

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
SISTEMAS DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES**

GRACIANE FURINI

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre

Março/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
SISTEMAS DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES**

Graciane Furini

Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Furini, Graciane  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE SISTEMAS DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE  
EFLUENTES / Graciane Furini. -- 2017.  
81 f.  
Orientador: José Carlos Germani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. enzimas lipolíticas. 2. bactérias. 3. cultivo  
submerso. 4. Acinetobacter. I. Germani, José Carlos,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A inteligência é o farol que nos guia, mas é a vontade que nos faz caminhar”

Érico Veríssimo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha amada família, meus pais Mário e Anair, meus irmãos Geovani, Glênio, Mariana e meu noivo Anderson por tanto amor, carinho, ajuda, incentivo, parceria, amizade e compreensão.

Aos professores José Carlos Germani e Sueli Van der Sand pela oportunidade de realizar este trabalho.

Às colegas de laboratório, em especial a Themis Antunes e Jussara Berger.

Ao colega de mestrado e também de graduação José Antônio Munzi pelas dicas no biorreator.

Ao PPG de Microbiologia e aos professores que fui aluna.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

# PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE SISTEMAS DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES<sup>1</sup>

Autor: Graciane Furini

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

## RESUMO

Lipases são enzimas que hidrolisam especificamente óleos e gorduras, podendo ser de grande interesse para vários segmentos industriais como têxtil, cosméticos, alimentícios e tratamento de efluentes com elevada carga de gordura. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de complexos enzimáticos lipolíticos produzidos por microrganismos isolados de um sistema de tratamento biológico de efluentes de um hotel, visando obter lipases com potencial para emprego em processos biotecnológicos. Para a seleção do microrganismo lipolítico foram utilizados 65 isolados bacterianos oriundos do efluente bruto e tratado da *wetland* e da caixa de gordura do restaurante do hotel. A produção de lipase foi testada em placa em meio de cultivo acrescido de azeite de oliva e rodamina B, incubados a 25°C e 30°C por 24h-48h e as placas observadas sob luz UV 350 nm. Deste total de isolados, sete oriundos da *wetland* e 22 isolados da caixa de gordura foram positivos para lipase, pois apresentaram halos fluorescentes alaranjado. Os isolados foram testados novamente em placa, porém numa condição mais estressante em termos de nutrientes para induzir a utilização do azeite e assim selecionar as melhores produtoras de enzimas. Desses, 12 isolados apresentaram atividade lipolítica e aquele que apresentou halo mais evidente e maior foi selecionado para ensaios com crescimento em cultura submersa em agitador orbital e biorreator em três substratos diferentes (azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola) para a determinação da atividade enzimática. As bactérias lipolíticas identificadas bioquimicamente foram do gênero *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Burkholderia*. Os ensaios em cultura submersa em biorreator nos três substratos avaliados apresentaram a máxima produção de lipase após 12 horas de cultivo; azeite de oliva 0,358 U/mL.min<sup>-1</sup>, óleo de semente de uva 0,352 U/mL.min<sup>-1</sup> e óleo de canola 0,348 U/mL.min<sup>-1</sup>. Em cultivo submerso em agitador orbital, o meio de cultivo na presença de Tween 80, apresentou melhor atividade enzimática que o meio de cultivo sem a presença do emulsionante. A identificação molecular do isolado apresentou identidade com o gênero *Acinetobacter baylyi*. A análise por SDS-PAGE sugere uma lipase com massa molecular de 35 kDa.

**Palavras-chave:** enzimas lipolíticas; bactérias; cultivo submerso; *Acinetobacter*.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (82 p.) Março, 2017.

