



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL  
MESTRADO EM PRODUÇÃO ANIMAL

CARLA MICHELE PEREIRA DE SOUZA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS**

MOSSORÓ

2016

CARLA MICHELE PEREIRA DE SOUZA

## **ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Produção Animal do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Linha de Pesquisa: Caracterização, Conservação E Melhoramento Genético De Recursos Locais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro

Co-orientador: Profa. Dra. Fernanda Matias

MOSSORÓ

2016

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)  
Setor de Informação e Referência (SIR)

S725i Souza, Carla Michele Pereira de.

Isolamento e seleção de bactérias lipolíticas / Carla Michele Pereira de Souza. - Mossoró, 2016.  
64f: il.

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

Dissertação (MESTRADO EM PRODUÇÃO ANIMAL) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

1. Bactérias. 2. Lipase. 3. Enzimas microbianas. 4. Microorganismo.  
5. Potencial microbiotecnológico - microbiota. I. Título

RN/UFERSA/BOT/017

CDD 579.3

CARLA MICHELE PEREIRA DE SOUZA

## ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS

Dissertação apresentada ao Mestrado em Produção Animal do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Linha de Pesquisa: Caracterização, Conservação E Melhoramento Genético De Recursos Locais.

Defendida em: 25 / 02 / 2016.

BANCA EXAMINADORA:



---

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



---

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



---

Profa. Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto (UFERSA)  
Segundo Membro (Segundo Tutor)

Dedico este trabalho ao meu avô Alderi Pereira (*in memorian*), por ter me ensinado, através de suas próprias atitudes a conquistar meus objetivos com integridade e respeito ao próximo.

*“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como à Deus, e não aos homens.”*

Colossenses 3:23

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que me deu e pelas oportunidades e conquistas que tem feito surgir no decorrer dela.

Aos meus pais Isa Helena e Oséas Pereira por todo apoio, cuidado, ensinamentos, carinho e incentivo que me deram, me dão e tenho certeza que não vão parar por aqui. Eu amo vocês!

Ao meu irmão Carlos Joel e ao restante da minha família por essa torcida gigante pelo meu sucesso a cada novo passo que dou em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Luiz Augusto pela oportunidade, suporte e apoio durante todo o mestrado

À minha co-orientadora Profa. Dra. Fernanda Matias, por tudo que me ensinou e que me fez crescer como pessoa e como profissional. Principalmente pela paciência pra responder dúvidas à noite, fins de semana, viajando ou feriados e pelos puxões de orelha.

À minha banca, Profa. Dra. Lidianne Leal Rocha e Profa. Dra. Raphaela Barreto, pela disponibilidade e por toda contribuição feita para este trabalho.

Ao meu amigo e namorado, Tito, por todo incentivo, pela paciência e compreensão nos dias de estresse, e por tornar esses dias mais leves.

Aos colegas do LABIN, que me acolheram com companheirismo, pela disponibilidade sempre que precisei de ajuda na realização deste trabalho.

Ao técnico Alexandre, por toda ajuda no decorrer da execução prática deste trabalho.

Ao Hotel Thermas, pelas amostras cedidas e pela compreensão e autorização da coleta das mesmas.

À toda coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal e à Profa. Dra. Liz Carolina da Silva por toda orientação, disponibilidade e incentivo durante esses dois anos.

À todos que contribuíram para realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1	(A) Estrutura tridimensional de uma lipase de <i>Pseudomonas</i> em sua conformação aberta (ativa) e (B) lipase de <i>Y. lipolytica</i> em sua conformação fechada. Em coloração mais escura a estrutura de “tampa” (Lid). Adaptado de Schrag et al., 1997 e Fickers et al., 2011.....	15
----------	--	----

### CAPÍTULO II

Figura 1	Localization of Mossoró/RN city.....	57
Figura 2	Rhodamine B test result. A. Rhodamine B test of Basal medium at 30 °C. B. Rhodamine B test in casein medium at 40 °C. C. Rhodamine B test in casein medium at 30 °C.	58
Figura 3	Best enzymatic activity values (U/mL) obtained of strains cultivated at 30 °C, range of enzymatic activity test 30 °C to 50 °C.	59
Figura 4	Best enzymatic activity values (U/mL) obtained of strains cultivated at 30 °C, range of enzymatic activity test 60 °C to 90 °C.	60
Figura 5	Comparison of bacterial growth at temperatures of 30 °C and 37 °C.....	61
Figura 6	Differences of highest levels of enzymes production at different cultivation temperatures, 30 °C and 37 °C.....	62
Figura 7	Best enzymatic activity values (U/ml) obtained of strains cultivated at 37 °C.....	63
Figura 8	Maximum levels of enzyme activity achieved in reactions with different pH values.....	64

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO I**

Tabela 1	Reações catalisadas por lipases.....	15
Tabela 2	Aplicações de lipases conforme o tipo de reação catalisada.....	23

### **CAPÍTULO II**

Tabela 1	Strains by sample with best results in each test.....	65
----------	---	----

## ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS

De Souza, Carla Michele Pereira. Isolamento e Seleção de Bactérias Lipolíticas. 2016. 65f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: caracterização, conservação e melhoramento genético de recursos locais.) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2016.

**RESUMO:** A produção de enzimas por microrganismos é mais vantajosa que as de origem vegetal e animal devido à maior facilidade na obtenção e manipulação dos mesmos. Os processos catalisados por enzimas microbianas são geralmente mais rápidos, mais eficientes, de menor custo e ambientalmente sustentáveis do que aqueles que são realizados com catalisadores químicos. Esse fato influencia diretamente no aumento da utilização dessas enzimas no ambiente industrial. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de longas cadeias de triglicérides transformando-os em glicérides e ácidos graxos. As lipases microbianas fazem parte de um dos mais importantes grupos de enzimas para a aplicação industrial. Além de estar envolvida em determinados processos dos setores alimentício, farmacêutico, cosméticos, têxtil, de papel e couro, essas enzimas também são utilizadas na suplementação de ração para animais que possuem deficiência no processamento de lipídeos. Diante do potencial promissor destas enzimas, este trabalho teve como objetivo principal o isolamento de bactérias produtoras de lipase a partir de amostras provenientes de águas termais com temperaturas variando entre 37 a 54 °C. As linhagens mais promissoras para produção de lipase foram selecionadas por meio do teste da Rodamina B e do p-nitrofenil palmitato (pNPP). Das 51 linhagens bacterianas isoladas, 17 demonstraram potencial lipolítico no teste de Rodamina. Destas, nove foram selecionadas no teste de atividade enzimática (pNPP) verificando que a temperatura de cultivo influencia na produção das enzimas. A temperatura de 30 °C foi a mais favorável para crescimento e produção das enzimas. Quanto à temperatura de atividade enzimática, verificou-se que uma das linhagens possui maior atividade à 70 °C, aumentando assim, o interesse da utilização da mesma no meio industrial pela produção enzimática termoestável. Os resultados obtidos refletem a importância em se estudar o potencial biotecnológico da microbiota associada aos ambientes térmicos para a prospecção de linhagens produtoras de lipases, e suas futuras aplicações agroindustriais.

**PALAVRAS- CHAVE:** Enzima. Lipase. Microrganismos. Bactéria.

## ISOLATION AND SELECTION OF LIPOLYTIC BACTERIA

SOUZA, Carla Michele Pereira. ISOLATION AND SELECTION OF LIPOLYTIC BACTERIA. 2016. 65f. Master Science Degree in Animal Production: Characterization, Conservation and Breeding of Local Resources. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2011.

**ABSTRACT:** The production of enzymes by microorganisms is advantageous that the vegetable and animal origin due to the ease in obtaining and handling them. The processes catalyzed by microbial enzymes are generally faster, more efficient, less costly and environmentally sustainable than those that are made with chemical catalysts. This fact directly influences the increased use of these enzymes in industrial environment. Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis of long chain triglyceride transforming them into glycerides and fatty acids. Microbial lipases are part of one of the most important groups of enzymes for industrial application. Besides being involved in certain processes in the food, pharmaceutical, cosmetics, textile, paper and leather, these enzymes are also used in supplementation of animal feed that have deficiency in processing lipids. On the promising potential of these enzymes, this work had as main objective the isolation of bacteria producing lipase from samples from hot springs with temperatures ranging from 37-54 ° C. The most promising lines for lipase production were selected by testing the Rhodamine B and p-nitrophenyl palmitate (pNPP). Of the 51 isolated bacterial strains, 17 demonstrated the potential lipolytic Rhodamine test. Of these, nine were selected in the enzyme activity test (pNPP) verifying that the cultivation temperature influences the production of enzymes. The temperature of 30 ° C was the most favorable to growth and production of the enzymes. For the enzymatic activity temperature, it was found that one of the lines has greater activity at 70 ° C, thereby increasing interest in the use of same in the industrial environment the thermostable enzyme production. The results reflect the importance of studying the biotechnological potential of the microbiota associated with thermal environments for prospecting producing strains of lipases, and future agro-industrial applications.

**KEYWORDS:** Enzyme. Lipase. Microorganisms. Bacteria.

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. LIPASES.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. PERFIL ECONÔMICO.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. FONTES DE LIPASE.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.1.. Lipases na produção de laticínios.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. LIPASE NA NUTRIÇÃO DE ANIMAIS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6. MICRORGANISMOS TERMOESTÁVEIS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CAPÍTULO II: SCREENING OF THERMOSTABLE BACTERIAL LIPASE PRODUCTION FROM MOSSORÓ, RN, BRAZIL.....</b>	<b>38</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>40</b>

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>41</b>
<b>METODOLOGY.....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>45</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>57</b>

## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os microrganismos encontram-se presentes em quase todos os tipos de habitats possuem ampla diversidade metabólica, propriedades cinéticas de produção de uma grande variedade de enzimas e estão adaptados a diferentes condições ambientais. Estas entre outras características contribuem para o aumento do interesse industrial na utilização dos mesmos como fonte para a produção de enzimas, apresentando uma relação custo/benefício bastante favorável (SHARMA et al., 2001).

As enzimas microbianas são comumente utilizadas no meio industrial para diversos fins, sendo preferêcia nas indústrias pelo fato de que os processos catalisados por elas são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO e SILVA, 2009). Os registros de produção em grande escala de enzimas industriais datam do início do século XX. No entanto, a utilização das mesmas tem início desde quando não se conhecia o seu conceito e nem mesmo a aplicação exata de cada uma, como na fabricação de queijo, pão e cerveja e alguns outros tipos de alimentos que já eram fabricados há mais de mil anos a.C. (ZIMMER et al., 2009).

Quando se trata de enzimas resistentes a temperaturas elevadas, as chamadas enzimas termoestáveis, a amplitude de utilização das mesmas como ferramentas industriais se torna maior ainda, tendo em vista que a maioria dos processos industriais está ligada a processos que envolvem altas temperaturas. As proteases e lipases estão incluídas no grupo de enzimas termoestáveis sendo utilizadas desde a fabricação de detergentes até a produção de alimentos (GOMES et al., 2007).

A indústria de lácteos utiliza amplamente enzimas como lipases, proteases, peptidases, lactases e lactoperoxidasas. A finalidade da utilização dessas enzimas vai desde a coagulação do leite para fabricação de queijo, até o auxílio na produção de leite

em pó e outros derivados de leite. A lipase, por exemplo, é bastante utilizada para realçar o sabor dos derivados do leite, principalmente do queijo (DEETH, 2006; HERNÁNDEZ et al., 2005)

Além da ampla utilização da lipase na produção de alimentos, detergentes, papel, entre outras, estas enzimas também podem ser utilizadas como suplemento alimentar na dieta de animais como suínos e aves, que apresentam um sistema digestivo imaturo ou deficiente na digestão de gordura (CAMPESTRINI et al., 2005). Diante da amplitude de importância que a enzima apresenta, este trabalho tem por objetivo o isolamento e a seleção de bactérias que apresentam a capacidade de produzir lipase em ambientes com temperaturas elevadas.

