico.

Sabendo que as enzimas livres são instáveis e vulneráveis à degradação durante o processo, e ainda apresentam uma baixa estabilidade e atividade em meios orgânicos (LEE et al, 2010), a técnica de imobilização de enzimas vem sendo utilizada para melhorar a estabilidade enzimática nas condições de reação, além disso, ela aumenta a atividade da enzima, tornando viável a sua utilização repetida, permitindo assim a utilização da enzima para diversas aplicações, o que irá reduzir os custos de produção (GUNCHEVA et al, 2009; LIU et al, 2009). A imobilização além de proporcionar um melhor ambiente para a ação da enzima, oferece uma melhor recuperação do produto (LEE et al, 2009).

Os métodos utilizados para a imobilização de enzimas baseiam-se nas ligações químicas e físicas entre a enzima e o suporte. Entre eles estão adsorção física (interações hidrofóbicas e de Van der Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada (CARDOSO; MORAIS; CASS, 2009; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO, SOLDI, 2004).

As lipases podem ser imobilizadas em diferentes tipos de suportes, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (MINOVSKA; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 2005). Os materiais mesoporosos (que possuem áreas de até $1400\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, com poros na faixa de 15 a 120 Å), atendem aos critérios para uma imobilização satisfatória em um suporte insolúvel em água, tais como: elevada área superficial, resistência mecânica, estabilidade química, tolerância térmica, e não-toxicidade (HARTMANN, 2005; JALADI et al, 2009). Ramani, Chockalingam e Sekaran (2010) relataram o uso de carvão ativado mesoporoso derivado da casca de arroz como suporte para a imobilização de lipase. Lipases imobilizadas em materiais de sílica mesoporosa mostrou-se mais eficiente e estável do que o uso da enzima livre (KATO; SEELAN, 2010).

Outra tecnologia de imobilização é o uso de nanopartículas magnéticas. O tamanho nano das partículas do suporte proporcionam uma elevada área de superfície e, assim, de carga máxima da enzima, baixa difusão da enzima para o suporte e a enzima imobilizada pode ser controlada e reciclada através da aplicação de campo magnético (HU et al, 2009)

2.5.6. Lipases por bactérias geneticamente modificadas

A tecnologia do DNA recombinante permite conhecer o sítio de ligação e o sítio catalítico das lipases, a superexpressão de lipases em hospedeiros apropriados para atender às demandas comerciais, além de ajudar na projeção de enzimas (SANGEETA; ARULPANDI; GEETHA, 2011).

A clonagem e o sequenciamento de genes de lipase é uma área de estudo que vem atraindo a atenção de pesquisadores em todo o mundo. Muitas lipases bacterianas têm sido clonadas, sequenciadas e expressas em hospedeiros homólogos ou heterólogos. O hospedeiro de expressão mais utilizado é a *Escherichia coli* (AN et al, 2003; LONG et al, 2007), porém outros hospedeiros eficientes também são utilizados, como a *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* (RAMCHURAN et al, 2006; MORMENEO et al, 2008.).

As lipases recombinantes se tornam atrativas devido a produção de lipases puras em larga escala, que podem ser manipuladas de acordo com a necessidade de cada processo, tendo em vista que as lipases obtidas a partir do sobrenadante de culturas apresentam efeitos

secundários indesejados, a não reprodutibilidade destes resultados, e um processo de purificação ocioso (SANGEETA; ARULPANDI; GEETHA, 2011).

2.6. APLICAÇÕES DAS LIPASES

As lipases são biocatalisadores valiosos com diversas aplicações. Embora partilhem apenas 5% do mercado de enzimas industriais, as lipases ganharam bastante atenção como enzimas biotecnologicamente valiosas. Eles desempenham um papel vital em indústrias de alimentos, detergentes e produtos farmacêuticos (SANGEETHA; ARULPANDI; GEETHA, 2011).

2.6.1. Lipases no processamento de óleos e gorduras

Modificação de óleos e gorduras é uma das áreas da indústria de processamento de alimentos que exigem novas tecnologias econômicas e que não afetem o meio ambiente (GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003). Gorduras e óleos são componentes importantes de alimentos. As lipases permitem modificar as propriedades dos lipídios, alterando a localização das cadeias de ácido graxo no glicerídeo. Desta forma, um lipídio relativamente barato e menos desejável pode ser modificado para um valor mais elevado de gordura. A remoção de fosfolípidos de óleos vegetais (de-gomagem) utilizando fosfolipases microbianas altamente seletivas também é um processo desenvolvido (GHOSH et al, 1996).

Através da mistura de óleos e gorduras e de posterior interesterificação, é possível obter compostos denominados de lipídios estruturados. Estes compostos formados pelo rearranjo de triacilgliceróis de cadeias médias e longas apresentam características físicas, químicas e nutricionais diferentes dos lipídios que lhes deram origem (D'AGOSTINI, 2001)

2.6.2. Lipases na indústria de alimentos

Na indústria alimentícia, as lipases aparecem bastante atuante. Ésteres de sabor são compostos de baixo peso molecular sintetizados pela esterificação de ácido graxos, de preferência por lipases microbianas, são utilizados como coadjuvantes alimentares, adicionando sabor e fragrância aos materiais (SAXENA et al, 1999). Óleo de semente de chá que sofreu interesterificação foi identificado como um melhor substituto para a manteiga utilizado na produção de chocolates escuros, servindo como uma fonte alternativa mais rentável do que o cacau (ZARRINGHALAMI et al., 2010).

Na indústria de queijos as lipases são empregadas na alteração e intensificação do sabor e em processos de aceleração da maturação. Também na indústria de laticínios, as lipases são utilizadas para a obtenção de margarinas de baixo teor calórico, entre outras (ALONSO, 2001).

2.6.3. Lipases em Detergentes

As lipases são atrativas na indústria de formulação de detergentes, e seu desenvolvimento teve início após a introdução bem sucedida de proteases em pó e detergentes líquidos. São considerados bons aditivos de detergentes quando seguem os seguintes critérios: baixa especificidade ao substrato, estabilidade em pH alcalino, a solubilidade em água, a tolerância para proteases e surfactantes (TREVISAN, 2004).

A demanda da China por detergente tem crescido na última década e tanto a produção como a demanda continuarão a crescer nos próximos cinco anos (VERMA, 2012). A última tendência na indústria de detergentes é no sentido de se utilizar temperaturas de lavagem mais baixas, que não só economizam energia, mas também ajudam a manter a textura e qualidade dos tecidos (WEERASOORIYA; KUMARASINGHE, 2012). Indústrias de detergentes são os principais consumidores de enzimas, tanto em termos de volume e valor (VERMA, 2012).

2.6.4. Lipases na Indústria de papel

É de crescente importância a aplicação de lipases na indústria de papel para a remoção dos componentes hidrofóbicos (triacilglicerídeos e ceras) da madeira, causadores de alguns problemas durante a fabricação do papel (JAEGER; REETZ, 1998).

2.6.5. Lipases como biosensores

A necessidade de métodos mais versáteis para a mensuração e monitoramento dos níveis séricos de lipídios tem estimulado a produção de uma grande variedade de novos métodos analíticos (SIQUEIRA, 2009). Biosensores representam uma ferramenta promissora para suplementar às técnicas existentes para determinação de triglicerídeos devido as suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para monitoramento (ROSATTO et al., 2001; RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; MARQUES; YAMANAKA, 2008). O conceito básico consiste em utilizar uma lipase para gerar glicerol a partir do triglicerídeo e quantificar o glicerol libertado.

2.6.6. Lipases em cosméticos e perfumaria

A indústria de cosméticos e perfumaria também tem desenvolvido processos que empregam lipases, estas são utilizadas na produção de emulsificantes, aromas, surfactantes e emolientes que fazem parte da composição de cremes (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Ésteres de ácidos alifáticos e aromáticos, álcoois, incluindo álcoois de terpeno, aldeídos, fenóis estão presentes em materiais aromáticos utilizados nos perfumes e em outros produtos de cuidados pessoais (FRANSSEN; ALESSANDRINI; TERRANEO, 2005).