# PRODUCTION OF LIPOLYTIC ENZYMES BY BACTERIALS ISOLATED FROM BIOLOGICAL EFFLUENT TREATMENT SYSTEMS <sup>1</sup>

Author: Graciane Furini  
Advisor: Prof. Dr. José Carlos Germani

## ABSTRACT

Lipases are enzymes that specifically hydrolyze oils and fats and may be of great interest to various industrial segments such as textiles, cosmetics, food and effluent treatment with the high fat load. The aim of this work was to evaluate the production of lipolytic enzymatic complexes produced by microorganisms isolated from a biological treatment system of effluents of a hotel, aiming to obtain lipases with potential for use in biotechnological processes. To select the best lipolytic microorganism, we used 65 bacterial isolates, recovered from the raw and treated effluent of the wetland system and from the fat tank of the hotel restaurant. Lipase production was evaluated in culture medium supplemented with olive oil and rhodamine B, incubated at 25°C and 30°C for 24h-48h. The grown colonies were observed under UV light at 350 nm. Out of that, seven isolates from wetland and 22 isolated from the fat tank were positive for lipase as they exhibited orange fluorescent halos. The isolates were again seeded on medium with a stressful nutrient condition to induce the use of olive oil and thus select the best enzyme producers. Of these, 12 isolates presented lipolytic activity, and the one that showed the most evident halo was selected for assays in submerged culture in an orbital shaker and bioreactor using three different substrates (olive oil, grape seed oil, and canola oil). The lipolytic bacteria identified were of the genus *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, and *Burkholderia*. The assays run in the bioreactor showed the maximum lipase production after 12 hours of culture with the three substrates evaluated; 0,358 U/mL.min<sup>-1</sup> in olive oil, 0,352 U/mL.min<sup>-1</sup> grape seed oil, and 0.348 U/mL.min<sup>-1</sup> canola oil. The results obtained in an orbital shaker showed better enzymatic activities in the presence of Tween 80 on the culture medium. The molecular identification showed identity with the genus *Acinetobacter baylyi*. Analysis by SDS-page suggests a lipase with a molecular mass of 35 kDa.

Key Words: lipolytic enzymes; bacteria; submerged culture; *Acinetobacter*.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (82 p.) March, 2017.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 Objetivo Geral .....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 Enzimas.....	4
3.1.1 Classificação e nomenclatura.....	6
3.2 Biotecnologia enzimática.....	8
3.2.1 Fontes de microrganismos de interesse.....	8
3.2.2 Características desejáveis dos microrganismos.....	9
3.3 Produção industrial de enzimas .....	9
3.3.1 Processo fermentativo.....	10
3.4 Mercado e aplicações enzimáticas.....	12
3.5 Lipases .....	16
3.5.1 Estrutura protéica e ação catalítica das lipases .....	17
3.5.2 Obtenção e isolamento das lipases.....	20
3.5.3 Aplicações das lipases .....	22
3.6 Tratamento de efluentes com enzimas lipolíticas.....	26
3.7 <i>Wetland</i> .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 Considerações gerais.....	29
4.2 Local da coleta das amostras.....	29
4.3 Microrganismos provenientes da <i>wetland</i> .....	29
4.4 Microrganismos provenientes da caixa de gordura .....	29
4.5 Seleção dos microrganismos lipolíticos.....	30
4.6 Seleção dos microrganismos lipolíticos usando diferentes óleos.....	31
4.7 Identificação bioquímica .....	31
4.8 Cultivo submerso em agitador orbital .....	31
4.9 Cultivo submerso na presença de emulsionante.....	32
4.10 Cultivo submerso em biorreator .....	32
4.11 Atividade lipolítica por espectrometria .....	34