## 2. REFERÊNCIAS

1. CAMPESTRINI, E.; DA SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 2. n. 6. pp. 259-272, 2005.
2. DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in Milk. **International Dairy Journal**. v. 16. pp. 555–562, 2006.
3. MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**. v.3. n.5. pp. 9-23, 2009.
4. GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**. v. 30. no. 1. pp. 136-145, 2007.
5. HERNÁNDEZ, I. et al. Assessment of industrial lipases for flavour development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36. pp. 870–879, 2005.
6. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
7. ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**. v. 10. n. 14. pp. 123-137, 2009.

### 3. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. LIPASES

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas, classificadas como hidrolases, que catalisam a hidrólise e a síntese de ligações éster (HOLMES et al., 2011). Atuam como ferramenta poderosa catalisando não só a hidrólise, mas também reações de esterificação e transesterificação envolvendo ésteres insolúveis em água. Este grupo de enzimas é encontrado na maioria dos organismos dos reinos microbiano, vegetal ou animal (REIS et al., 2009; LIU et al., 2012).

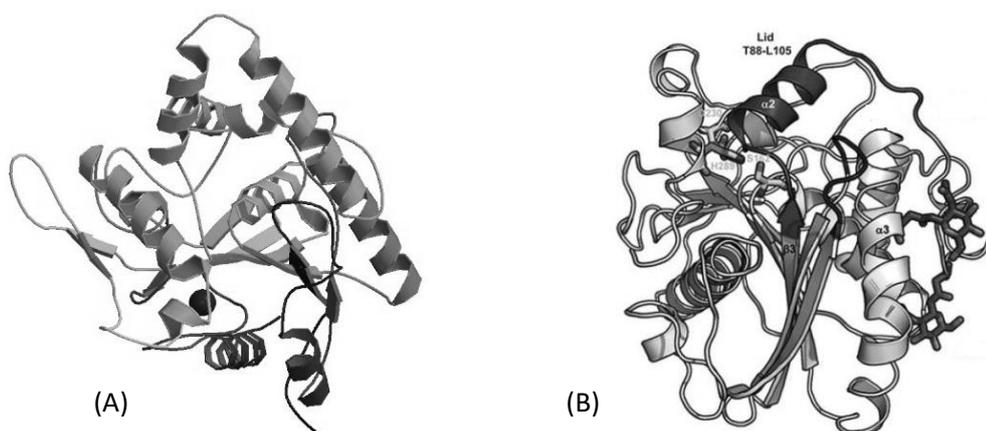
**Tabela 1** – Reações catalisadas por lipases. Reproduzido de Ribas, 2012.

Atividade	Reagentes			Produtos			
Hidrólise	Triglicerídeo $C_3R_3$	+	Água $3x H-OH$	$\leftrightarrow$	Ácido Graxo $3x R-H$	+	Glicerol $C_3(OH)_3$
Transesterificação ou Alcoólise	Triglicerídeo $C_3R_1_3$	+	Álcool $3x R_2-OH$	$\leftrightarrow$	Éster $3x R(1)-R(2)$	+	Glicerol $C_3(OH)_3$
Interesterificação	Triglicerídeo 1 $C_3R_1_3$	+	Éster 1 $3x R_2-R_3$	$\leftrightarrow$	Éster 2 $C_3R_2_3$	+	Triglicerídeo 2 $3x R_1-R_3$

As proteínas de lipase estão organizadas de modo similar como pré-proteínas, com pré-regiões correspondentes a um peptídeo sinal de 35 a 38 aminoácidos, um pró-peptídeo de 207-321 aminoácidos com caráter hidrofílico, e um peptídeo maduro compreendendo 383 a 396 aminoácidos. Estas enzimas são secretadas na forma para posteriormente serem processadas à forma madura por proteases específicas e são dependentes de cálcio para manter a estabilidade de sua estrutura terciária (ROSENSTEIN e GÖTZ et al., 2000).

Estas enzimas apresentam-se em equilíbrio entre uma maioria, que apresenta a forma inativa e fechada, e a minoria na forma aberta e ativa (Figura 1) em meio aquoso (QUILLES et al., 2015). Devido a uma polaridade oposta entre a enzima (hidrofílica) e os seus substratos (lipofílicos), as reações envolvendo as lipases ocorrem na interface entre a fase aquosa e as fases de óleo. Assim, as interfaces são os pontos principais para biocatálise da lipase e um local apropriado para modular a lipólise (REIS et al., 2009).

O mecanismo de ativação, dessa forma, é interfacial devido a uma cadeia hidrofóbica de aminoácidos que cobre o sítio ativo da enzima, chamado de “tampa”, que confere a forma abrir/fechar de enzima. Na presença de interface polar/não polar, tal como gotas de óleo, a enzima sofre mudanças conformacionais; a “tampa” é deslocada e a enzima se apresenta em sua forma aberta e ativa, que pode ser estabilizada com a adição de surfactantes (QUILLES et al., 2015). A composição de aminoácidos dessa região desempenha um papel extremamente importante influenciando na ativação interfacial, atividade e especificidade de substrato dessas enzimas (TANG et al., 2015).



**Figura 1** – (A) Estrutura tridimensional de uma lipase de *Pseudomonas* em sua conformação aberta (ativa) e (B) lipase de *Y. lipolytica* em sua conformação fechada. Em coloração mais escura a estrutura de “tampa” (Lid). Adaptado de Schrag et al., 1997 e Fickers et al., 2011.

As lipases microbianas possuem, geralmente, massa molecular entre 20 e 60 kDa e faixa de pH ótimo entre 7 e 9, apresentando em sua estrutura um sítio catalítico formado por resíduos de Ser-His-Asp, denominada a tríade catalítica serina-histidina-aspartato (BORNSCHEUER, 2002; CHEN et al., 2003). Por apresentarem um motivo estrutural conservado composto por uma estrutura em folha  $\beta$ -pregueada central contendo um resíduo de aminoácido de serina ativo e circundada por várias estruturas em  $\alpha$ -hélices, estas enzimas são classificadas como pertencentes à superfamília das  $\alpha/\beta$  hidrolases. O resíduo de serina ativo destas enzimas, geralmente, é encontrado em um pentapetídeo conservado composto pelos aminoácidos glicina e serina intercalados com qualquer resíduo de aminoácido, GX SXG (CORREIA, 2010).

Em sua estrutura, as lipases apresentam um padrão de dobramento do tipo  $\alpha/\beta$ -hidrolase, apesar de não apresentarem similaridade de sequência. No geral, as lipases possuem o padrão de dobramento alfa/beta hidrolase apresentando uma região central formado por fitas  $\beta$ -pregueadas paralelas cercado por várias fitas em  $\alpha$ -hélice. (FAN et al, 2008; COUTO, 2009).

Lazniewski e colaboradores (2011) identificaram novas potenciais lipases extracelulares entre proteínas transmembranares, de função desconhecida. Estas enzimas podem catalisar os passos iniciais na modificação de vários ésteres de glicerol (triglicéridos, fosfolípidos ou lisofosfolípidos), que são essenciais para a produção de ATP na célula.

### **3.2. PERFIL ECONÔMICO**

O mercado mundial de enzimas possui três segmentos: as enzimas técnicas, que são destinadas à indústria de tecidos e material de limpeza; enzimas para o

processamento de alimentos e bebidas e enzimas para a produção de ração animal. As proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanasas e fitases são as enzimas de maior aplicação industrial. As maiores empresas produtoras dessas enzimas são europeias, dentre elas a Novo Nordisk, na Dinamarca, a qual é responsável por cerca de metade da produção mundial de enzimas industriais (MUSSATTO, 2007).

Em 2007, o mercado mundial de enzimas industriais teve sua estimativa em 2,3 bilhões de dólares anuais (MUSSATTO, 2007). Em 2009, três enzimas se destacaram no mercado mundial: as amilases (25,4% da produção enzimática mundial), as celulasas (17,1%) e as lipases (7,2%). Ainda neste ano, as enzimas de uso industrial representaram 60% do mercado mundial (MONTEIRO e SILVA, 2009). De acordo com um relatório preparado em 2011 pela empresa Companhia e Mercados, o mercado global de enzimas movimentaria cerca de 3,74 bilhões de dólares até o ano de 2015, esse valor resultaria da soma das vendas para indústria de alimentação animal e outros segmentos.

A demanda mundial de enzimas cresce cerca de 6,3% ao ano e estima-se que, em 2017, este setor movimentaria cerca de 7 bilhões de dólares. Este aumento será possível devido ao aumento da renda per capita em grandes países como a China e a Índia, o que levará ao aumento da demanda do consumidor por produtos de maior valor, tais como detergentes e produtos alimentares produzidos com enzimas que liberam resíduos biodegradáveis em suas reações ao invés de resíduos químicos prejudiciais ao meio ambiente (FREEDONIA GROUP, 2014).

O mercado brasileiro de enzimas ainda é pouco representativo (cerca de 2% da produção mundial). A distribuição do uso dessas enzimas se dá de forma que 41% são utilizados em indústrias produtoras de detergentes, 26% para alimentos, 8% para

produção de ração e 25% para outros setores como têxtil, papel, farmacêutico, etc. (CBNA, 2011)

Apesar de apresentar um uso reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países, o Brasil é um país importador de enzimas de uso industrial. Em 2005, as importações de enzimas no país chegaram a 31 milhões de dólares e as exportações a 3 milhões. As lipases estão dentro do quadro de enzimas importadas pelo país (MUSSATTO, 2007). Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil, em 2008 o país importou um total de 72,5 milhões de dólares em enzimas industriais (cerca de 7,2 mil toneladas) e exportou 30,5 milhões de dólares (cerca de 4,5 mil toneladas) (MONTEIRO e SILVA, 2009).

O Brasil possui grande potencial de crescimento no setor de produção de enzimas, pois existe a possibilidade da bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo e de algodão, casca de soja, entre outros mais, que são encontrados em abundância em algumas regiões do país, essa bioconversão reduz o custo da produção enzimática. A geração de resíduos agroindustriais e o crescente dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel também contribuem para o crescimento do mercado de enzimas no país. (MUSSATTO, 2007).

### **3.3. FONTES DE LIPASE**

A produção de lipases foi primeiramente observada em bactérias do tipo *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens*, atualmente denominadas *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (JAEGER, et al. 1994). A produção das lipases de origem microbiana apresenta uma série de vantagens a mais que as de origem vegetal e animal, como, grandeza na

quantidade e na variedade de microrganismos produtores, maior possibilidade de manipulação genética desses organismos e pelo rápido crescimento dos microrganismos na formulação de meios alternativos de baixo custo (ZHAO et al., 2010).

Um estudo realizado por Danthine e Blecker (2014), mostrou que a lipase microbiana apresenta maior eficácia na quebra de gordura do que a do próprio organismo do animal (lipase endógena) na produção de derivados do leite. As lipases microbianas são capazes de romper a membrana artificial de gordura do leite e alcançar as gorduras nativas executando uma lipólise eficiente, devido à pressão entre a camada superficial da enzima e a membrana, sendo mais forte para a lipase microbiana, quando comparada com a lipase endógena.

Existem 47 diferentes tipos de lipases microbianas que foram agrupadas em seis famílias (I, II, III, IV, V e VI) com base na homologia da sequência de aminoácidos. As lipases bacterianas estão inseridas na família I, dita como lipases verdadeiras. Esta família compreende um total de 22 membros subdivididos em seis subfamílias (I.1, I.2, I.3, I.4, I.5 e I.6) em função da maior ou menor similaridade com a sequência de uma lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. As subfamílias I.1 e I.2 apresentam maior similaridade com as lipases encontradas no gênero *Pseudomonas* (ROSENAU e JAEGGER, 2000). A atividade das enzimas destas sub-famílias depende da presença de uma proteína chaperona denominada foldase lipase-específica (“Lif”), da ligação a íons  $\text{Ca}^{+2}$  intermediada por 2 resíduos de aspartato conservados nestas enzimas e localizados próximos à tríade catalítica (CORREIA, 2010).