2.6.7. Lipases em aplicações médicas

Lipases isoladas da traça da cera (*Galleria mellonella*) apresentaram uma ação bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) H37Rv. (ANNENKOV et al, 2004). A lipase de *Cândida rugosa* tem sido utilizada para sintetizar Iovastatin, um fármaco que reduz o nível de colesterol no soro (MATSUMAE; FURUI; SHIBATANI, 1993). Miyazaki e Fujikawa (2009) patentearam métodos para tratamento de pele, doenças no couro cabeludo e perda de cabelo com composições que contêm uma protease, lipase e um sal metálico. Sani (2006) propôs que as lipases bacterianas podem substituir as lipases pancreáticas utilizados para tratar a fibrose cística e pancreatite.

2.6.8. Lipases na indústria de biodiesel

O emprego de matérias primas agropecuária como fontes de biocombustíveis, vêm crescendo e se destacando na área biotecnológica, social e econômica. Os óleos vegetais podem ser modificados através da reação de transesterificação visando melhorar características como viscosidade, densidade específica, entre outras para serem utilizadas como forma alternativa de combustível, o biodiesel (AL-ZUHAIR, 2005; JAEGER; EGGERT, 2002; PINTO et al., 2005).

O biodiesel é biodegradável, renovável, não-inflamável e não tóxico. A sua obtenção ocorre através da reação de transesterificação, onde um óleo reage com um álcool, na presença de um catalisador, como um álcalis, um ácido ou uma enzima (lipase). A vantagem de se utilizar processo enzimático é devido ao bom rendimento obtido, maior seletividade, inexistência de rejeito aquoso alcalino e menor produção de outros contaminantes (CANAKCI, 2007; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; EGGERT, 2002). Utilizando o biodiesel diminui-se a produção de óxidos de enxofre, liberado pelos veículos automotivos que fazem uso do óleo diesel como combustível (AL-ZUHAIR, 2005).

2.6.9. Lipase em abatedouros e frigoríficos

O processo de abate e industrialização de animais, como bovinos, suínos e frangos, gera subprodutos que, se mal destinados ou processados, se constituem em potenciais poluentes ambientais. Nestes setores o alto consumo de água acarreta grandes volumes de efluentes - 80 a 95% da água consumida é descarregada como efluente líquido (UNEP; DEPA; COWI, 2000). Estes efluentes são ricos especialmente em proteínas e lipídeos (AMANTE et al., 1999), os quais são os principais responsáveis pelas alterações dos parâmetros de controle ambiental como pH, sólidos totais, demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (PEREIRA, 2004).

Neste contexto, o uso de lipases como processo alternativo, possibilita a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). Esse tratamento apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não geração de subprodutos tóxicos; condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (MASSE; KENNEDY; CHOU, 2001).

2.7. PERFIL ECONÔMICO

A demanda mundial de utilização de enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90% do seu comércio efetuado por países da Europa, Estados Unidos e Japão. Existe uma expectativa de crescimento desse mercado e se esperam para os próximos anos gastos superiores a 2,7 bilhões de dólares, com previsões futuras de aumento em torno de 4% (LI et al., 2012; ADRIO; DEMAIN, 2014).

O mercado mundial de enzimas industriais foi relativamente imune à recente turbulência na economia global e cresceu moderadamente na última década. A demanda por enzimas industriais em economias amadurecidas, como os EUA, Europa Ocidental, Japão e Canadá foi relativamente estável durante os últimos tempos, enquanto as economias em desenvolvimento das regiões do Oriente Médio Ásia-Pacífico, Europa Oriental, juntamente com a África, emergiu como os mercados que mais crescem para enzimas industriais, incluindo as lipases

(<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>).

Lipases comerciais têm sido desenvolvidas por diversas empresas biotecnológicas e modificações são realizadas utilizando diferentes técnicas, de modo que elas podem ser utilizadas como potenciais biocatalisadores com propriedades melhoradas em aplicações específicas. Em 1994, a Lipolase[®] era a primeira lipase recombinante obtida a partir de *Thermomyces lanuginosus* (ex *Humicola lanuginosa*) e expressa em *Aspergillus oryzae*, que foi produzida comercialmente por Nova Nordisk (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007). Outros tipos de lipases selvagens e lipases recombinantes foram subsequentemente produzidas por várias empresas (algumas destas lipases são representados na Tabela 1).

De acordo com a Organização Mundial da Propriedade Intelectual, aproximadamente 75% das inovações tecnológicas estão protegidas por patentes. A cada ano este número tem aumentado, cerca de 850.000 documentos de patentes são depositados em bancos de patentes por ano.

Baseado na pesquisa de patentes no banco de dados do WIPO (*World Intellectual Property Organization*), os principais países produtores e depositantes de patentes envolvendo lipase bacteriana, nos mais variados setores, são, Japão, países da Europa, Canadá e Estados Unidos, com destaque para este último. Algumas empresas se destacam no uso lipases em suas tecnologias, como é o caso da multinacional estadunidense Procter & Gamble (Figura 1). Na figura 2 pode-se observar a evolução por tempo do número de patentes com tecnologias envolvendo o uso de lipases.

Tabela 1 – Lipases comerciais e suas aplicações.

Fonte	Nome comercial	Fornecedor	Aplicações
<i>Pseudomonas menodocina</i>	Lumafast	Genecor International	Detergentes
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Lipomax	Genecor Internacional	Detergentes
<i>Pseudomona glumae</i>	n.i	Unilever	Detergentes
<i>Bacillus pumilus</i>	n.i	Solvay	Detergentes
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Chirazyme L-1	Altus Biologics	Síntese orgânica
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S	Amano	Síntese orgânica
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase AH	Amano	Síntese orgânica
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase SL	Amano	Síntese quirál
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase AK	Amano	Síntese orgânica
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase 56P	Biocatalysts	Biotransformação
<i>Burkholderia cepacia</i>	Lipase PS Amano IM	Amano	Transesterificação
<i>Alcaligenes sp.</i>	Lipase PL	Meito Sangyo	Modificação de óleos e gorduras; adjuvantes em alimentos
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase CV	Genzyme	Diagnóstico/ analítica
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase 50P	Biocatalysts	Biotransformação
<i>Achromobacter sp</i>	Lipase AL, ALC/ALG	Meito Sankyo	n.i.

Fonte: Salihu et al 2012 com modificações.

n.i.: não informado

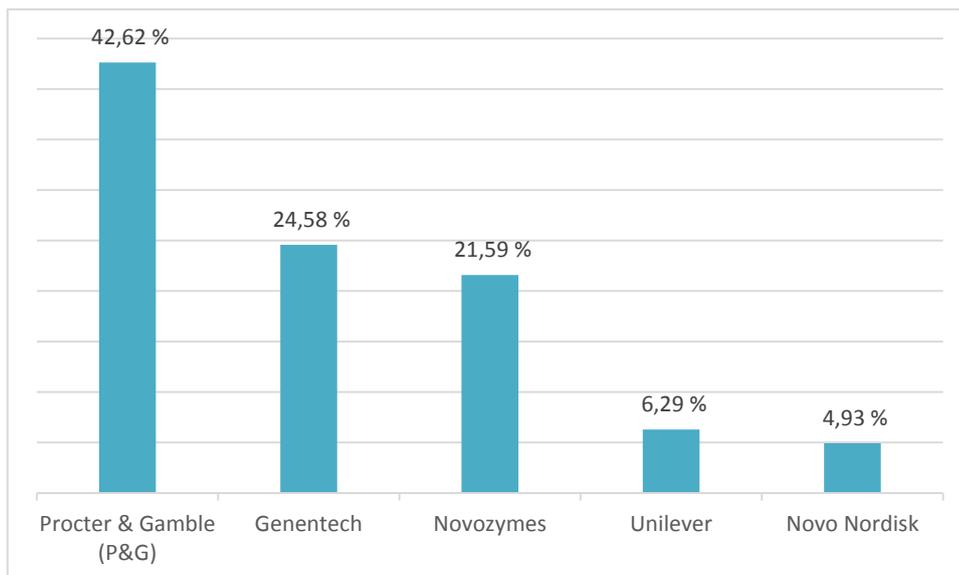


Figura 2 – Principais depositantes em tecnologias envolvendo lipases bacterianas.
Fonte: WIPO