4.12 Identificação molecular.....	34
4.12.1 Extração de DNA.....	34
4.12.2 Reação em cadeia da polimerase .....	35
4.12.3 Eletroforese em gel de agarose .....	35
4.13 Determinação da massa molecular da lipase.....	35
4.13.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	35
4.13.2 Revelação do gel de poliacrilamida .....	36
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1 Seleção dos microrganismos lipolíticos.....	37
5.2 Seleção dos microrganismos utilizando diferentes óleos .....	38
5.3 Identificação bioquímica .....	40
5.4 Cultivo submerso em agitador orbital .....	42
5.4.1 Curva de crescimento.....	42
5.4.2 Atividade enzimática .....	43
5.5 Cultivo submerso em biorreator .....	45
5.5.1 Atividade enzimática em cultivo submerso no biorreator.....	45
5.5.2 Crescimento celular e atividade enzimática .....	46
5.5.3 pH.....	47
5.6 Identificação molecular.....	48
5.7 Determinação da massa molecular .....	48
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes enzimáticas segundo IUBMB.....	7
Tabela 2. Número de classificação das enzimas .....	7
Tabela 3. Algumas aplicações industriais das enzimas .....	13
Tabela 4. Microrganismos produtores de lipase.....	21
Tabela 5. Aplicação industrial da lipase .....	23
Tabela 6. Exemplo de lipases comerciais disponíveis no mercado.....	25
Tabela 7. Resultado da observação quantitativa da fluorescência dos isolados em estudo cultivado em meio com menos nutrientes, incubados a 25°C e 30°C por 72h Azeite de oliva como substrato e rodamina B como indicador .....	37
Tabela 8. Isolados submetidos ao ensaio em placa com os substratos óleo de semente de uva e óleo de canola com o indicador rodamina B a 25°C e 30°C durante 72h .....	39
Tabela 9. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados.....	41
Tabela 10. Identificação bioquímica dos 12 isolados .....	42
Tabela 11. Estatística descritiva dos dados de atividade enzimática em ensaio em agitador orbital utilizando óleo de semente de uva, azeite de oliva e óleo de canola como substrato, com e sem indutor Tween 80, cultivado durante 24h na temperatura de 30°C .....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas	4
Figura 2. Esquema da inibição enzimática competitiva (A), acompetitiva (B) e mista (C). Sendo S=substrato e I=inibidor	6
Figura 3. Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas por fermentação submersa	11
Figura 4. Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas	13
Figura 5. Importação de enzimas pelo Brasil no período de janeiro a novembro de 2016	15
Figura 6. Exportação de enzimas pelo Brasil no período de janeiro a novembro de 2016	15
Figura 7. Hidrólise seqüencial de um triacilglicerol por uma lipase	16
Figura 8. Reações catalisadas por triacilglicerol acil hidrolase	17
Figura 9. Modelo estrutural de $\alpha\beta$ hidrolase	18
Figura 10. Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas	19
Figura 11. Prováveis funções das lipases extracelulares microbianas	23
Figura 12. <i>Wetland</i> construída	28
Figura 13. (A) caixa de gordura. Coleta do efluente bruto. (B) Coleta na saída do efluente tratado	30
Figura 14. Biorreator de bancada usado no ensaio	33
Figura 15. Equação química da reação do palmitato de p-nitrofenila	34
Figura 16. Isolado G40. (A) cultivo em azeite de oliva, (B) cultivo em óleo de semente de uva, (C) cultivo em óleo de canola a 30°C durante 72h	39
Figura 17. Curvas de crescimento do isolado G40 em cultivo submerso, suplementado com azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola com e sem Tween 80. C/T: Com Tween 80; S/T: Sem Tween 80	43
Figura 18. Atividades enzimáticas nos substratos azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola com e sem a adição de Tween 80 em agitador orbital a 120 rpm, durante 24 horas. AE: Atividade Enzimática, C/T: Com Tween 80, S/T: Sem Tween 80	44
Figura 19. Atividade enzimática dos substratos azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola em cultivo submerso em biorreator a 30°C	45

Figura 20. Crescimento celular versus atividade enzimática em biorreator suplementado com azeite de oliva. AE: Atividade Enzimática .....	46
Figura 21. Crescimento celular versus atividade enzimática em biorreator suplementado com óleo de semente de uva. AE: Atividade Enzimática .....	46
Figura 22. Crescimento celular versus atividade enzimática em biorreator suplementado com óleo de canola. AE: Atividade Enzimática .....	47
Figura 23. Variação do pH dos ensaios com azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola durante 24 horas em biorreator .....	48
Figura 24. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Em A: marcador de peso molecular, B: amostra contendo a enzima lipase .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetros
Atm	Atmosfera
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EC	<i>Enzyme Commission</i>
HCl	Ácido Clorídrico
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MDIC	Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior
mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Nanômetros
pNPP	Para nitrofenil palmitato
Rpm	Rotação por minuto
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UV	Ultravioleta
Vvm	Volume de ar por volume de meio

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas é um dos campos mais promissores dentro da biotecnologia visando a biossíntese de compostos com alto valor agregado. O crescente aumento na utilização das enzimas microbianas em processos industriais vem ao encontro da procura de novos produtos que não agredam o meio ambiente e que tenham baixo custo de produção.

Enzimas são proteínas que catalisam a velocidade das reações diminuindo sua energia de ativação. A estrutura funcional das enzimas está constituída por um sítio ativo onde os substratos são ligados para que ocorra a quebra ou a geração das ligações. Esta capacidade se baseia nos aminoácidos específicos e em seu arranjo especial dentro do sítio ativo.

As enzimas possuem características que lhes conferem inúmeras vantagens frente aos catalisadores químicos, favorecendo sua utilização comercial em uma vasta gama de produtos enzimáticos em diversos setores industriais. Estima-se que para o ano de 2017, o mercado mundial de enzimas chegue a US\$ 7 bilhões. A demanda pelo uso de enzimas na área ambiental impulsionada pela necessidade de soluções “limpas”, fez com que a busca e a utilização por enzimas microbianas apresentasse um crescente aumento nos últimos anos.