A maior parte dos membros da subfamília I.1 das lipases apresentam um peptídeo sinal com um N-terminal, que dirige a sua secreção para o espaço extracitoplasmático. Para as lipases de bactérias Gram-positivas, este mecanismo é

suficiente, enquanto que as que são secretadas por bactérias Gram-negativas devem atravessar uma segunda barreira constituída pela membrana externa: após a segregação através da membrana interior, as lipases de bactérias Gram-negativas alteram sua conformação tridimensional no periplasma para uma forma enzimaticamente ativa por meio da proteína Lif (ZHA et al, 2014). De modo geral, estas enzimas não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis a altas temperaturas; possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (BELL et al., 2002).

### **3.4. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES**

As lipases microbianas, principalmente as que são obtidas a partir de bactérias são mais utilizadas no meio industrial do que as que são derivadas de plantas e animais devido a maior facilidade de obtenção e manipulação das mesmas (ADAN, 2009). Ainda que sejam produzidas por eucariotos superiores (plantas e animais), a obtenção de lipases para aplicação industrial tem como principal fonte os microrganismos, tanto microrganismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos) (BELL et al., 2002).

O processo de esterificação que influencia no sabor de uma variedade de alimentos realizado por catálise com a enzima lipolítica é muito mais eficiente e mais seletivo do que a esterificação convencional que utiliza de catalisadores químicos para a reação. Estes catalisadores químicos acabam gerando subprodutos e produtos indesejáveis de cor escura que alteram a qualidade do alimento (CHEN et al, 2015).

No quesito industrial, essas enzimas têm sido largamente utilizadas principalmente na preparação de aditivos alimentares e nas indústrias cosmética e farmacêutica. Além de outras aplicações nas indústrias de alimentos, na produção de

detergentes, em indústrias de couro, têxteis e de papel (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; LIU et al., 2012). Na Amazônia há uma grande variedade de óleos que são utilizados na indústria de cosméticos e as lipases apresentam eficácia no processamento desses compostos (WILLERDING et al., 2012).

Estas enzimas ainda possuem eficácia no processo e purificação de água contaminada com óleo e podem ser utilizadas na composição de produtos antibacterianos, uma vez que o bloqueio da etapa inicial de processamento de lipídios seria interromper o metabolismo celular geral levando o microrganismo à desnutrição e morte (LAZNIEWSKI et al., 2011).

Na indústria alimentícia as lipases participam do processamento de produtos tais como: sumos de frutas, vegetais, alimentos cozidos fermentados, queijo, manteiga, sopas e molhos. Sendo assim, aplicadas na modificação de lipídios (óleos e gorduras) presentes na composição destes alimentos (ADAN, 2009). Na fabricação de papel, as lipases são utilizadas para remover o tom de celulose residual no processamento da madeira que atrapalha a produção completa do papel (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006). Em um estudo comparativo realizado com três diferentes tipos de lipase na conservação de vida de prateleira do pão, os três tipos de pães em que foram adicionadas as enzimas duraram mais que os pães encontrados no mercado (GERITS et al., 2015).

A produção biotecnológica de biodiesel é baseada em reações de transesterificação/esterificação entre uma fonte de ácidos graxos e um álcool de cadeia curta, normalmente metanol, e as enzimas utilizadas nesses processos de bioconversão são as lipases de origem microbiana, por apresentarem um menor custo e maior eficácia na obtenção do produto (LOTTI et al., 2015).

**Tabela 2** - Aplicações de lipases conforme o tipo de reação catalisada

<b>Tipos de reações</b>	<b>Áreas aplicadas</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Produtos</b>
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras de leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (processamento de óleo)	Hidrólises de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos
	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleo	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits para diagnósticos
Esterificação	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes
	Indústria alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, flavorizantes e na produção de aromatizantes
	Farmacêutica	Síntese de intermediários em medicamentos	Antiinflamatórios
Transesterificação	Indústria fina	Transesterificação em óleos vegetais	Produção de biodiesel

Fonte: modificado de Durli (2007)

### 3.4.1. Lipases na produção de laticínios

As lipases utilizadas na produção de derivados de leite apresentam atividade satisfatória mesmo em altas temperaturas. Algumas lipases de bactérias do gênero *Bacillus* chegam a permanecer ativas em até 100 °C. Sendo assim, a criodissecação, a pasteurização e a pulverização do leite para a fabricação do leite em pó, não influenciam na eficácia das enzimas na execução de suas funções (CHEN et al., 2003).

A quantidade de lipase utilizada para produzir derivados do leite influencia diretamente na qualidade dos produtos finais. Devido aos níveis de ácidos graxos livres totais (FFA), que são liberados proporcionalmente à quantidade de lipase colocada no leite. Em alguns casos, se faz necessária a utilização de alguns tipos diferentes de substratos como trivalerina e triheptanoína que auxiliam a manter o controle da liberação de FFAs no leite (SVENSSON et al, 2006; ANDREWES et al, 2007).

O teor de ácidos graxos livres totais (FFA) está proporcionalmente ligado aos níveis de lipase durante a produção de leite em pó, ou seja, quanto maior os níveis de lipase maior será a quantidade de FFA encontrada no leite, o que influencia diretamente na qualidade do produto em si e de seus derivados. FFAs de cadeia curta dão a característica picante ao sabor do leite e os de cadeia média influenciam mais na consistência do que no sabor. Quanto maior o nível de FFA de cadeia média menos consistente se torna o leite ou os produtos derivados do mesmo (CHEN et al, 2003).

Na produção de diferentes tipos de queijo, algumas lipases já estão sendo utilizadas comercialmente para a maturação desses produtos, influenciando em aspectos como odor e intensidade do sabor (odor acentuado, sabor picante e odor coalho) bem como no teor de ácidos graxos livres totais (HERNÁNDEZ et al, 2005). Desse modo, o tipo e a quantidade de lipase presente no processamento do leite para a produção de queijo, determina também o tipo de queijo que será produzido. O queijo do tipo

Roquefort, por exemplo, apresenta níveis de atividade lipolítica maior do que o queijo do tipo Provolone e, conseqüentemente níveis maiores de ácidos graxos livres totais (SVENSSON et al, 2006).

Em queijo, os FFAs são liberados como resultado da lipólise, especialmente os ácidos graxos de cadeia curtas e médias que contribuem diretamente para a diferenciação do sabor do queijo. Também atuam como precursor de moléculas responsáveis por uma série de reações que conduzem à catabólitos que influenciam na produção de compostos de sabor e aroma, tais como: cetonas, metil, lactonas, ésteres, alcanos e álcoois secundários (COLLINS et al, 2003). A adição de lipases no leite utilizado para a fabricação de queijo, além de realçar o sabor e determinar o tipo do queijo, ainda acelera a maturação desses produtos aumentando os níveis de ácidos graxos livres totais na composição. Quanto maior a quantidade de lipase adicionada no leite, maiores os níveis de ácidos graxos livres na composição (YILMAZ et al., 2005).

Em um estudo realizado com a adição de três diferentes tipos de lipases comerciais na produção de queijo Idiazabal, feito a partir do leite cru de ovelha, foi comprovado que, em relação ao sabor, aqueles queijos que apresentavam baixa quantidade de lipase foram classificados como "suave", ao passo que os com elevada quantidade de lipase foram classificados como "forte". Foi observada ainda a existência de uma correlação linear entre a percentagem de ácidos graxos livres de cadeia curta e a pontuação para sabor pungente (HERNÁNDEZ et al, 2005).

O queijo Tullum, é um tipo de queijo fabricado somente na Turquia e possui um tempo de maturação de no mínimo quatro meses. A adição de lipases microbianas (extraída de espécies bacterianas como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) no leite utilizado para a fabricação desse

tipo de queijo acelera o tempo de maturação sem alteração do sabor natural do queijo produzido com maior tempo e sem a adição da lipase (YILMAZ et al., 2005).

### **3.5. LIPASE NA NUTRIÇÃO DE ANIMAIS**

Os peixes podem apresentar problemas de adaptação a níveis mais elevados de gordura na dieta, podendo acarretar na diminuição da digestibilidade de outros nutrientes, tais como aminoácidos, e restringindo a ação de enzimas digestivas, efeito este, que pode ser reduzido com a suplementação de lipase na dieta destes vertebrados (SAMUELSEN et al., 2001). A adição de 0,2% de lipase exógena na ração de juvenis de tambaqui influenciou positivamente no desempenho zootécnico desses peixes por aumentar a quantidade de proteína disponível para fins energéticos. Devido a uma potencialização da digestão dos lipídeos houve uma maior disponibilidade de energia de fonte não-protéica no organismos destes animais (NUNES et al., 2006).

Zamini e colaboradores (2014) constataram que a suplementação com um complexo enzimático (Natuzyne®) na dieta do *Salmo trutta caspius* proporcionou ganho de peso e melhor aproveitamento nutritivo dos compostos contidos na ração desta espécie de peixe. Dentre os componentes do complexo enzimático está a lipase que pode estar ligada ao aumento do grau de aproveitamento nutritivo encontrado. A adição de um complexo enzimático contendo lipase também apresentou sucesso na conversão e eficiência alimentar em juvenis de tilápia-do-nilo (SIGNOR et al., 2010).

As lipases também são utilizadas na suplementação da ração de animais com dificuldade no processamento de lipídios. Em um experimento realizado por Garcia e colaboradores (2000) a adição de lipase na dieta de frangos de corte apresentou melhora

na digestibilidade de lipídeos tendo como consequência o aumento da energia disponível contida na ração.

### **3.6. MICRORGANISMOS TERMOESTÁVEIS**

Os microrganismos são seres que apresentam uma grande capacidade de adaptação, alguns deles conseguem resistir a condições ambientais onde fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos. A temperatura é o fator que mais influencia a função das biomoléculas e o funcionamento do metabolismo. A maioria dos organismos pode crescer somente dentro de uma certa faixa de temperatura não muito variada (HAKI e RAKSHIT, 2003; GOMES et al, 2007).

São chamados de termófilos (ou termofílicos) os organismos que conseguem sobreviver à condições ambientais envolvendo temperaturas muito altas. Esses organismos são classificados em 3 tipos: os termófilos moderados que incluem organismos com faixa de crescimento entre 20 °C e 55 °C, sendo as temperaturas ótimas entre 40 e 50 °C; termófilos extremos que incluem microrganismos capazes de crescer otimamente em temperaturas entre 65 a 85 °C; e os hipertermófilos, que resistem à temperaturas ótimas de crescimento de 85 até 110 °C (MADIGAN e OREN, 1999).

A maioria dos processos industriais envolvem o uso de temperaturas mais elevadas. Isso ocorre devido ao fato de que altos graus de temperatura favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Sendo assim, existe um grande interesse em biomoléculas provenientes de microrganismos termófilos, ou seja, resistentes à altas temperaturas para a utilização nas reações químicas industriais (HAKI e RAKSHIT, 2003).

Para que um determinado microrganismo consiga se adaptar à termofilia é necessário que haja a adaptação da membrana citoplasmática do mesmo bem como de suas proteínas e DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. Estes microrganismos termofílicos despertam grande interesse biotecnológico e industrial tendo em vista que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses microrganismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (LEMOS et al, 2003).

As enzimas termoestáveis já têm sido usadas como ferramenta para a Biologia Molecular (Taq polimerase), como aditivo de detergentes e sabões (lipases, proteases e celulases), na indústria alimentícia, na produção de ração animal e recentemente estão surgindo como alternativas de interesse em outros bioprocessos, como o de síntese orgânica (lipases, proteases, oxidorreduções), no setor de diagnóstico clínico, no tratamento de resíduos e outra gama de possibilidades de aplicação industrial (COLOMBATTO et al, 2004; PHUTELA et al, 2005).

Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise. A maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das proteínas termoestáveis (LEMOS et al, 2003). Seguindo esta linha de raciocínio, o presente trabalho busca isolar e selecionar em um ambiente de temperaturas elevadas linhagens bacterianas produtoras de lipases termoestáveis.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Isolar e selecionar bactérias produtoras de lipases a partir de amostras de água provenientes de águas termais em Mossoró - RN.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar bactérias a partir das amostras coletadas, por meio de enriquecimento com fonte de carbono;
- Selecionar as linhagens mais promissoras para a produção de lipase;
- Quantificar a atividade lipolítica das bactérias selecionadas.

## 5. REFERÊNCIAS

1. ANDREWES, P.; BALDWIN, A.; BROOME, A.; HILL, B.; HOLLAND, R.; MILLS, O.; NEWSTEAD, D. Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate. **International Dairy Journal**. v. 17. pp. 587–595, 2007.
2. ADAN, Aysun. **Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase**. 2009. 65. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) - School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology. İZMİR. 2009.
3. BELL, P. J. L. et al. Prospecting for novel lipase genes using PCR. **Microbiology**. v. 148. pp. 2283–2291, 2002.
4. BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26. PP. 73-81, 2002.
5. CBNA – Colégio Brasileiro de Nutrição Animal (I Congresso sobre aditivos na alimentação animal – Enzimas). Disponível em: < <http://www.cbna.com.br>>. Acesso em: 03 de Dezembro de 2015.
6. CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**. v. 13. pp. 255–275, 2003.

7. CHEN, P. T.; CHEN, Y.; LIN, Y.; SU, H. Strategy for efficient production of recombinant *Staphylococcus epidermidis* lipase in *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 103, pp. 152–157, 2015.
8. COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H. WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**. v .13. pp. 841–866, 2003.
9. COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K., PHIPPS, R.H., OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Anim. Feed Sci. Technol.**v.111. pp.111–128 (a), 2004.
10. COMPANIES AND MARKETS. Disponível em <<http://companiesandmarkets.weebly.com/>> Acesso em: 02 de novembro de 2014.
11. CORREIA, V. A. B. **Seleção e caracterização molecular de uma lipase do metagenoma de solo do cerrado**. 2010. 49. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília. Brasília. 2010.
12. COUTO, G. H. **Caracterização de uma nova lipase isolada de uma biblioteca metagenômica do solo de mangue do Pontal do Sul – PR**. 2009. 97. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.
13. DANTHINE, S.; BLECKER, C. Interactions of lipases with milk fat globule membrane monolayers using a Langmuir film balance. **International Dairy Journal**. v. 35. pp. 81-87, 2014.
14. DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacea* LTEB11**. Departamento de Química- Área de

- concentração em Química Orgânica. Universidade Federal do Pará. Dissertação (Mestrado), Curitiba, 2007.
15. FAN, Z.; YUE, C.; TANG, Y.; ZHANG, Y. Cloning, sequence analysis and expression of bacterial lipase-coding DNA fragments from environment in *Escherichia coli*. **Molecular Biology Reports**. v. 36 (6). pp. 1515-1519, 2008.
  16. FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**. v. 29. pp. 632–644, 2011.
  17. FREEDONIA GROUP – World Enzymes. Disponível em <<http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html> - 01/2014>. Acesso em: 03 de Dezembro de 2015.
  18. GARCIA, E. R. M.; MURAKAMI, A. E.; BRANCO, A. F.; FURLAN, A. C.; MOREIRA, I. Efeito da Suplementação Enzimática em Rações com Farelo de Soja e Soja Integral Extrusada sobre a Digestibilidade de Nutrientes, o Fluxo de Nutrientes na Digesta Ileal e o Desempenho de Frangos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, n. 5, pp. 1414-1426, 2000.
  19. GERITS, L. R.; PAREYT, B.; MASURE, H. G.; DELCOUR, J. A. A lipase based approach to understand the role of wheat endogenous lipids in bread crumb firmness evolution during storage. **LWT - Food Science and Technology**. v. 64. pp. 874-880, 2015.
  20. GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**. vol.30 no.1, 2007.

21. HAKI, G.D.; RAKSHIT S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour Technol.** v.89. n.1.pp.17-34, 2003.
22. HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 39. pp. 235–251, 2006.
23. HERNÁNDEZ, I. et al. Assessment of industrial lipases for flavour development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 36. pp. 870–879, 2005.
24. HOLMES, S. R.; VANDEBERG, J. L.; COX, L. A. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: A key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D,** v. 6, pp. 224–234, 2011.
25. JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial Lipases. **FEMS Microbiology Reviews.** v. 15. pp. 29-63, 1994.
26. LAZNIEWSKI, M.; STECZKIEWICZ, K.; KNIZEWSKI, L.; WAWER, I.; GINALSKI, K. Novel transmembrane lipases of alpha/beta hydrolase fold. **FEBS Letters.** v. 585, pp. 870–874, 2011.
27. LEMOS, C. M. Y., FUCHS, E., GOMES, E., SILVA, R. da. **Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ed.31 jul./dez. 2003.
28. LIU, Z. Q.; ZHENG, X. B.; ZHANG, S. P.; ZHENG, Y. G. Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. **Microbiological Research.** v. 167. pp. 452– 460, 2012.

29. LOTTI, M.; PLEISS, J.; VALERO, F.; FERRER, P. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. **Biotechnology Journal**. v. 10. pp. 22–30, 2015.
30. MADIGAN M.T.; OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Curr Opin Microbiol**. v.2.n.3.pp.265-9, 1999.
31. MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**. v.3. n.5. pp. 9-23, 2009.
32. MUSSATTO, I. S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**. v. 41. n. 242. pp. 27-33, 2007.
33. NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; FILHO, M. P.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas e exógenas n alimentação de juvenis de tabaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasilica**. v.41, n.1, p.139-143, 2006.
34. PHUTELA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S.; CHADHA, B.S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing organge peels. **Braz. J. Microbiol**. v.36, pp. 63-69, 2005.
35. QUILLES, J. C. J. et al. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, pp. 274–280, 2015.
36. REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, pp. 237–250, 2009.
37. RIBAS, R. K. C. **Produção e caracterização de uma lipase alcalina secretada por um isolado de *Candida parapsilosis***. 2012. 93. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

38. ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**. v. 82. pp. 1023–1032, 2000.
39. ROSENSTEIN, R; GÖTZ, F. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**, v. 82, pp. 1005–1014, 2000.
40. SCHRAG, J.D. et al. The open conformation of a *Pseudomonas lipase*. **Structure**. v. 5. pp. 187-202, 1997.
41. SAMUELSEN, T.; ISAKSEN, M.; McLEAN, E.; Influence of dietary recombinant microbial lipase on performance and quality characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**. v. 194. pp. 161–171, 2001.
42. SVENSSON, I.; HERNÁNDEZ, I.; VIRTO, M.; RENOBALLES, M. Determination of lipase activity in cheese using trivalerin as substrate. **International Dairy Journal**. v. 16. pp. 423–430, 2006.
43. SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 39. n.5. pp. 977-983, 2010.
44. TANG, L.; SU, M.; YAN, J.; XIE, S.; ZHANG, W. Lid hinge region of *Penicillium expansum* lipase affects enzyme activity and interfacial activation. **Process Biochemistry**. v. 50. pp. 1218–1223, 2015.
45. WILLERDING, A. L.; CARVALHO NETO, F. G. M. R.; GAMA, A. M.; CARIOCA, C. R. F. Hydrolytic activity of bacterial lipases in amazonian vegetable oils. **Química Nova**. v. 35. n. 9. pp. 1782-1786, 2012.

46. YILMAZ, G.; AYAR, A.; AKIN, N. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. **Journal of Food Engineering**. v. 69. pp. 269–274, 2005.
47. ZAMINI, A.; KANANI, H. G.; ESMACILI, A.; RAMEZANI, S.; ZORIEZAHRA, S. J. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). **Comparative Clinical Pathology**. v. 23. pp. 187-192, 2014.
48. ZHA, D.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; XU, L.; YAN, Y. N-terminal transmembrane domain of lipase LipA from *Pseudomonas protegens* Pf-5: A must for its efficient folding into an active conformation. **Biochimie**. v. 105. pp. 165-171, 2014.
49. ZHAO, L. L.; CHEN, X. X.; XU, J. H. Strain improvement of *Serratia marcescens* ECU1010 and medium cost reduction for economic production of lipase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 26, p. 537-543, 2010.

**CAPÍTULO II: SCREENING OF THERMOSTABLE BACTERIAL LIPASE  
PRODUCTION FROM MOSSORÓ, RN, BRAZIL**

Trabalho a ser submetido à Revista:

Journal of Applied Microbiology

Página eletrônica:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2672](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2672)

ISSN: 1365-2672

1

2

1            Screening of thermostable bacterial lipase production from Mossoró, RN, Brazil

2

3    Carla Michele Pereira de Souza<sup>1,2</sup>, Luiz Augusto Vieira Cordeiro<sup>1,3</sup>, Fernanda Matias<sup>2\*</sup>

4    1 Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, Programa de Pós-  
5    Graduação em Produção Animal. Av. Francisco Mota, 572, Costa e Silva, Mossoró-Rio Grande do  
6    Norte, Brazil, 59.625-900. Phone number: 55 84 3317-8200.

7

8    2 Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, Laboratório de  
9    Nanobiotecnologia, Biorreatores e Inovação. Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva, Mossoró, Rio  
10   Grande do Norte, Brazil, 59625-900. Phone number: 55 84 33178382

11

12   3 Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, Laboratório de  
13   Biologia Molecular e Reprodução. Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva, Mossoró, Rio Grande do  
14   Norte, Brazil, 59625-900. Phone number: 55 84 3317-8200

15

16   \*Author for correspondence: Tel.: 55 84 33178382, E-mail: fernandamatias@ufersa.edu.br (Matias,  
17   F); carlampsbio@gmail.com (Souza, C. M. P.)

18

19   Research developed at: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências  
20   Animais, Laboratório de Nanobiotecnologia, Biorreatores e Inovação. Av. Francisco Mota, 572 -  
21   Costa e Silva, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil, 59625-900.

22

1    **ABSTRACT**

2       The search for industrial microbial enzymes having activity in different temperature  
3       conditions has been increasing due to the advantages that they offer over the chemical  
4       catalysts used in these processes. The growing interest in the production of lipases is related  
5       to the great biotechnological potential of these enzymes present. In this work, it was isolated  
6       bacterial strains of thermal waters of the leisure area to select the most promising strains for  
7       lipase production. These bacteria have been chosen using qualitative and quantitative lipase  
8       activity tests in which were selected 17 positive strains and nine among them stood out as  
9       the most active at temperatures of 40, 50, 60 and 70 ° C, with higher levels of activity when  
10      compared to work above. The results reflect the relevance of the potential of the strains  
11      analyzed as lipase producing bacteria, where the enzyme is more efficient at higher  
12      temperatures, an important feature among enzymes for industrial and biotechnological  
13      interest.

14      **KEYWORDS:** lipase, lipids, enzymes, bacteria, thermostable, alkaline.

15

16

17

18

19

## 1 INTRODUCTION

2           The industrial interest in biomolecules from thermophilic microbes has increased over  
3 the years because many industrial processes involve the use of higher temperatures. These  
4 processes promote the solubility of substrates and products and increase reaction rates by  
5 reduction of viscosity and the increase of substrates coefficient diffusion (Haki and Rakshit,  
6 2003). Thermophilic and Mesophilic microorganisms can produce thermostable enzymes.  
7 Among these enzymes, thermophilic lipases are ideal for catalysis of industrial processes  
8 because they have intrinsic properties that confer to them high stability and activity at high  
9 temperatures, denaturing agents and extreme pH values (Gomes *et al.*, 2007).