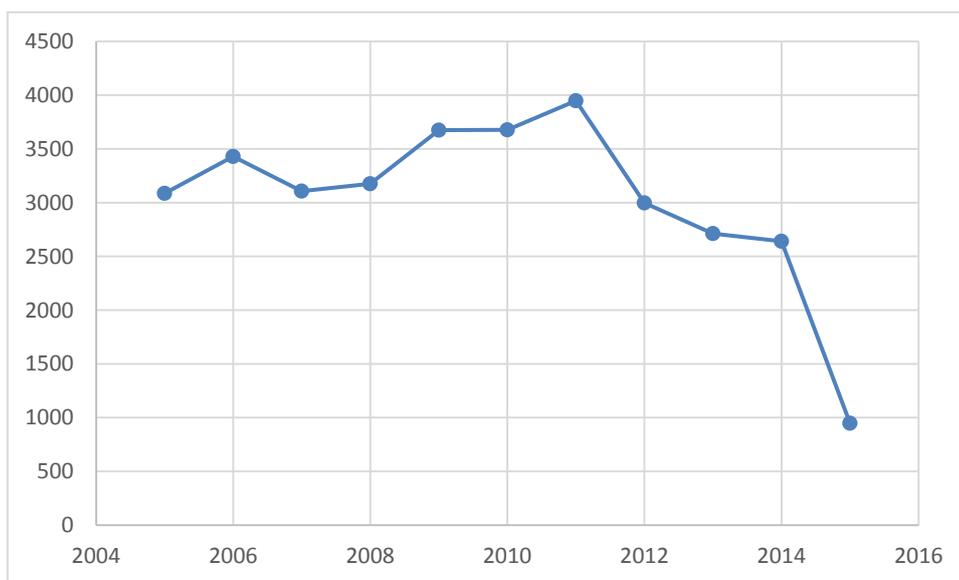


Figura 3 – Evolução no depósito de patentes com lipases bacteriana nos últimos anos.
Fonte: WIPO

Com o intuito de organizar os depósitos de patentes de acordo com o seu objetivo e aplicação, foi criada a Classificação Internacional de Patentes (ICP - *International Patent Classification*). Esta classificação permite avaliar o desenvolvimento tecnológico em diversas áreas.

Ao avaliar o desenvolvimento no ramo de lipases na última década, nota-se que os estudos com esta enzima estão relacionados com seu uso como um componente em preparações agrícolas e médicas, e na formulação de detergentes. Nota-se também o avanço na tecnologia

por meio de muitas técnicas de otimização do processo de produção de lipases por meio de fermentação. Thakur (2012) relatou um aumento no número de lipases disponíveis desde a década de 1980 como uma consequência dos enormes progressos alcançados na clonagem e expressão de enzimas de microbianas, bem como de um aumento da procura para estes novos biocatalisadores com propriedades específicas e, como a especificidade, a estabilidade, o pH, e a temperatura.

No Brasil, o órgão responsável pelo registro e concessão de patentes é o INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual). Apesar de ser um órgão brasileiro, a maioria das patentes de lipases depositadas são de origem estrangeira. No Brasil, o desenvolvimento da tecnologia está concentrado nas universidades, financiada por órgãos como Petrobrás. Estas tecnologias com lipases estão voltadas principalmente para a formulação de detergentes e processos fermentativos.

A busca por desenvolvimento de novos produtos, o avanço na tecnologia enzimática, no isolamento e manipulação de micro-organismos permitirá um avanço nesse mercado pouco explorado industrialmente.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. **Biomolecules**. v. 4. p. 117-139. 2014.

AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter sp.* EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**. v. 101. p. 3628-3634. 2010.

ALKAN H.; BAYSAL, Z.; UYAR, F.; DOGRU, M. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 136, p. 183-192. 2007.

AL-ZUHAIR, Z. Production of Biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1442-1448, 2005.

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

AMANTE, E.R.; CASTILHO JR, A.B.; KANZAWA, A.; ENSSLIN, L.; MURAKI, M. Um panorama da tecnologia limpa na indústria de frangos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 16-21. 1999.

AN, S.Y.; KIM, S.W.; CHOI, Y.L.; CHO, Y.S.; JOO, W.H.; LEE, Y.C. Cloning, expression in *Escherichia coli* and enzymatic properties of a lipase from *Pseudomonas sp.* SW-3. **The Journal of Microbiology**. v. 41, p. 95-101. 2003.

ANNENKOV, G.A.; KLEPIKOV, N.N.; MARTYNOVA, L.P.; PUZANOV, V.A. Wide range of the use of natural lipases and esterases to inhibit *Mycobacterium tuberculosis*, **Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.** v. 6, p. 52-56. 2004.

ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 2804-2817. 2006.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 6, p. 141-158. 2007.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. **Biochemical Journal**. v. 343, p. 177-186. 1999.

BABU, I. S.; RAO, G. H. Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Research Journal of Microbiology**. v. 2, p. 88-93. 2007.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 102, p. 133-153, 2000.

- BOEKEMA, A.B.; BREUER, M.; HAUER, B.; KOSTER, M.; ROSENAU, F.; JAEGER, K. E.; TOMMASSEN, J. Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73. p.3838-3844. 2007.
- BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.73-81, 2002.
- BRADDOO S., SAXENA R. K.; GUPTA R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus sp*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 15, p. 97-102. 1999.
- CADIRCI, B.H.; YASA, I. An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 64, p. 155-167. 2009.
- CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 183-190, 2007.
- CARDOSO, C. M.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**. v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.
- CASTRO, H., F.; MENDES, A., A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R. An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**. v. 109. p. 727-736. 2008.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p.3-27, 1997.
- D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa**. 2001. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). São Paulo, 2001.
- DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of diferente carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26. p. 657-663. 2000
- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D. M. G; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.676-68, 2008.
- DE PASCALE, D., CUSANO, A.M.; AUTORE, F.; PARRILLI, E.; DI PRISCO, G.; MARINO, G.; TUTINO, M.L. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium

Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. **Extremophiles**. v. 12, p. 311-323. 2008.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 1983-1991. 2009.

DUTTA, S.; RAY, L. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 142-154. 2009.

EL KHATTABI, M.; VAN GELDER P.; BITTER W.; TOMMASSEN, J. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 22(5-6), p. 329-338. 2003.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAC, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**. v.149. p.720-724. 2007.

FICKERS, P.; ONGENA, M.; DESTAIN, J.; WEEKERS, F.; THONART, P. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 756-759. 2006.

FRANSSEN, M.C.R.; ALESSANDRINI, L.; TERRANEO, G. Biocatalytic production of flavors and fragrances. **Pure and Applied Chemistry**. v. 77, p. 273-279. 2005.

GHOSH P. K.; SAXENA, T. K.; GUPTA, R.; YADAV R. P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: Production and applications. **Science Progress**. v. 79, p. 119–157. 1996.

GUNCHEVA, M., ZHIRYAKOVA, D.; RADCHENKOVA, N.; KAMBOUROVA, M. Properties of immobilized lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. Acidolysis of triolein with caprylic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 727-731. 2009.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

GUPTA R.; RATHI, P.; BRADDOO S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 43, p. 635-644. 2003.

GUTARRA, M.L.E.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Seleção de fungos produtores de lipase por fermentação em estado sólido. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

HARTMANN, M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. **Chemistry of Materials**. v. 17, p. 4577-4593. 2005.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 782-798. 2009.