A grande biodiversidade microbiana no Brasil e a possibilidade de utilizar resíduos agropecuários e industriais como substratos e matérias-primas, justifica a pesquisa por novos microrganismos produtores de enzimas com características adequadas para serem aplicadas industrialmente. Entre as enzimas utilizadas como catalisadores, as lipases microbianas vêm conquistando uma grande faixa de mercado nas enzimas industriais, o que as tornam uma das classes mais estudadas e utilizadas atualmente.

Microrganismos lipolíticos podem ser encontrados em diversos ambientes e na literatura existem descritas numerosas espécies de bactérias, fungos e leveduras produtores dessas enzimas. Lipases de origem microbiana são usadas preferencialmente àquelas de origem animal e vegetal devido à versatilidade de suas propriedades no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato. Além disso, podem ser produzidas em abundância

por fermentação, apresentam facilidade de manipulação genética e por serem mais estáveis, tornam a sua produção mais conveniente e segura.

As lipases podem ser produzidas por processos fermentativos submersos, sendo sua produção diretamente relacionada com a composição dos meios de produção, os fatores nutricionais e físico-químicos, como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, além da presença de indutores lipídicos como os óleos vegetais. Estudos sobre a utilização de diferentes microrganismos e substratos para a produção de lipases em meio líquido, podem contribuir no sentido de encontrar combinações ideais para se obterem altos rendimentos de lipases, e assim, reduzir os custos de produção em escala industrial.

O presente trabalho visa selecionar e identificar bactérias produtoras dessa enzima e avaliar a produção das lipases de bactérias presentes em um sistema de tratamento biológico de efluente (*Wetland* e caixa de gordura de restaurante), ambos pertencentes a um hotel no município de Bento Gonçalves, RS. O efluente objeto deste estudo apresenta uma grande carga de lipídeos em sua composição, tornando-se adequado para o isolamento de bactérias produtoras de enzimas lipolíticas utilizadas em processos biotecnológicos industriais.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de complexos enzimáticos lipolíticos produzidos por bactérias isoladas de um sistema de tratamento biológico de efluente.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar e selecionar bactérias lipolíticas de um efluente contendo alta carga de lipídeos;
- 2.2.2 Avaliar *in vitro* a atividade lipolítica utilizando diferentes substratos a base de óleos vegetais;
- 2.2.3 Avaliar *in vitro* a atividade lipolítica dos potenciais microrganismos em diferentes temperaturas de incubação;
- 2.2.4 Avaliar a atividade lipolítica em cultivo submerso em agitador e em biorreator;
- 2.2.5 Identificar a cepa bacteriana por sequenciamento do 16S DNA ribossomal.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram a velocidade da reação diminuindo a energia de ativação. Elas são sintetizadas pelas próprias células onde atuam, são extremamente específicas para o substrato que catalisam, não são consumidas e não alteram o equilíbrio químico da reação (Sharma *et al.*, 2001).

As enzimas apresentam natureza proteica sendo constituídas por heteropolímeros de diferentes aminoácidos unidos por ligações peptídicas segundo um arranjo tridimensional (Santos, 2012). A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação proteica nativa, sendo geralmente perdida caso a enzima seja desnaturada ou dissociada em subunidades, ou seja, em seus aminoácidos componentes. Sendo assim, as estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para o exercício da atividade catalítica (Figura 1). A estrutura tridimensional terciária configura o sítio catalítico da enzima, o qual é determinante para sua atividade biológica (Roveda, 2007; Lima *et al.*, 2001).