10           The thermophilic lipases are enzymes widely used in industrial processes to enhance the  
11 flavor of dairy products, especially cheese, remaining active even after milk pasteurization  
12 process (Deeth, 2006; Hernández *et al.*, 2005). Besides the extensive use of lipases in the  
13 production of foods, detergents, paper, among others, these enzymes can also be used as a food  
14 supplement in the diet of animals such as pigs and poultry which have an immature or defective  
15 digestive system in the metabolism of fat (Campestrini *et al.*, 2005). Another area of application  
16 of these enzymes is in biodiesel production sector, being responsible for the transesterification  
17 of vegetable oils and short chain alcohols (Canakci, 2007).

18           The anaerobic digestion reactor operation is a technique commonly used by industry in  
19 the treatment of effluents. However, when it comes to wastewater containing high levels of oils  
20 and fats, such as those from industries related to animal products, this method ends up not being  
21 satisfactory. In such wastewater treatment, there is sludge and foaming formation by layers of  
22 lipids and biomass drag, causing wear or even the collapse of the reactor (Mendes and Castro,  
23 2005). The application of a pre-treatment to hydrolyze and dissolve the lipids promotes the  
24 biological degradation of waste waters and accelerates the process, improving the efficiency of  
25 time (Cammarota and Freire, 2006). Addition of lipases in the treatment of these effluents  
26 allows a reduction in suspended solids levels (lipids), unblocking the pipes of the reactors by the  
27 degradation of oil film, increasing the useful life of the equipment and further reduces the

1 impact generated in the water by organic and chemical waste (Mendes and Castro, 2005).  
2 Lipases have been used in cleaning equipment for removing fats found in aerators treatment  
3 plants that employ activated sludge and wastewater treatment plants (Camarotta and Freire,  
4 2006; Robles *et al.*, 2002; Masse *et al.*, 2001).

5 Despite the lipases production market is one of those that exhibit rapid growth in the  
6 industrial sector enzymes; their use at industrial scale is still scarce. Therefore, it is necessary to  
7 select microorganisms that have high production rates of lipolytic enzymes to reduce costs,  
8 increase productivity and get specific enzymes for different substrates (Shu, 2006; Paques,  
9 2006). Thus, the thermal waters in the municipality of Mossoró (Figure 1) were the object of  
10 this study aimed to isolate and select lipolytic bacteria in the recreational water.

11

## 12 METHODOLOGY

13

### 14 1.1. Collection and Enrichment

15

16 Water samples from the Thermas Hotel, Mossoró, RN, Brazil, were collected in three  
17 different environments. Two with high ambient temperatures and one in source of organic  
18 matter: Sample 1 was obtained directly from the source used to fill the pools (58 °C); Sample 2  
19 was collected from the pool (42 °C) in a previous day cleaning days (seven days in the pool).  
20 Sample 3 was collected from a river (30 °C ± 2) through the facilities of the leisure area of the  
21 hotel, where they have dumped the waters of the thermal pools in the day cleaning. The  
22 bacterial enrichment process was conducted using two different methods: (a) Minimum Medium  
23 described by Sugimori *et al.* (2002); (B) Peptone Water (HiMedia) and (C) in distilled water,  
24 without enrichment. For this, 10ml of the samples were transferred to aseptic glass jars,  
25 containing 50 ml of their respective media and 5 ml of commercial soybean oil. The flasks were  
26 incubated in a shaker for 48 hours at 120 rpm and 30 ° C, adapted methodology from Haba *et al.*  
27 (2000), Mongogkolthanarukw and Dharmstithi (2002). The inoculum of water samples in their  
28 enrichment media was carried out at the site of collection and the laboratory. The local

1 sterilization was performed by heating the opening of the bottles containing the enrichment  
2 medium for the inoculum. Another part of the samples was transported in falcon tubes in  
3 coolers with ice to the laboratory where they were inoculated in the enrichment medium within  
4 the flow. Part of the samples taken directly to the laboratory was inoculated in a solid medium  
5 without passing by enrichment step.

## 6 1.2. Bacterial isolation

7

8 To assure a greater diversity of bacteria isolated three cultivation media were used: (I)  
9 Minimum Medium as described above with agar (15 g /L) and nystatin (1mL/L); (Sugimori *et*  
10 *al.*, 2002) (II) Basal Medium Mineral Salts (Shirling and Gottlieb, 1966); and (III) Medium  
11 Casein (Shirling and Gottlieb, 1966). After the incubation period, 100 uL of the samples  
12 obtained were subcultured in the enrichment means. The Petri dishes were incubated at 37 °C  
13 for 48 h.

### 14 Selection of lipolytic bacteria

15 For the selection of bacteria having lipase activity was used the test cultivation on  
16 medium containing Rhodamine (Haba *et al.*, 2000). Briefly, strains were inoculated in Minimal  
17 Solid Culture containing Rhodamine B solution (0.01%), soybean oil (2%) and Triton X-100  
18 (1%). Samples were incubated at 30 °C and 40 °C for 24-48 h. After that, plates were observed  
19 under 365 nm UV light. The presence of fluorescence halo indicated the positive colonies for  
20 the production of lipases. Selected strains were characterized by Gram staining.

21

### 22 Effect of temperature and pH on enzyme activity

23 The p-nitrophenyl palmitate test was used to evaluate the influence of temperature and  
24 pH on lipase production (Winkler and Stuckmann, 1979; Krieger, 1995). Samples were  
25 resuspended in 200 uL of distilled water and inoculated in inductor medium (100 µL/100 mL)  
26 containing: soy oil (2%), peptone (0,5%), magnesium sulfate (0,01%) and potassium phosphate  
27 (0,1%). The cultivation was performed under 200 rpm shaking, 30 °C and 37 °C for 60 hours.

1 Every 12 hour a sample of each strain was taken for cellular quantification at spectrophotometer  
2 (600 nm) and centrifuged (30 min/4000 rpm/10 °C). The supernatant was added to the buffer  
3 solution Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (0,11% Arabic gum, 0,44% Triton x-100) in a proportion of  
4 1:9 and 10 % (v/v) p-nitrophenyl palmitate solution (pNPP) (3 mg of pNPP/mL in 2-propanol).  
5 The reaction was conducted for 1 hour at temperatures from 30 to 90 °C with  
6 spectrophotometric reading at 410 nm.

7 A cultivation at 30 ° C, 60 h, was made to analyze the effect of pH (4.0; 6.0; 8.0; 10.0  
8 and 12.0) on lipase activity. The pNPP test was conducted for 1 hour at 40 ° C, with sampling  
9 each 12 hours (Zhu *et al.*, 2015).

10

11

12

13

14

## 1 RESULTS

### 2 Bacterial isolation

3 The inoculum of water samples in their enrichment media was made at the site of  
4 collection and laboratory. As observed, there is a minimal influence on the growth of  
5 microorganisms between the two types of inocula. Of the 51 isolates obtained, 28 were  
6 inoculated at the site of collection and 23 at the laboratory. Regarding enrichment, 11 strains  
7 were obtained after enrichment with Minimal Medium, 15 with peptone water, 11 maintained at  
8 distilled water, and 14 did not pass through enrichment phase to observe the influence of  
9 enrichment growth of microorganisms. The peptone water appeared to be the most efficient  
10 medium of enrichment followed by no enrichment phase. The isolates that did not pass the  
11 enrichment phase came from the samples of the pool and river. The growth time was on the  
12 solid medium from 48 hours to 10 days. The Basal Medium had faster results than the other two  
13 media. The Minimal Medium used in solid cultivation showed only one isolated, Basal Medium  
14 24 isolates, and the Casein Medium 26 isolates.

15

### 16 Rhodamine B test

17 Plates were done in duplicate, one being incubated at 40 °C and another at 30 °C to  
18 observe the influence of temperature on lipase activity on solid medium. The strains grew after  
19 24 to 48 hours of incubation. In the Basal Medium plates, there was no influence of incubation  
20 temperatures. Among Casein Medium plates, the one that was incubated at 30 °C presented  
21 seven positive results, and one, which was incubated at 40 °C showed only two positive results;  
22 both listed on the plate cultivated at 30 °C (Figure 2). Overall, seventeen strains showed a  
23 positive result being ten strains isolated in Basal Medium and seven strains isolated in Casein  
24 Medium. The Minimal Medium isolated strain did not show any positive results. On the place of  
25 isolation, two strains were isolated from the source (Sample 1), seven from the pool (Sample 2)  
26 and eight from the river (Sample 3).

1           Concerning the place where was performed the inoculum in the enrichment medium,  
2 among the 17 selected by Rhodamine B method, six strains were inoculated in the laboratory,  
3 eight in the collection site and three did not pass the enrichment step. Selected strains were,  
4 mostly, Gram-positives, resulting a total of 12 strains (6, 7, 19, 20, 21, 24, 27, 33, 34, 47, 48,  
5 49) and five Gram-negatives (10, 23, 42, 43, 50).

6

7           Temperature and pH effect on enzymatic activity

8           Firstly the cultivation of the strains was performed at 30 ° C, in which have excelled  
9 nine strains that produced the highest amount of lipase. From these four (23, 34, 43 and 50)  
10 showed better results at 30 ° C with maximum lipase production, and five (19, 24, 27, 42 and  
11 48) at 50 ° C (Figure 3), whereas above 70 ° C the enzymatic activity decreases (Figure 4). The  
12 enzymatic production peak occurred at 48 hours in almost all temperatures. The best bacterial  
13 growth happened at 30 °C except 23 and 27 strains that showed better bacterial growth at 37 °C  
14 (Figure 5). At 37 °C, from the nine selected strains, two (42 e 43) showed better enzymatic  
15 activity at 40 °C, one (50) showed better enzymatic activity at 50 °C and six (19, 23, 24, 27,  
16 34 e 48) showed better enzymatic activity at 70 °C (Figures 6, 7),

17           The higher enzyme activity levels were found in the basic pH reactions, in particular between 10  
18 and 12 (Figure 8), indicating that these enzymes are more active at higher pH conditions. The  
19 lipases of isolates 42, 43, 48, 19, 50, 27 and 34 showed maximal activity at pH 12.0, whereas  
20 isolates 23:24 were better at pH 10.0. With the decrease of pH values from 6.0 to 4.0, there is a  
21 considerable reduction (about 50% compared to the optimal pH) of enzyme activity.

22

23

24

## 1 DISCUSSION

2           The isolates that were not enriched were from the samples of the pool and the river that  
3 contained more organic matter which provided these microorganisms enough carbon sources for  
4 growth, not requiring the enrichment phase. Most bacterial genera found in pools have lipolytic  
5 potential (Bonatto and Gelinsk, 2010), this fact can be explained due to the high content of  
6 organic matter rich in fat found in these waters after some days of use. Many are  
7 microorganisms found such as *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Staphylococcus* and  
8 *Candida* (Falcão, 1993; Ibarluzea *et al.*, 1998; Papadopoulou *et al.*, 2008). A total of nine  
9 strains were inoculated into the laboratory and eight in the collection site which indicates that  
10 these differences in handling and transport did not affect in the isolation of microorganisms. The  
11 evaluation of enrichment influence for the selection of lipolytic bacteria was done by comparing  
12 samples incubated in Minimal Medium, peptone water, and distilled water. Of these, six were  
13 incubated in Minimal Medium, five in peptone water and three in distilled water. The presence  
14 of a substrate for maintenance of viable cells in the Minimum Medium and peptone water  
15 resulted in a difference of 50% regarding the ideal medium for lipolytic bacteria selection. The  
16 Minimal Medium was the only medium of the three used in this work which utilizes soybean oil  
17 as a carbon source. Despite this medium have been identified as the more efficient in the  
18 isolation of bacteria of the genus *Bacillus* and recommended for bacteria with lipolytic activity  
19 (Sugimori *et al.*, 2002) it was demonstrated as the less efficient the isolation of bacteria.  
20 However, the absence of glucose in Minimal Medium composition may explain the lower  
21 number of strains isolated since the microorganisms use glucose for the synthesis of metabolic  
22 intermediates required for their growth and multiplication (Nelson and Cox, 2006). Some  
23 studies show the positive influence of glucose in the growth of bacterial strains (Sharma *et al.*,  
24 2001; Dahiya and Purkayastha, 2011).