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

HENDRIKSON, H. S. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**. v. 219. p. 1-8. 1994.

HU, B.; PAN, J.; YU, H.L.; LIU, J.W.; XU, J.H. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of diltiazem intermediate. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 1019-1024. 2009.

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

JAEGER, K.L.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **TIBTECH**, v.16, p. 396-403, 1998.

JALADI, H.; KATIYAR, A.; THIEL, S.W.; GULIANTS, V.V.; PINTO, N.G. Effect of pore diffusional resistance on biocatalytic activity of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SBA-15hosts. **Chemical Engineering Science**. v. 64, p. 1474-1779. 2009.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**. v. 26, p. 457-470. 2008;

KATO, K.; SEELAN, S. Enhancing activity and stability of *Burkholderia cepacia* lipase by immobilization on surface-functionalized mesoporous silicates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, p. 615-617. 2010.

KIM, E. K.; JANG, W. H.; KO, J. H.; KANG, J. S.; NOH, M. J.; YOO, O. J. Lipase and its modulator from *Pseudomonas* sp. strain KFCC 10818: Proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator. **Journal of Bacteriology**. v. 183. p. 5937-5941. 2001.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

KUMAR, A.; KANWAR S.S. Synthesis of isopropyl ferulate using silica-immobilized lipase in an organic medium. **Enzyme Research**. v. 2011, p. 1-8. 2011.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S.K.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 38-44, 2005.

KUMAR A., SHARMA P.; KANWAR S. S. Lipase catalyzed esters syntheses in organic media: A review, **International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences**. v. 2(2), p. 91-119. 2012.

- LEE, S.H; PARK, D.H. Isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 18. p. 1908-1914. 2008.
- LEE, D. G.; PONVEL, K.M.; KIM, M.; HWANG, S.; AHN, I.S.; LEE, C. H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 57, p. 62-66. 2009.
- LEE, D.W.; KIM, H. W.; LEE, K. W.; KIM, B, C.; CHOE, E. A. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 29, p. 363-371. 2001.
- LEE, H. K., LEE, J.K.; KIM, M. J.; LEE, C. J. Immobilization of lipase on single walled carbon nanotubes in ionic liquid. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. v. 31, p. 650-652. 2010.
- LIANGHUA, T.; LIMING, X. Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 125, p. 139-146. 2005.
- LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T. L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**. v.19. p.25-31. 2004.
- LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. v. 2, p. 1-11. 2012.
- LIN, E.S.; WANG, C.C.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2006.
- LITHAUER D., GINSTER A.; SKEIN E. *Pseudomonas luteola* lipase: A New Member of the 320 – Residue Pseudomonas Lipase Family. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 209-215. 2002
- LIU, C. H.; LIN, Y. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 40, p. 359-363. 2009.
- LONG, Z.D., XU, J.H.; ZHAO, L.L.; PAN, J.; YANG, S.; HUA, L. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.27. p.105-110. 2007.
- LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31, 1. 2011.

- MADAN, B.; MISHRA, P. Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.85. p.597-604. 2010.
- MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S.; Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**. v. 77 p. 145-155. 2001.
- MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. 2001. Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001.
- MATSUMAE H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 75, p. 93-98. 1993.
- MNISI, S. M.; LOUW, M. E.; THERON, J. Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11. **Current Microbiology**. v.50. p.196-201. 2005.
- MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**. v. 70, p. 609-624. 2005.
- MIYAZAKI, K.; FUJIKAWA, S. Production and characterization of α -linolenic acid enriched structured lipids from lipase-catalyzed interesterification. **Food Science and Biotechnology**. v.19: p. 57-62. 2009.
- MORMENEO, M.; ANDRES, I.; BOFILL, C.; DIAZ, P.; ZUECO, J. Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 80, p. 437-445. 2008.
- NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase: Effect of various parameters on extraction. **Process Biochemistry**. v. 44. p. 1172-1178. 2009
- NAWANI, N.; J. KAUR. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* J33. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 206, p. 91-96. 2000.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDIT, A. B.; HARRISON, S.; FARKADE, V. D. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p. 247, 2005.

PEREIRA, E. B. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas**. 2004. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. 154p. 2004.

PINHEIRO, T. L. S. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. 2006. Dissertação (Mestrado). Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2006.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. Biodiesel: Na overview. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16(6B), p. 1313-1330, 2005.

POGAKU, P., SURESH, A.; SRINIVAS, P.; REDDY, S. R. Optimization of lipase production by *Staphylococcus sp.* Lp12. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 882-886. 2010.

QUYEN, D.T., SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R. D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. **Protein Expression and Purification**. v. 28. P.102-110. 2003.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Lipases: Introduction. In: SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M. **New Lipases and Proteases**. Nova Science Publishers, New York, 2006. p. 1-22.

RAMANI, K.; CHOCKALINGAM, E.; SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 531-535. 2010.

RAMCHURAN, S. O.; VARGAS, V.A.; HATTI-KAUL, R; KARLSSON, E. N. Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.71. p.463-472. 2006.

RIAZ, M.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.; HASAN, F. Characterization of lipase produced by *Bacillus sp.* FH5 in immobilized and free state. **Annals of Microbiology**, v.60. p.169-175. 2010.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensor para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química. Nova**, v.24, n.1, p. 77-86, 2001.

SALIHU, A.; ALAM, D. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resour Conservation Recycling**. v. 58: p. 36-44. 2012.

SANI, D.G. Concomitant production, partial purification and characterization of a serine protease and a proteolysis-resistant metalloprotease from *Bacillus pumilus* SG2. **Z. Naturforsch**, v.65. p.61-65. 2006.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. **Research Journal of Microbiology**. v. 6, p. 1-24. 2011.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production, partial purification and characterization of a serine protease and a proteolysis-resistant metallolipase from *Bacillus pumilus* SG2. **Z. Naturforsch.** v. 65. p. 61-65. 2010a.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: Production, purification and characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41. p.179-185. 2010b.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. v. 52: p. 1-18. 2003.

SAXENA R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADDOO S.; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**. v. 77(1), p. 101–115. 1999.

SIQUEIRA, L. P. **Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para determinação de triglicérides**. 2009. Dissertação (Mestrado). Mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Pernambuco. Recife. 2009

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

TALON, R.; MONTEL, M. C.; BERDAGUE, J. L. Production of flavour esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19. p.620-622. 1996.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. v.3, n.7, p.1-40, 2012.

TREVISAN, H. C. Lipases In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

TRIPATHI, M.K; ROY, U.; JINWAL, U. K.; JAIN, S. K.ROY, P. K. Cloning, sequencing and structural features of a novel Streptococcus lipase. **Enzyme Microbiology Technology**, v.34. p.437-442. 2004.

UNEP – UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; DEPA – DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; COWI Consulting Engineers and Planners AS, Denmark. Cleaner production assessment in meat processing. Paris: UNEP, 2000. Disponível em <<http://www.agrifood-forum.net/publications/guide/index.htm>>

VERMA M. L.; KANWAR S. S. Properties and application of poly(methacrylic acid-cododecyl methacrylate-cl-N,N-methylene bisacrylamide) hydrogel immobilized *Bacillus cereus* MTCC 8372 lipase for the synthesis of geranyl acetate. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 110, p. 837–846. 2008.

VERMA, N., THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). **International Research Journal of Biological Sciences**. v. 1(8), p. 88-92. 2012.

WANG, X., YU, X.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 45, p. 94-102. 2009.

WEERASOORIYA M. K. B.; KUMARASINGHE, A. A. N. Isolation of alkaline lipase from rubber seed- Partial purification, characterization and its potential applications as a detergent additive. **Indian Journal of Chemical Technology**. v. 19, p. 244-249. 2012.

WU, H. S.; TSAI, M. J. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p. 488-493. 2004.

YANG, J., ZHANG, B.; YAN, Y. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 159, p. 355-365. 2009.

ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 481-486, 2005.

ZARRINGHALAMI, S.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M.; HAMIDI-ESFEHANI, Z. Enzymatically modified tea seed oil as cocoa butter replacer in dark chocolate. **International Journal of Food Science and Technology**. v.45, p.540-545. 2010.

ZHANG, A., R.; GAO, R.; DIAO, N.; XIE, G.; GAO, G.; CAO, S. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56, p. 78-84. 2009.

4. CAPÍTULO II – ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO

Trabalho a ser submetido à Revista:

REVISTA CAATINGA

Página eletrônica:

<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/index>

ISSN: 1983-2125 (on-line)

0100-316X (impresso)

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO¹

Camila Míryan de Oliveira Ferreira², Fernanda Matias^{3*}, Luiz Augusto Vieira Cordeiro³.

RESUMO: Baseando-se na hipótese que ambientes com alto teor de lipídios são fontes de micro-organismos produtores de lipases, objetivou-se isolar bactérias a partir de águas residuais de abatedouro, a fim de selecionar uma ou mais bactérias promissoras para a produção desta enzima. As amostras de água foram inoculadas em três diferentes meios, Meio mineral, Água peptonada e Água destilada, contendo óleo de soja como indutor de lipases, e incubadas em agitação por 48 horas. Foram recuperadas um total de 68 linhagens, que foram submetidas ao teste enzimático com Rodamina B para a triagem de cepas produtoras de lipase. Nove linhagens foram identificadas como positiva no teste, com destaque para a ABAD07 e ABAD23 que apresentaram maior fluorescência quando observadas em luz ultravioleta a 365 nm. Dentre as nove linhagens promissoras, seis foram caracterizadas como Gram-negativas e três como Gram-positivas. Os resultados evidenciaram que águas residuais de abatedouros são fontes interessantes de bactérias lipolíticas.

Palavras-chave: Isolamento. Lipase. Bactéria. Rodamina B.

*Autor para correspondência.

¹ Trabalho de dissertação do primeiro autor.

² Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. e-mail: camilamiryan@gmail.com

³ Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

ISOLATION AND SELECTION OF LIPOLYTIC BACTERIA FROM WASTEWATER SLAUGHTERHOUSE

ABSTRACT: Based on the supposition that environments with high levels of lipids are sources of producing lipases microorganisms, is aimed to isolate bacteria from wastewater slaughterhouse in order to select one or more promising bacteria for the production of this enzyme. Water samples were inoculated into three different means, mineral medium, peptone water and distilled water containing soybean oil as lipases inducer and incubated under stirring for 48 hours. They identified a total of 68 strains were subjected to the enzymatic assay with Rhodamine B for screening for lipase producing strains. Nine strains were identified as positive in the test, highlighting the ABAD07 and ABAD23 that showed higher fluorescence when viewed in ultraviolet light at 365 nm. Among the nine promising strains, six were characterized as Gram-negative and three as Gram-positive. The results showed that wastewater from slaughterhouses are interesting sources of lipolytic bacteria.

Keywords: Isolation. Lipase. Bacteria. Rhodamine B.

INTRODUÇÃO

A indústria de abate e processamento de carnes desempenha um importante papel em relação à poluição ambiental, principalmente em função do grande consumo de água e geração de efluentes com alta carga poluidora (MACHADO et al., 2007).

Efluentes de abatedouros, frigoríficos, laticínios e indústrias de alimentos em geral, contém altos níveis de gorduras e proteínas que apresentam baixa biodegradabilidade. Os problemas causados por excesso de óleo e gordura incluem a redução da taxa de transferência de fase de células-aquosa, sedimentação devido ao desenvolvimento de micro-organismos filamentosos, desenvolvimento e flotação de lamas com fraca atividade, o entupimento e o aparecimento de odores desagradáveis. Assim, a aplicação de um pré-tratamento para hidrolisar e dissolver os lipídios pode melhorar a degradação biológica de águas residuais, acelerar o processo e melhorando assim a eficiência de tempo (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Os micro-organismos hidrolisam os triacilglicerídeos em meio extracelular, por ação de lipases, produzindo ácidos graxos e glicerol. As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas, presentes em acilgliceróis (SAXENA et al, 2003).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se ao fato de catalisar não apenas a hidrólise, mas também reações de esterificação e transesterificação, e mantêm sua estrutura e atividade em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores, catalisam reações em baixa temperatura e pressão, possuem uma larga especificidade pelo substrato, e exibem alta enantiosseletividade (SAXENA et al., 2003; CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004; CONTESINI et al., 2009; RIGO et al., 2010).

Dentre os processos bioquímicos descritos na literatura, as lipases estão entre as enzimas mais empregadas. Depois das proteases e amilases, esse grupo enzimático movimentando bilhões de dólares. No entanto, mesmo com uma variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (PAQUES; MACEDO, 2006). Com isso, o crescente mercado enzimático das lipases exige a seleção de novos micro-organismos produtores com maiores taxas de produção a fim de reduzir os custos, visando aumentar a produtividade e obter enzimas com diferentes propriedades (SHU; XU; LIN, 2006).

Diante desta realidade, este trabalho teve por objetivo o isolamento e seleção de bactérias produtoras de lipases, a partir de amostras de água residual de abatedouro local.

MATERIAL E MÉTODO

Coleta e enriquecimento

As linhagens bacterianas deste projeto foram obtidas a partir de água residual do Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró S/A – AFIM (-5.211067, -37.314047). Foram coletadas três amostras, de pontos aleatórios e levadas ao laboratório em caixas térmicas.

O processo de enriquecimento bacteriano foi realizado utilizando três diferentes meios: Meio mínimo (descrito na Tabela 1 e 2), Água Peptonada e Água destilada. Para isso, 10 mL das amostras foram transferidas para frascos de vidros assépticos, contendo 50 mL dos respectivos meios e 5 mL de óleo de soja comercial, que atua como indutor na produção de lipases. Os frascos foram incubados em agitadores durante 48h, a 120 rotações por minuto (rpm) à temperatura de 30 °C, segundo metodologia adaptada de Haba e colaboradores (2000), e Mongokolthanarukw e Dharmstithi (2002).

Isolamento bacteriano

Após o período de incubação, 100 µL das amostras provenientes do enriquecimento foram subcultivadas em meio mineral mínimo sólido e meio mineral basal (descrito nas Tabelas 3 e 4), realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30 °C por um período de 24 a 72 horas. A sequência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias para a obtenção de culturas puras.

Seleção de bactérias lipolíticas

As linhagens foram inoculadas em meio basal contendo três diferentes concentrações de Rodamina B, óleo de soja comercial e Triton X-100. O Meio 1 continha solução de Rodamina B (0,001% m/v), e emulsão de óleo de soja comercial com Triton X-100 (Sigma) para uma concentração final de 1% e 0,1%, respectivamente. No Meio 2 foi acrescido 0,01% de solução de Rodamina B, e uma emulsão de óleo de soja (2%) com Triton X-100 (1%). E no meio três as concentrações de Rodamina B, óleo de soja e Triton X-100 foram de 0,1%, 5% e 1%, respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C por 24-48h, e após esse período, observadas em luz ultravioleta a 365 nm. Este procedimento foi realizado em triplicata, duas vezes.

Os isolados selecionados no teste enzimático foram caracterizados pela análise visual das colônias crescidas a 30°C em Agar Nutritivo, e pela análise morfológica e tintorial, através da visualização de lâminas por coloração de Gram. Todos os isolados foram estocados a -20 °C em Meio basal com adição de Solução de Glicerol a 25%.

Tabela 1: Meio de Cultura Mínimo

Reagentes P.A. e Soluções	Composição Química	Concentração
Cloreto de sódio	NaCl	1,0 g/L
Sulfato de amônio	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/L
Fosfato de sódio monobásico	Na ₂ HPO ₄	6,2 g/L
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	0,9 g/L
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L
Solução fungicida ¹		1 mL/L
Solução de micronutrientes ²		1 mL/L
Ágar puro em pó ³		15 g/L

¹Acrescido ao meio de cultura após esterilização.