25           The sensitivity, speed, and simplicity of Rhodamine B test for screening lipolytic  
26 bacteria were the primary reasons for its use in this study. In a study conducted in several genera  
27 of bacteria (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Serratia*) the response to  
28 the test Rhodamine B varied from 24 and 72 hours at 30 °C (Haba *et al.*, 2000). From isolated

1 strains obtained by Barros (2013) none showed a positive result in Rhodamine B test. Other  
2 works reached an average of 31 % of isolated strains with lipolytic activity (Sacco, 2013; Baldo  
3 *et al.*, 2013). Strains isolated in this work showed 34% of isolated strains with lipolytic activity  
4 (17 strains).

5 Much of the lipolytic bacteria found in nature are Gram-negative, among them are the  
6 genera *Pseudomonas e Burkholderia* (Jaeger and Reetz, 1998; Kanwar and Goswami, 2002).  
7 However, some species of the genera *Bacillus e Staphylococcus* are Gram-positive and also  
8 exhibit lipolytic activity notwithstanding lower levels than those Gram-positive strains  
9 (Rosenau and Jaeger, 2000). In the present study, most of the bacterial strains that have obtained  
10 positive result in the Rhodamine B test were Gram-positive and in pNPP test best results were  
11 obtained from Gram-positive as well.

12 To evaluate the enzyme activity were performed three trials: the first with the 17 strains  
13 selected in Rhodamine B test at 30 °C for a new selection of strains, the next two with nine  
14 strains selected at 37 °C and 30 °C respectively. The first experiment showed that after 60 hours  
15 of cultivation there was no significant enzyme production, so the time was reduced. Considering  
16 that most of the strains selected in the first test achieved great results at 50 °C (highest  
17 temperature tested), the second experiment was conducted at higher temperatures of enzymatic  
18 activation (40 °C to 70 °C). When comparing to the number of cells (bacterial growth), it could  
19 be observed that cell multiplication has begun after lipase production peak. Lipase helps the  
20 microorganisms in the breakdown of fat to be absorbed as an energy source, which leads to cell  
21 proliferation after production and release of the enzyme (Messias *et al.*, 2011). Comparing the  
22 cultivation at 30 °C and 37 °C were observed changes in growth (Figure 5) and enzyme  
23 production (Figure 6) in which it is evident that most of the strains grow better at 30 °C.

24 Strains that have the best enzyme activity levels were from the river into which thermal  
25 pools flow in the days of cleaning. Given the permanence of the water for about seven days  
26 (interval time between cleaning) at higher temperatures microorganisms tend to develop the  
27 capacity of enzymes production resistant to these temperature levels. When the water is  
28 discharged into the river that features an environment with better organic conditions and

1 temperature, these microorganisms initiate the exponential growth phase. However, because the  
2 oil density is lower than the water, the lipid layer of the river is on its surface receiving higher  
3 sunlight when compared to the river bottom. The produced lipolytic enzymes and resistant to  
4 high temperatures have better activities at higher temperatures, thereby degrading the superficial  
5 lipid layer of the river making the products be absorbed as nutrients for microorganisms.

6 In cultivation at 37 °C, enzyme activity at 40 °C, the strains that showed greater activity  
7 for lipase were 43 and 48, both coming from the sample 3, i.e., the river that runs through the  
8 recreation area, were inoculated in the enrichment medium in the laboratory and cultured in  
9 Casein Medium. The peak enzymatic production of strain 43 (411.93 U/mL) happened in 48 h  
10 of cultivation, and strain 48 (710.39 U/mL) showed the best production after 36 h of cultivation.  
11 In a study of 53 strains selected with the pNPP test, the enzymatic activity highest level was  
12 163.31 U/mL at 37 °C for 60 minutes (Rasol, 2014). All experiments were conducted at this  
13 same period, 60 minutes, indicating the highest level of enzyme production and activation in  
14 this study. Strain 48 showed best production at 50 °C (489.77 U/mL), 60 °C (890.59 U/mL) e  
15 70 °C, (1,315.63 u/mL) all after 48h of cultivation. Strain 48 showed highest levels of  
16 enzymatic activity, followed by strain 43 in exception of activation at 70 °C, in which strain 34  
17 (395.22 U/mL) showed the highest level than 43 (376.88 U/mL). A *Microbacterium sp.* strain  
18 showed better enzymatic activity at pH 8,0 and 50 °C (355 U/mL) while *Bacillus*  
19 *thermoleovorans* showed best results at 65 °C. (Tripathi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2001). Most of  
20 the strains studied here showed higher enzymatic activity than those from works using  
21 bacteria. Fungal activity seems to be higher them bacteria reaching values above 1000  
22 U/mL (Koblitz and Pastore, 2006; Fickers *et al.*, 2003). However strain 48 was able to reach  
23 this value when cultivated at 37 °C. Enzymatic production and thermostability were better at 37  
24 °C of cultivation, but strains showed better grow rate at 30 °C.

25 Lipolytic activities were higher in pH 10.0 and 12.0, which shows an alkaline  
26 nature of the enzyme. Saun *et al.* (2014) asserted that greater share of lipases produced

1 by microorganisms is active at alkaline pH (pH 7.0-11.0), and several alkaline lipases  
2 have been reported in the literature. Lipase of *Bacillus thermocatenuatus* expressed in  
3 *Escherichia coli*, showed maximum activity at pH 8.0 – 9.0 stability until pH 11.0  
4 (Schmidt-Dannert *et al.*, 1996). *Bacillus coagulans* BTS-3 showed lipase activity better  
5 in pH 8.5 and stability between pH 8.0 to 10.5 (KUMAR *et al.*, 2005). A  
6 *Staphylococcus aureus* strain was studied by Horchani *et al.* (2009) to produce a lipase  
7 active in pH 8.0 – 10.0. Unlike lipases of this work, some may have optimum activity at  
8 neutral or acid pH (Li and Zhang, 2005; Boutaiba *et al.*; 2006; Lima *et al.*, 2004)

9         According to Burg (2003), enzymes from microorganisms which survive in  
10 alkaline environments can be useful for processes where reaction conditions require  
11 alkalinity because they tend to be adapted to high pH levels. The thermal waters of  
12 Mossoró/RN come from groundwater in the Potiguar Basin. These waters are  
13 bicarbonate/calcic (Silva *et al.*, 2010) and exhibit a high amount of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{HCO}_3^-$   
14 (Medeiros *et al.*, 2003). Some local studies in Mossoró/RN with groundwater indicated  
15 neutral to alkaline pH from 6.5-8.5 (Vasconcelos, 2013). Therefore, the above  
16 information strongly relates to the identification of alkaline lipases produced by  
17 microorganisms isolated from Mossoró/RN groundwater.

18

## 19         CONCLUSIONS

20 Isolation at the site or in the laboratory did not affect the number of isolates. The  
21 Rhodamine B test selected 17 strains and PNPP reduced this number to nine strains. All  
22 selected strains showed the highest level of enzyme production. The optimum  
23 temperature for bacterial growth and lipase production for the majority of strains studied  
24 here is 30 °C. Only strain 48 showed the best enzyme production at 37 °C reaching  
25 levels above those reported for fungi. The lipolytic enzymes produced by these

1 microorganisms are resistant to higher temperatures (40 to 70 °C). Moreover, it presents  
2 excellent enzymatic activity in alkaline pH (10-12).

### 3 REFERENCES

- 4 1. Baldo, C., Baggio, L. M., Moreno, T. G., Magri, A., De Melo, M. C., Gasparin,  
5 F. G. M. and Celligoi, M. A. P. C. (2013) Study of Lipase Production by  
6 Isolated Bacteria Effluent Slaughterhouse Poultry. *Biochemistry and*  
7 *Biotechnology Reports* **2**, 347-350.
- 8 2. Barros, M. F., Massi, J. B., Gasparin, F. G. M. and Celligoi, M. A. P. C. (2013)  
9 Bioprospecting Bacteria for Bioremediation of Polluted Environment with Lipid  
10 waste. *Biochemistry and Biotechnology Reports* **2**, 249-252.
- 11 3. Bonatto, N. and Gelinski, J. M. L. N. (2010) Condições higiênico-sanitárias de  
12 piscinas em companhia hidromineral conforme análise de indicadores de  
13 contaminação fecal. *Revista Eletrônica de Biologia* **3**, 105-116.
- 14 4. Boutaïba S, Bhatnagar T, Hacene H, Mitchell DA, Baratti JC. (2006)  
15 Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic  
16 archaeon, Natronococcus sp. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **41**,  
17 21-26.
- 18 5. Burg, B. V. D. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current*  
19 *Opinion In Microbiology* **6**, 213-218.
- 20 6. Cammarota, M.C. and Freire, D.M.G. (2006) A review on hydrolytic enzymes in  
21 the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource*  
22 *Technology* **97**, 2195-2210.
- 23 7. Campestrini, E., Da Silva, V. T. M. and Appelt, M. D. (2005) Utilização de  
24 enzimas na alimentação animal. *Nutritime* **2**, 259-272.

- 1 8. Canakci, M. (2007) The potential of restaurant waste lipids as biodiesel  
2 feedstocks. *Bioresource Technology* **98**, 183-190.
- 3 9. Dahiya, P. and Purkayastha, S. (2011) Isolation, screening and production of  
4 extracellular alkaline lipase from a newly isolated *Bacillus* sp. PD-12. *Journal of*  
5 *Biological Sciences* **11**, 381-387.
- 6 10. Deeth, H. C. (2006) Lipoprotein lipase and lipolysis in Milk. *International Dairy*  
7 *Journal* **16**, 555–562.
- 8 11. Falcão, D. P. et al. (1993) Microbiological quality of recreational waters in  
9 Araraquara, SP, Brazil. *The Science of the Total Environment* **128**, 37-49.
- 10 12. Fickers, P., Nicaud, J. M., Destain, J. and Thonart, P. (2003) Overproduction of  
11 lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Applied Microbiology Biotechnology* **63**,  
12 136-42.
- 13 13. Gomes, E. et al. (2007) Thermostable enzymes: sources, production and  
14 industrial application. *Química Nova* **30**,136-145.
- 15 14. Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M. and Manresa, A.  
16 (2000) Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as  
17 selective substrate. *Enzyme and microbial technology* **26**, 40-44.
- 18 15. Haki, G. D. and Rakshit, S. K. (2003) Developments in industrially important  
19 thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology* **89**, 17-34,.
- 20 16. Hernández, I. et al. (2005) Assessment of industrial lipases for flavour  
21 development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese. *Enzyme and*  
22 *Microbial Technology* **36**, 870–879.
- 23 17. Horchani, H. et al. (2009) Biochemical and molecular characterisation of a  
24 thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated

- 1           Staphylococcus aureus strain. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **56**,  
2           237-245.
- 3           18. Ibarluzea, J. et. al. (1998) Determinants of the microbiological water quality of  
4           indoor swimming-pools in relation to disinfection. *Water quality of indoor*  
5           *swimming-pools* **32**, 865-871.
- 6           19. Jaeger, K. E. and Reetz, M. T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for  
7           biotechnology. *Trends in Biotechnology* **16**, 396-403.
- 8           20. Kanwar, L. and Goswami, P. (2002) Isolation of a Pseudomonas lipase produced  
9           in purê hydrocarbon substrate and its applications in the synthesis of isoamyl  
10           acetate using membrane-immobilized lipase. *Enzyme and Microbial Technology*  
11           **31**, 727–735.
- 12           21. Koblitiz, M. G. B. and Pastore, G. M. (2006) Purification and Biochemical  
13           Characterization of an Extracellular Lipase Produced by a new strain of *Rhizopus*  
14           *sp.* *Ciência e Agrotecnologia* **30**, 494-502.
- 15           22. Krieger, N. (1995) Produção, purificação e caracterização de lipases de  
16           *Penicillium citrinum*. 260f. *Tese* (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor  
17           de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- 18           23. Kumar, S. et al. (2005) Production, purification, and characterization of lipase  
19           from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein*  
20           *Expression And Purification* **41**, 38-44.
- 21           24. Lee, D. W., Kim, H. K., Lee, K. W., Kim, B. C., Choe, A. C. and Lee, H. S.  
22           (2001) Purification and characterization of two distinct thermostable lipases  
23           from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1.  
24           *Enzyme Microb Tech.* **29**, 363–71.

- 1 25. Li, H., Zhang, X. (2005) Characterization of thermostable lipase from  
2 thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression And Purification* **42**,  
3 153-159.
- 4 26. Lima, V. M. G. et al. (2004) Evaluation of the potential for use in biocatalysis of  
5 a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal Of Molecular*  
6 *Catalysis B: Enzymatic* **31**, 53-61.
- 7 27. Masse, L., Kennedy, K. J. and Chou, S. (2001) Testing of alkaline and  
8 enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse  
9 wastewater. *Bioresour Technol.* **77**, 145-55.
- 10 28. Medeiros, J. F. et al. (2003) Caracterização das águas subterrâneas usadas para  
11 irrigação na área produtora de melão da Chapada do Apodi. *Revista Brasileira*  
12 *de Engenharia Agrícola e Ambiental* **7**, 469-472.
- 13 29. Mendes, A. A. and Castro, H. F. (2005) Aplicação de lipases no tratamento de  
14 águas residuárias com elevados teores de Lipídeos. *Química Nova* **28**, 296-305.
- 15 30. Messias, J. M., Costa, B. Z., Lima, V. M. G., Giese, E. C., Dekker, R. F. H. and  
16 Barbosa, A. M. (2011) Lipases microbianas: Produção, propriedades e  
17 aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas* **32**, 213-  
18 234.
- 19 31. Mongogkolthanaruk W. and Dharmsthiti S. Biodegradation of lipid-rich waster  
20 by a mixed bacterial consortium. (2002) *International Biodeterioration &*  
21 *Biodegradation* **50**, 101-105.
- 22 32. Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2012) Lehninger principles of biochemistry. **6<sup>a</sup>**  
23 **ed**, W. H. Freeman, 1202.
- 24 33. Papadopoulou, C. et. al. (2008) Microbiological quality of indoor and outdoor  
25 swimming pools in Greece: Investigation of the antibiotic resistance of the

- 1 bacterial isolates. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*  
2 **211**, 385–397.
- 3 34. Paques, F. W. and Macedo, G. A. Plant lípases from látex: properties and  
4 industrial applications. *Química Nova* **29**, 93-99.
- 5 35. Rasol, R., Rashidah, A. R., Siti Nur Nazuha, R., Smykla, J., Wan Maznah, W.  
6 O. and Alias, S. A. (2014) Psychrotrophic Lipase Producers from Arctic Soil  
7 and Sediment Samples. *Polish Journal of Microbiology* **63**, 75–82.
- 8 36. Robles, A., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Omar, N.B., Pérez, R. and  
9 Gálvez A. (2002) Characterization of laccase activity produced by the  
10 hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis paradoxa* CH32). *Enzyme Microb.*  
11 *Technol* **31**, 516-522.
- 12 37. Rousenau, F. and Jaeger, K. E. (2000) Bacterial lipases form *Pseudomonas*:  
13 Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**,  
14 1023-1032.
- 15 38. Sacco, L. P. Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em  
16 processos biotecnológicos. 2013. Dissertação (*Mestrado em Microbiologia*  
17 *Pecuária*). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. **48**.
- 18 39. Saun, N. K., Mehta, P. and Gupta, R. (2014) Purification and Physicochemical  
19 Properties of Lipase from Thermophilic *Bacillus aerius*. *Journal Of Oleo*  
20 *Science* **63**, 1261-1268.
- 21 40. Schmidt-Dannert, C. et al. (1996) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus*  
22 *thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and  
23 some properties. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Lipids And Lipid*  
24 *Metabolism* **1301**, 105-114.

- 1 41. Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, Y. C. (2001) Production, purification,  
2 characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **19**, 627-  
3 662.
- 4 42. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of  
5 *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **16**, 313-  
6 340.
- 7 43. Shu, C. H., Xu, C. J. and Lin, G. C. (2006) Purification and partial  
8 characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*,  
9 734–738.
- 10 44. Silva, C. M. S. V. et al. (2010) Caracterização Físico-Química Das Águas  
11 Subterrâneas Na Bacia Potiguar. In: *Congresso Brasileiro De Águas*  
12 *Subterrâneas, Anais São Luis: Abas* **16**, 1 - 16.
- 13 45. Sugimori, D., Nakamura, M. and Mihara Y. (2002) Microbial Degradation by  
14 *Acinetobacter sp.* Strain SOD-1. *Journal Bioscience, Biotechnology and*  
15 *Biochemistry* **66**, 1579-1582.
- 16 46. Tripathi, R., Singh, J., Bharti, R. K. and Thakur, S. (2014) Isolation, Purification  
17 and characterization of lipase from *Microbacterium sp.* and its application in  
18 biodiesel production. *Energy Procedia* **54**, 518 – 529.
- 19 47. Vasconcelos, N. S. et al. (2013) Qualidade das águas subterrâneas de área  
20 irrigada da comunidade de pau branco em Mossoró (RN). *Holos (Natal. Online)*  
21 **1**, 47-63.
- 22 48. Winkler, U. K. and Stuckmann, M. (1979) Glycogen, hyaluronate, and some  
23 other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia-*  
24 *marcescens*. *Journal of Bacteriology* **138**, 663-670.

1 49. Zhu, Y. et al. (2015) Molecular cloning and characterization of a new and highly  
2 thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6. *Journal Of Basic Microbiology*  
3 **55**, 1219-1231.

4

5

1

## ANEXO: FIGURAS E TABELAS

2



3

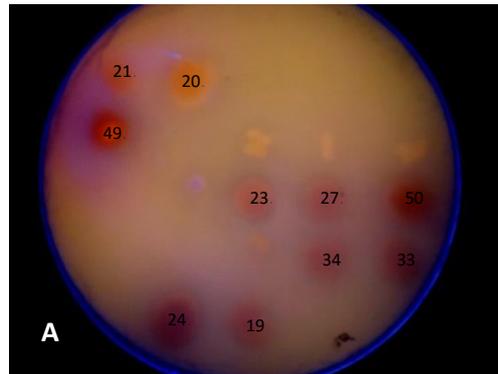
4 **Figure 1:** Localization of Mossoró/RN city. Source of image:

5 [http://www.achetudoeregiao.com.br/rn/RN.GIF/mossoro/loc\\_mapa.gif](http://www.achetudoeregiao.com.br/rn/RN.GIF/mossoro/loc_mapa.gif)

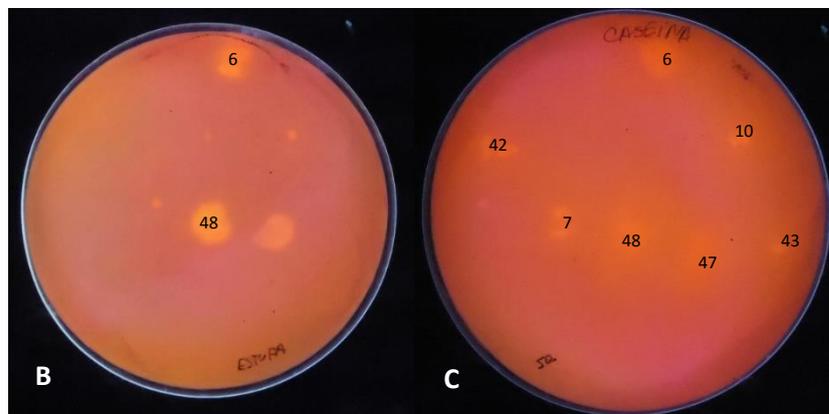
6

1

2



3



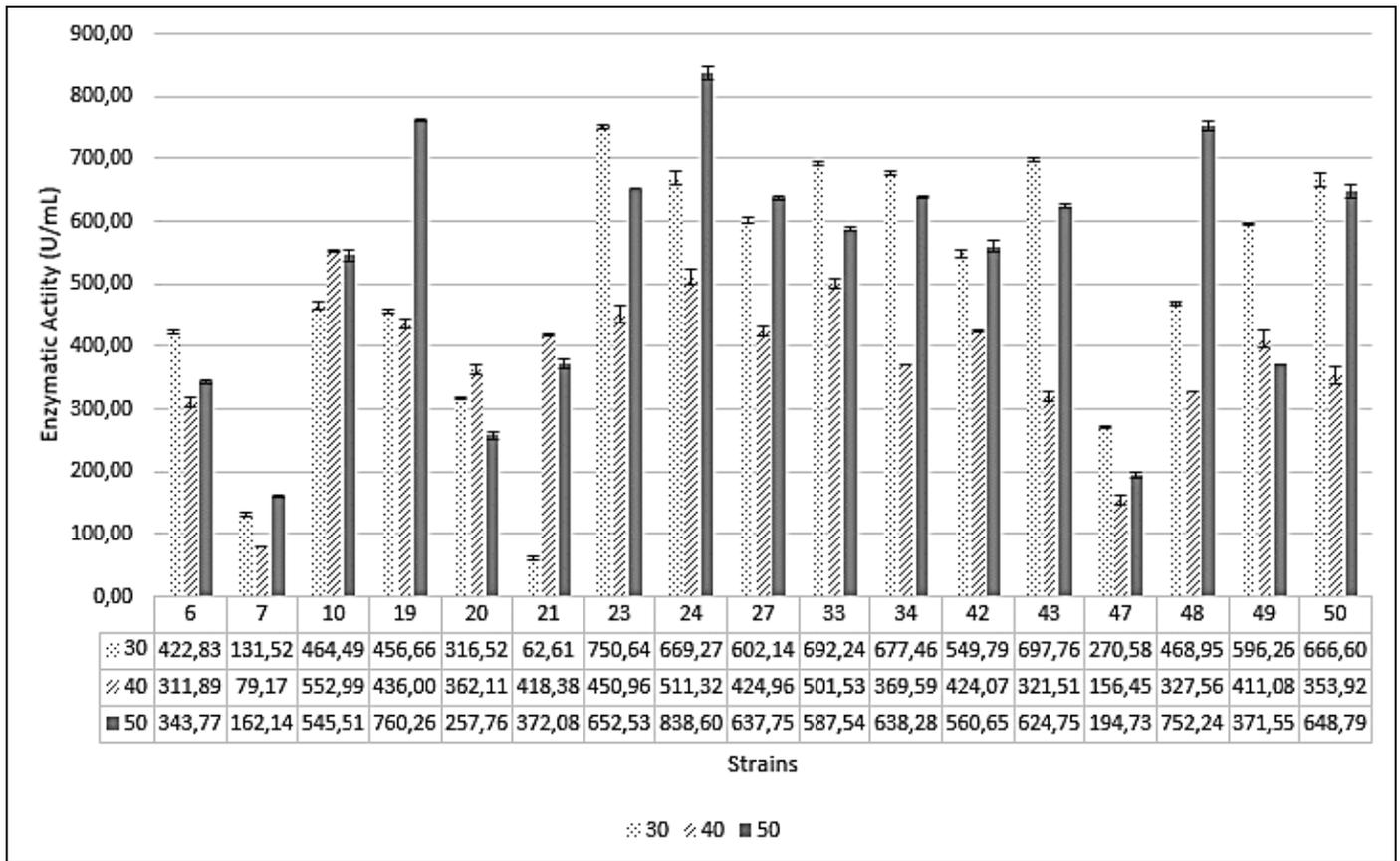
4

5 **Figure 2:** Rhodamine B test result. A. Rhodamine B test of Basal medium at 30 °C. B.