²Preparada conforme descrição dos reagentes e suas concentrações na tabela a seguir.

³O Ágar será utilizado apenas para a produção de meio de cultura mínimo sólido.

Tabela 2: Solução de Micronutrientes

Solução (*)	Reagentes P.A.	Composição química	Concentração (mg/l)
1	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	1500
	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	1500
	Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	500
	Sulfeto de sódio	Na ₂ S.7H ₂ O	50
2	Cloreto de ferro	FeCl ₃ . 6H ₂ O	2000
	Cloreto de zinco	ZnCl ₂	50
	Cloreto de cobre	CuCl ₂ . 2H ₂ O	30
	Cloreto de manganês	MnCl ₂ . 2H ₂ O	500
	Molibidato de amônio	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	50
	Cloreto de alumínio	AlCl ₃	50
	Cloreto de cobalto	CoCl ₃ . 6H ₂ O	2000
	Ácido clorídrico	HCl (concentrado)	1 mL

(*) É adicionado 1mL da solução 2 a 1 litro da solução 1, compondo a solução de diluição.

Tabela 3: Meio Basal de Sais Minerais

Reagentes P.A. e Soluções	Composição Química	Concentração
Sulfato de amônio	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g/L
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	5,65 g/L
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	2,38 g/L
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g/L
Solução de sais traços ¹		1 mL/L
Ágar puro em pó		15 g/L
Solução de glicose 1% ²		

¹Preparada conforme descrição dos reagentes e suas concentrações na tabela a seguir.

²Autoclavar a solução de glicose separadamente, e adicionar junto a solução após esfriar.

Tabela 4: Solução de Sais Traços

Reagentes P.A. e Soluções	Composição Química	Concentração
Sulfato cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	6,4 g/L
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,1 g/L
Cloreto de manganês	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,9 g/L
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/L

RESULTADO E DISCUSSÃO

Após o enriquecimento, foram isolados um total de 68 colônias microbianas morfológicamente distintas, dentre as quais 33 foram recuperadas a partir do enriquecimento com água destilada, 21 a partir do meio mínimo e 14 de água peptonada. As linhagens foram identificadas com a sigla AB seguido da sigla correspondente ao meio de cultura proveniente do seu enriquecimento (AD para água destilada, MM para meio mínimo e AP para água peptonada).

Os meios de cultivo utilizados neste trabalho foram escolhidos a fim de garantir uma diversidade maior de bactérias isoladas. O Meio Mínimo (Tabelas 1 e 2) descrito por Sugimori, Nakamura e Mihara (2002) e adaptado por Semionato (2006) contém Nistatina para prevenir o crescimento de fungos, e foi apontado como eficiente no isolamento de bactérias do gênero *Bacillus*. Já o Meio Basal (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) (Tabelas 3 e 4) mostra-se mais eficiente para os gêneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* e alguns *Bacillus*.

Entre os substratos que podem ser utilizados para selecionar os micro-organismos que produzem lipases, os óleos vegetais vêm se destacando cada vez mais. Um estudo realizado por Haba e colaboradores (2000) mostrou que o solo, uma vez enriquecido com óleo vegetal

residual, proporcionou condições favoráveis para o desenvolvimento e seleção de micro-organismos lipolíticos. Neste trabalho foi utilizado óleo de soja comercial para induzir o crescimento de bactérias lipolíticas no meio de cultivo, durante o enriquecimento.

Para a seleção de linhagens produtoras de lipase adotou-se o método que utiliza o corante fluorescente Rodamina B. A presença de um halo fluorescente indica as colônias positivas para a produção de lipases. Sendo assim, as linhagens foram selecionadas pelo tamanho do halo formado e pela intensidade da fluorescência em luz ultravioleta.

A sensibilidade, a rapidez e a simplicidade do teste de Rodamina B para a triagem de bactérias lipolíticas foram as principais razões para a utilização desse teste no presente trabalho.

Para a padronização da metodologia de seleção, três meios sólidos foram testados para avaliar a eficiência das concentrações de Rodamina B, óleo de soja e Triton X-100, e determinar a concentração ideal destes componentes que possibilite o crescimento bacteriano e a visualização dos halos utilizando a luz ultravioleta.

No Meio 3, que continha maior concentração de corante (0,1%) e de óleo (5%), não foi observado crescimento bacteriano em placas, talvez ocasionado a alta concentração de óleo, que deixou o meio semi-sólido. No Meio 2, observou-se o crescimento bacteriano, porém foi impossível detectar o aparecimento de halos e fluorescência. O Meio 1, que continha as menores concentrações de Rodamina B, óleo de soja e Triton X-100 (0,001%, 1% e 0,1%, respectivamente), foi favorável ao crescimento bacteriano e pode-se observar os halos e fluorescência em luz ultravioleta.

Alguns trabalhos fizeram uso de meio com Rodamina B a 0,001% m/v e conseguiram avaliar e selecionar eficientemente bactérias produtoras de lipase (SHARMA et al, 2014; CARVALHO, 2012; JARVIS; THIELE, 1997; KOUKER; JAEGER, 1987). Baldo e colaboradores (2013) detectaram a presença de atividade lipolítica em uma linhagem do gênero *Pseudomonas* utilizando um meio com concentração de Rodamina B e óleo de soja igual à utilizada no Meio 1 deste trabalho.

Nove isolados foram selecionados a partir do seu resultado positivo no teste enzimático, são eles ABAD01, ABAD5, ABAD7, ABAD9, ABAD12, ABAD17, ABAD20, ABAD21 e ABAD23 (Foto 1). As linhagens ABAD07 e ABAD23 apresentaram um grau de fluorescência mais elevado, comparado com as demais. De acordo com Kouker e Jaeger (1987), o tamanho do halo de hidrólise, representado pela fluorescência causada pela interação dos ácidos graxos livres com o corante, apresenta correlação positiva com a atividade lipolítica.

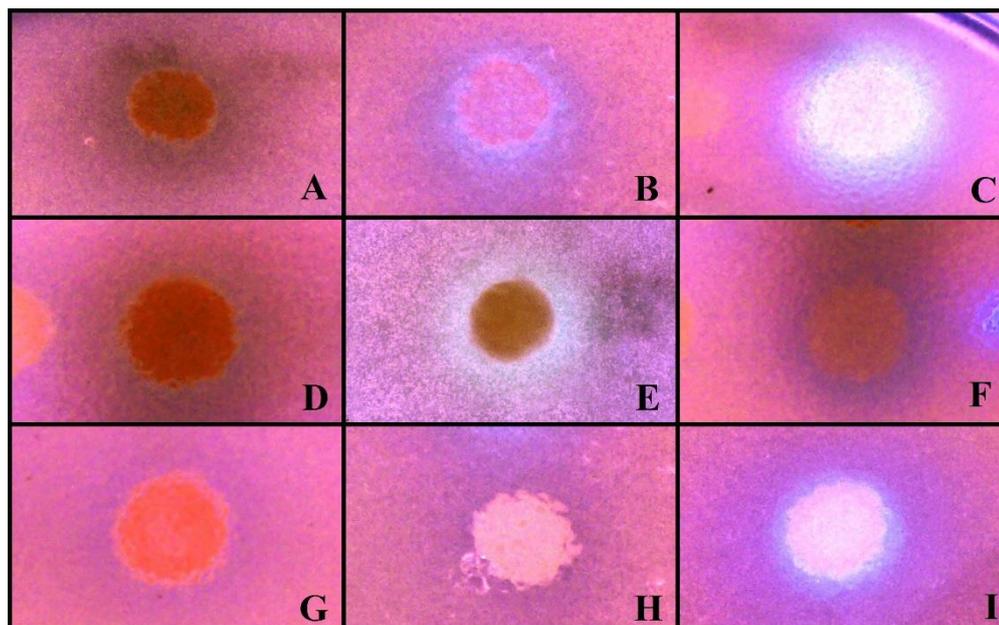


Figura 1 – Teste enzimático com corante Rodamina B, para a identificação de linhagens produtoras de lipase. (A) ABAD01 (B) ABAD05 (C) ABAD07 (D) ABAD09 (E) ABAD12 (F) ABAD17 (G) ABAD20 (H) ABAD21 (I) ABAD23

Semionato (2006) isolou 27 cepas de bactérias a partir da espuma de dispositivos de remoção de gorduras, das quais 19 linhagens lipolíticas foram selecionadas pelo teste de Rodamina B. Carvalho (2012), também pelo método da Rodamina B, conseguiu selecionar 25 linhagens produtoras de lipase, a partir de solo contaminado com óleo vegetal, dentre elas uma espécie do complexo *Burkholderia cepacia*.