6 Rhodamine B test in casein medium at 40 °C. C. Rhodamine B test in casein medium at 30 °C.

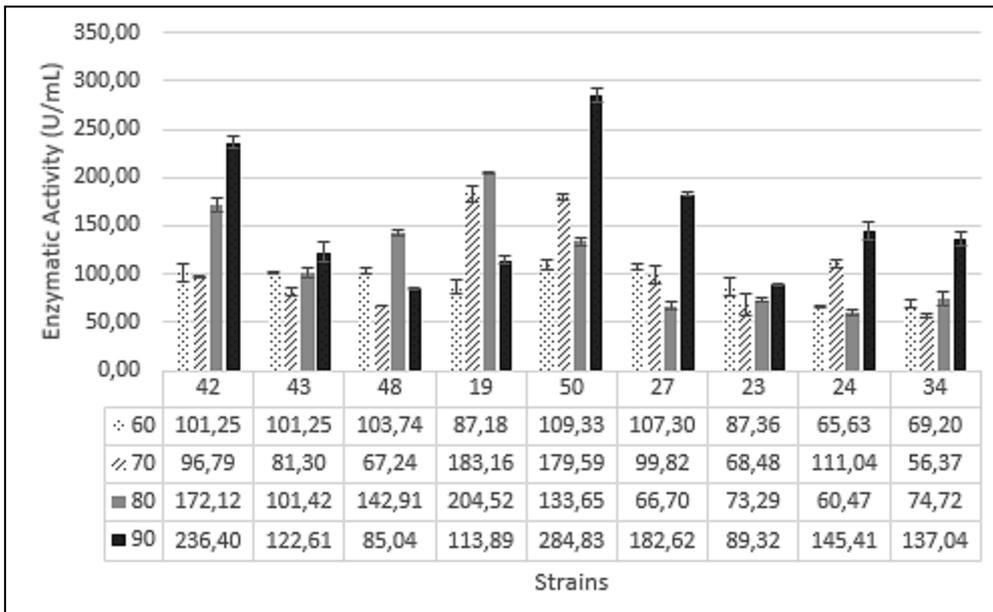
7

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8



9 **Figure 3:** Best enzymatic activity values (U/mL) obtained of strains cultivated at 30 °C, range of enzymatic activity test 30 °C to 50 °C.

10

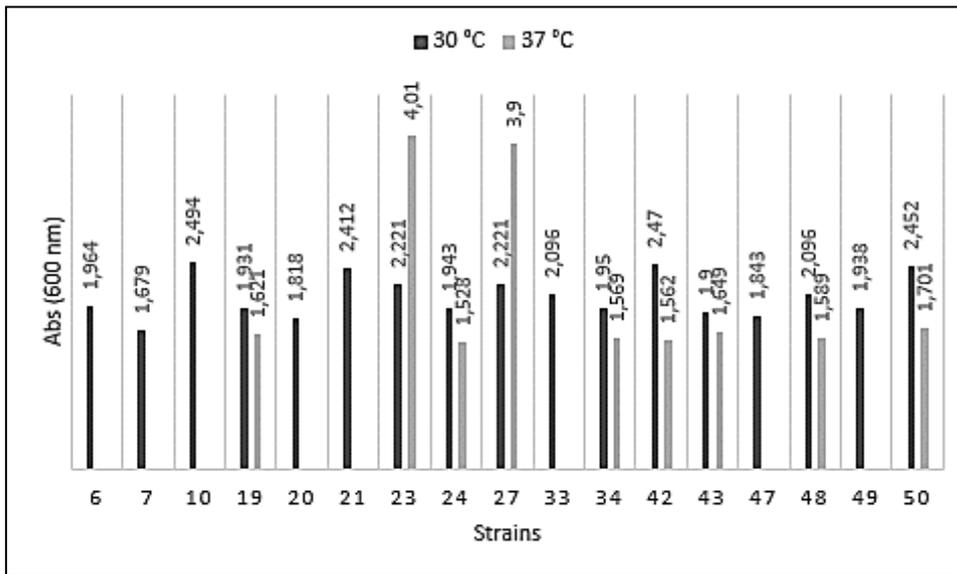


1

2 **Figure 4:** Best enzymatic activity values (U/mL) obtained of strains cultivated at 30 °C, range  
 3 of enzymatic activity test 60 °C to 90 °C.

4

1

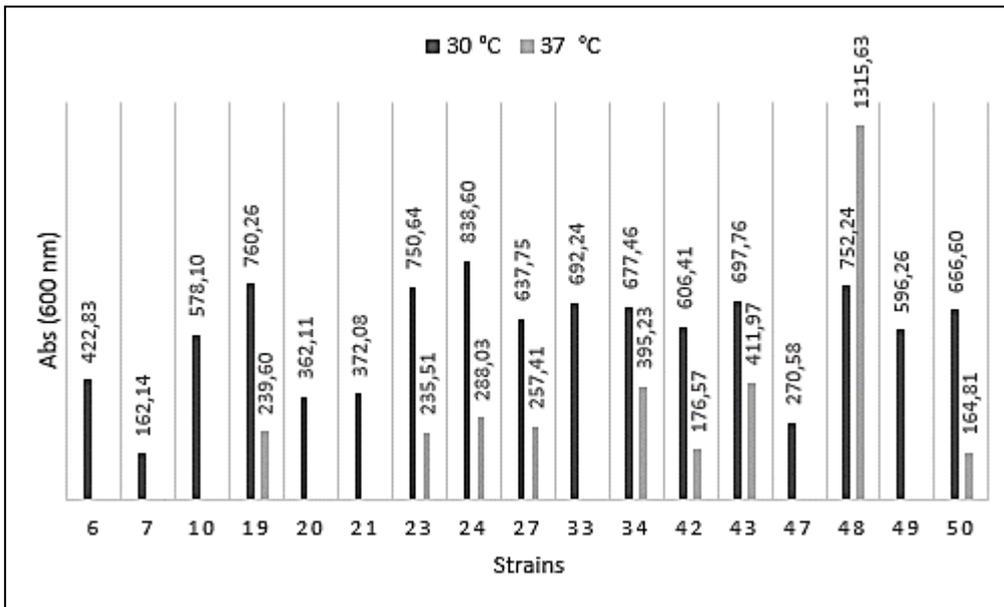


2

3 **Figure 5:** Comparison of bacterial growth at temperatures of 30 °C and 37 °C.

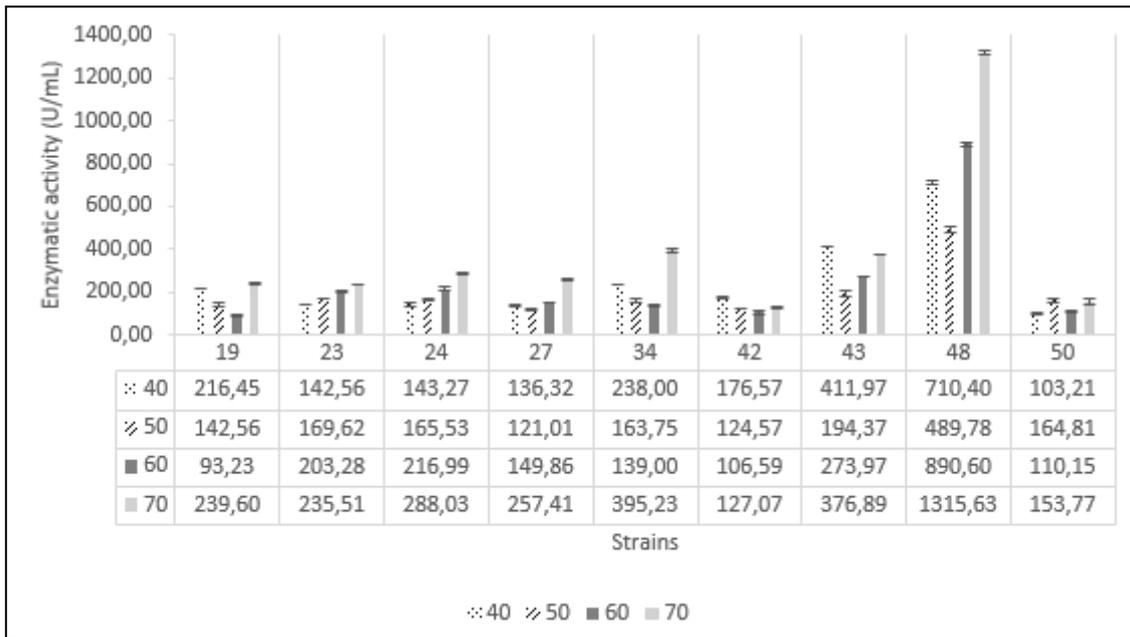
4

5



1

2 **Figure 6:** Differences of highest levels of enzymes production at different cultivation  
 3 temperatures, 30 °C and 37 °C.

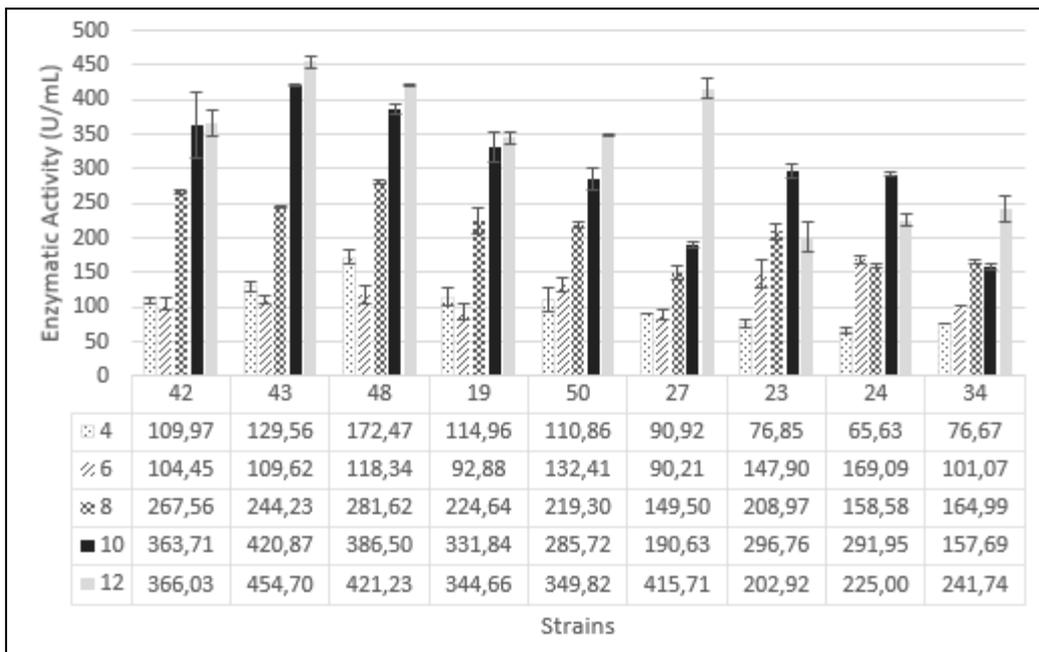


1

2 **Figure 7:** Best enzymatic activity values (U/ml) obtained of strains cultivated at 37 °C.

3

4



1

2 **Figure 8:** Maximum levels of enzyme activity achieved in reactions with different pH  
 3 values.

4

1 **Table 1:** Strains by sample with best results in each test.

Test	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Rhodamine B	2	7	8
pNPP (30 °c)	-	4	5
pNPP (37 °c)	-	-	3

2

3