As nove linhagens promissoras foram provenientes do crescimento em placa com Meio basal, meio que contém glicose em sua composição. Um dos principais agentes envolvidos com a atividade lipolítica tem sido fonte de carbono, uma vez que as lipases são enzimas induzíveis geralmente produzidas na presença de lipídeos como um óleo ou qualquer outro indutor como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, tweens, sais biliares, glicerol e glicose (BRADDOO; SAXENA; GUPTA, 1999; GHOSH et al., 1996; LI; CHENG; CHEN, 2004; RATHI; SAXENA; GUPTA, 2001).

Autores relataram que alguns micro-organismos apresentam atividades mais elevadas, quando cultivadas em meio contendo glicose (SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001; MOHAN et al, 2008). Tavares (2011), ao estudar meios alternativos para a produção de lipase por *Bacillus licheniformis*, constatou um crescimento superior no meio que continha glicose e óleo de soja. Um estudo realizado por Dahiya e Purkayastha (2011) também mostrou que o meio que proporcionou uma maior atividade lipolítica para *Bacillus sp* PD-12 continha glicose em sua composição.

A glicose, além de ser fonte de energia para o metabolismo, é um precursor capaz de suprir uma gama de intermediários metabólicos que são os materiais primários necessários para as reações biossintéticas. A partir da glicose, os micro-organismos podem obter os esqueletos carbônicos para a síntese de aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas, ácidos graxos e outros intermediários metabólicos necessários para o seu crescimento e multiplicação (NELSON; COX, 2006).

Segundo Haba e colaboradores (2000), a variação do tempo de incubação é decorrente do tempo de crescimento de cada espécie de bactéria, estes autores avaliaram a atividade lipolítica em vários gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Serratia*) sendo que a resposta para o teste de Rodamina B variou entre 24 e 72 horas a 30°C. O halo fluorescente formado ao redor das colônias das linhagens lipolíticas isoladas nesta pesquisa foi observado, sob a luz U.V., após 24 a 48 horas.

Das nove linhagens promissoras selecionadas, seis foram caracterizadas como Gram negativas e três como Gram positivas, e sua morfologia está apresentada na Tabela 6.

Tabela 5 – Diversidade morfológica das linhagens promissoras isoladas de amostras de água residual de abatedouro.

Linhagens	Gram	Morfologia
ABAD01	-	Bacilos
ABAD05	+	Bacilos
ABAD07	+	Bacilos
ABAD09	-	Bacilos
ABAD12	+	Bacilos
ABAD17	-	Bacilos
ABAD20	-	Cocos
ABAD21	-	Cocos
ABAD23	-	Bacilos

Segundo a literatura a maioria das bactérias lipolíticas encontradas na natureza são Gram-negativas (JAEGER; REETZ, 1998; KANWAR; GOSWAMI, 2002, JAEGER; RANSAC; DIJKSTRA, 1994). O mesmo fato foi verificado nesta pesquisa, onde quase 70% das linhagens produtoras de lipases foram caracterizadas como Gram-negativas. Carvalho (2012) obteve resultado semelhante, onde no meio com Rodamina B, das 25 linhagens que apresentaram atividade lipolítica, 80% foi caracterizada como Gram-negativa e apenas 20% como Gram-positivas.

Dentre as bactérias lipolíticas Gram-negativas encontra-se os gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomona* e *Burkholderia* (HABA et al., 2000; LIMA JR., 2009; SUGIMORI;

NAKAMURA; MIHARA, 2002). Entretanto, algumas bactérias lipolíticas são Gram-positivas, dentre elas, podem-se citar alguns gêneros: *Clostridium*, *Bacillus* e *Staphylococcus*. Contudo, a atividade lipolítica destas bactérias é menos expressiva que a das bactérias Gram-negativas. (CAIL et al., 1986; WAKELIN; FORSTER, 1997; ROUSENAU; JAEGER, 2000; JAEGER; EGGERT, 1994).

Algumas características coloniais observadas neste estudo são semelhantes a bactérias lipolíticas já descritas na literatura. Colônias circulares, com superfície lisa e de coloração amarela-parda, como observada na linhagem ABAD12, caracterizam o gênero *Bacillus* (GIONGO, 2006). Colônias circulares lisas, que com o tempo adquirem coloração marrom ou marrom-amarelada, semelhantes a ABAD07, ABAD09 e ABAD23, pode se tratar de *Burkholderia mallei* ou *B. pseudomallei* (QUINN et al., 2007). As características morfológicas dos isolados não confirmam que as bactérias isoladas se tratam dos grupos ou espécies citadas, visto que há uma grande diversidade de bactérias produtoras de lipases (MESSIAS et al., 2011; SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001). A determinação de grupos bacterianos requer além da descrição morfológica colonial e bacteriana, diversas provas bioquímicas e/ou moleculares.

Em geral, os micro-organismos presentes numa área com elevado teor de uma substância específica, apresentam maior probabilidade de adquirirem a capacidade genética de decodificar enzimas que atuem na degradação desses compostos, tanto quanto maior for o seu tempo de exposição a tais compostos (DIAS, 2000). Por isso, o resultado deste trabalho não exclui a importância dos isolados com resultados negativos, pois o fato de serem obtidos de um ambiente complexo, com alto teor de lipídios, sugere que esses organismos produzem moléculas necessárias para degradar estes compostos e sobreviver a este ambiente. Algumas bactérias produzem lipases intracelular, que não secretadas no meio, não são detectadas pelo teste de Rodamina B, utilizado neste trabalho.

Diversos autores enfatizam que, embora os avanços nos campos da genética, fisiologia microbiana e instrumentação tenham provocado grande impacto na produção de enzimas, programas de triagem visando à seleção de micro-organismos com capacidade para produzir moléculas bioativas continuam a ser um importante aspecto da biotecnologia (BUZZINI; MARTINI 2002; HA et al., 2007; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; RUIZ; PASTOR; DIAZ, 2005).

CONCLUSÃO

A grande potencialidade das aplicações das lipases nos diferentes ramos industriais, principalmente devido às características diferenciadas apresentadas pelos diversos micro-

organismos produtores, justifica a procura por novas amostras produtoras dessa enzima, principalmente de em substratos mais rentáveis, como resíduos industriais.

Os resultados deste trabalho reforçam a ideia de que micro-organismos provenientes de ambientes com uma alta carga lipídica, mostram-se como verdadeiros produtores de lipase. Assim, as águas residuais de abatedouro e frigorífico, podem vir a ser uma fonte de estudo promissora para a prospecção de bactéria lipolíticas.

Apesar de uma parte importante no mercado mundial de lipases ser dominado pelas enzimas de origem fúngica, as lipases bacterianas têm sido extensivamente estudadas e sua comercialização tem melhorado. O conhecimento do potencial de lipases bacterianas aumentou e estas enzimas têm sido empregues pelos vários setores industriais com êxito.

REFERÊNCIAS

BALDO, C.; BAGGIO, L. M.; MORENO, T. G.; MAGRI, A.; DE MELO, M. C.; GASPARIN, F. G. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo da Produção de Lipase por Bactérias Isoladas de Efluente de Abatedouro Avícola. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 2, n. 3, p. 347-350. 2013.

BRADDOO, S.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.87–91, 1999.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, n.6, p.1020-1025, 2002.

CAIL, I. J.; BARFORD, J. P.; CALLANDER, R. G.; LICHACZ, R. Anaerobic digestion of high-strength cheese whey utilizing semicontinuous digesters and chemical flocculant addition. **Biotechnology Bioengineering**, n° 28, p. 1601-1608, 1986.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**. v.97. p. 2195-2210, 2006.

CARVALHO, L. C. T. **Produção de Lipases e Biossurfactantes por Bactérias Isoladas de um Solo Contaminado com Óleo Vegetal Residual**. 2012. Dissertação (Mestrado). João Pessoa. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. 2012.

CASTRO, H., F.; MENDES, A., A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CONTESINI, F.J.; SILVA, V.C.F.; MACIEL, R.F.; LIMA R.J.; BARROS, F.F.C.; CARVALHO, P.O. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **The Journal of Microbiology**, v. 47, p. 563-571, 2009.

DAHIYA, P.; PURKAYASTHA, S. Isolation, screening and production of extracellular alkaline lipase from a newly isolated *Bacillus* sp. PD-12. **Journal of Biological Sciences**, v.11, n.5, p. 381-387, 2011.

DIAS, A. E. X. O. **Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 142p. 2000.

GHOSH, P.K.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, W.S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v.79, p.119-157, 1996.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HA, S. H.; LAN, M. N.; LEE, S. H.; HWANG, S. M.; KOO, Y. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 4, p.480-483, 2007.

HABA, E., BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUES, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 40-44. 2000.

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

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1994.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, V. 16, n.º. 9, p. 396-403, 1998.

JARVIS, G. N.; THIELE, J. H. Qualitative Rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 29. p. 41-47. 1997.

JETTE, J. F.; ZIOMEK, E. Determination of lipase Activity by a Rhodamine-Thiglycerido-Agarose Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 219, p. 256-260, 1994.

KANWAR, L.; GOSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in purê hydrocarbon substrate and its applications in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 727–735, 2002.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.211–213, 1987.

LI, C.-Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.-L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source, **Biochemical Engineering Journal**, v.19, p.25–31. 2004.

LIMA JR., A. F. **Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 120f. 2009.

MACHADO, E. L.; DULLIUS A. G.; MARQUARDT, L.; KIST, L. T.; MOUTAQI, S. E. Gestão do uso das águas em unidade de abate de aves e suínos visando produção mais limpa. **24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Santa Cruz do Sul/RS, 2007.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.2, p.213-234, 2011.

MOHAN, T.S.; PALAVESAM, A.; IMMANVEL, G. Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. **African Journal of Biotechnology**. v. 7. p. 2728-2735. 2008.

MONGOGKOLTHANARUK W.; DHARMSTHITI S. Biodegradation of lipid-rich waster by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n° 50, p. 101-105, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger** - Princípios de Bioquímica. 4ª ed, São Paulo: Savier, 2006. p.1202.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lípases from látex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v.29, n.1, p.93-99, 2006.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 512p.

RATHI, P.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v.37, p.187–192, 2001.

RIGO, E.; NINOW, J.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V.; POLLONI, E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements LWT - **Food Science and Technology**. 2010.

ROUSENAU, F.; JAEGER, K. E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**, v. 82, n° 11, p. 1023-1032, 2000.

RUIZ, C.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Isolation of lipid-and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus sp.* CR-179. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 218-227, 2005.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. v. 52: p. 1-18. 2003.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE – UFES**. Dissertação (Mestrado) – UFES, p. 81, 2006.

SHARMA, D.; KUMBHAR, B. K.; VERMA, A. K.; TEWARI, L. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus sp.* **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3. n. 4. p. 205-211. 2014

SHARMA, R.; CHISTIB, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.16, p.313-340, 1966.

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

SUGIMORI, D.; NAKAMURA, M.; MIHARA Y. Microbial Degradation by *Acinetobacter sp.* Strain SOD-1. **Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, n°7, vol. 66, p. 1579-1582, 2002.

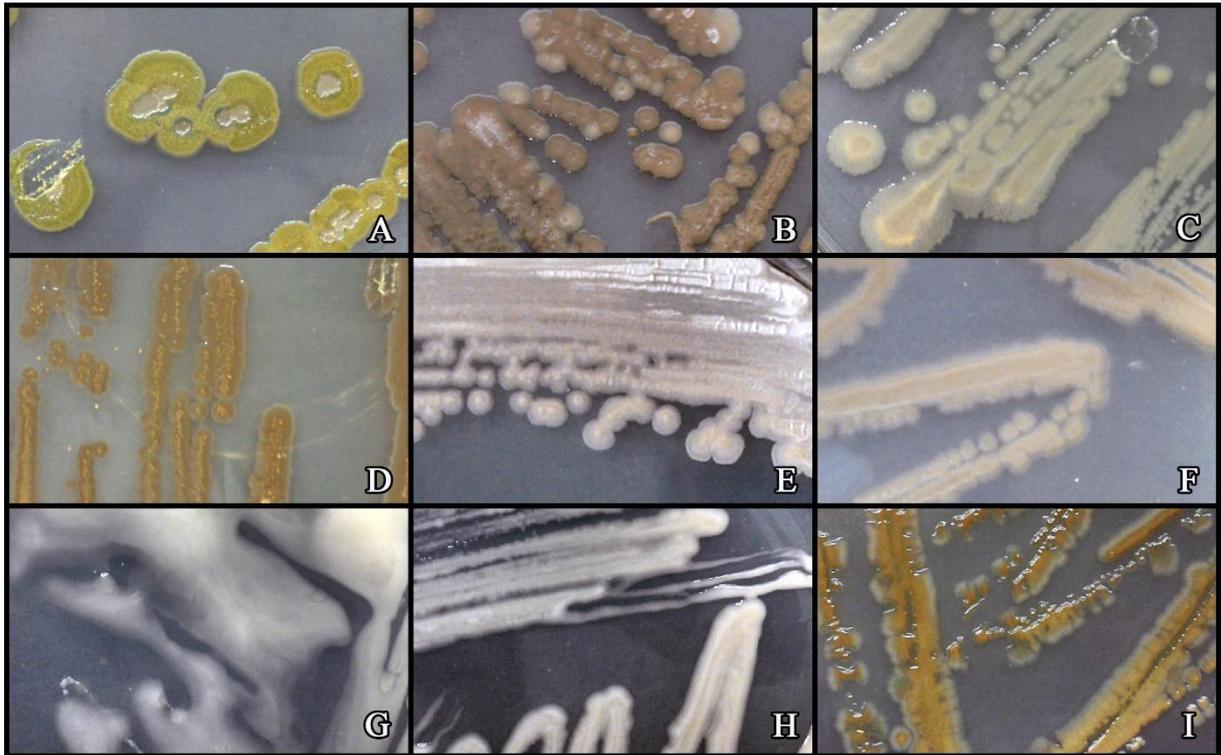
TAVARES, L. L. P. **Produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) a partir de meios a base de resíduo da indústria de sorvete**. 2011. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco. Recife. 103p. 2011.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An Investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, vol. 59, p. 37-43. 1997.

ANEXO

1 – MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS SELECIONADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO.

(A) ABAD01 (B) ABAD05 (C) ABAD07 (D) ABAD09 (E) ABAD12 (F) ABAD17 (G) ABAD20 (H) ABAD21 (I) ABAD23



2- DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS PROMISSORAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA RESIDUAL DE ABATEDOURO.

(A) ABAD01 (B) ABAD05 (C) ABAD07 (D) ABAD09 (E) ABAD12 (F) ABAD17 (G) ABAD20 (H) ABAD21 (I) ABAD23