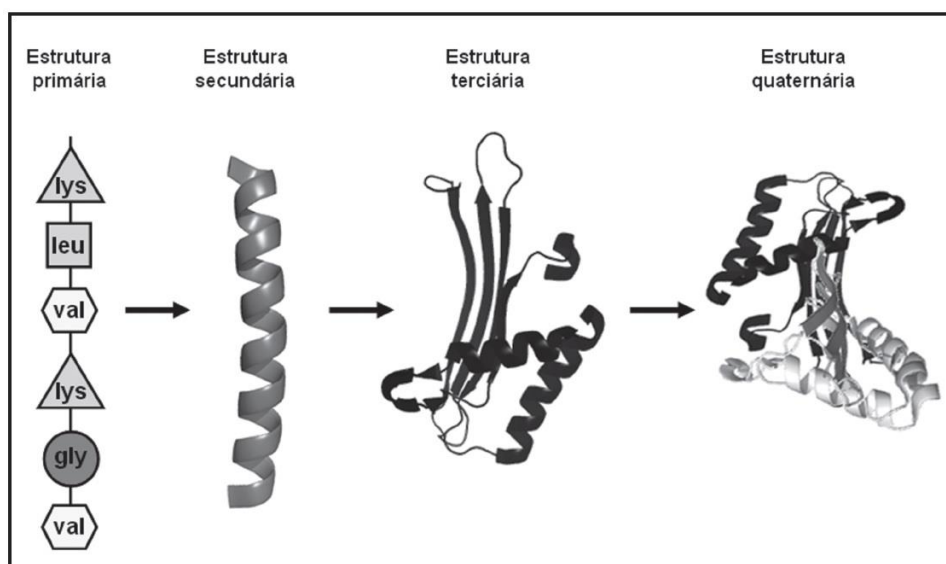


Figura 1. Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas. Fonte: Moraes *et al.*, 2013.

Como as enzimas são proteínas, sua estrutura é codificada por genes específicos e a síntese envolve transcrição, tradução e processos pós-traducionais. Algumas enzimas estão sempre disponíveis e são designadas constitutivas, enquanto outras são designadas indutivas, sendo sintetizadas em resposta às condições ambientais. Os microrganismos possuem mecanismos de regulação da expressão gênica, os quais são influenciados, entre outros fatores, por substâncias que podem exercer o papel de indutores, ativadores, inibidores ou repressores (Faria, 2010; Bon *et al.*, 2008).

A estrutura funcional das enzimas está constituída por centros ou sítios ativos onde os substratos são ligados a essa região específica, que possui forma definida aberta na superfície da molécula globular da enzima e que contém os radicais de aminoácidos que participam diretamente na geração e rompimento das ligações. É esta forma definida de sítio ativo que confere a especificidade à catálise enzimática, ou seja, para ser reconhecida como substrato uma molécula deve possuir a forma adequada para acomodar-se no sítio ativo e aos grupos químicos capazes de estabelecer ligações com os radicais dos aminoácidos ali presentes. Os sítios ativos também podem possuir centros reguladores, chamados centros alostéricos, aos quais se ligam pequenas moléculas que podem ativar ou inibir a ação enzimática (Carvalho *et al.*, 2003; Roveda, 2007).

As enzimas podem ser inibidas por substâncias que se ligam à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato, ou que competem pelo sítio catalítico da enzima, ocasionando uma diminuição ou anulação da atividade enzimática. Um inibidor competitivo se liga à enzima livre e impede a ligação da mesma ao seu substrato. Neste caso, o substrato e o inibidor possuem semelhanças estruturais. Na inibição competitiva, a velocidade máxima da reação não é alterada (Figura 2A). A inibição incompetitiva é onde o inibidor não se liga à enzima no estado livre, mas ao complexo enzima-substrato e neste caso o complexo fica inativo (Figura 2B). Existem ainda casos onde os dois tipos de inibição podem ocorrer ao mesmo tempo, chamado de inibição mista, representada na figura 2C (Monteiro & Silva, 2009; Silva, 2014).

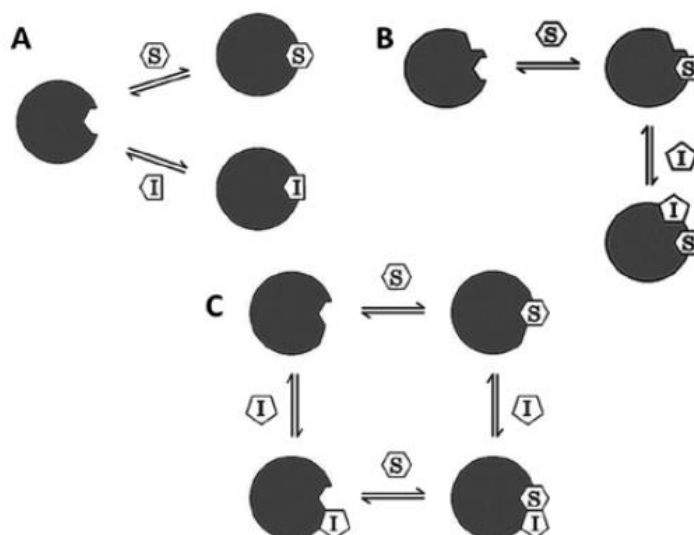


Figura 2. Esquema da inibição enzimática competitiva (A), acompetitiva (B) e mista (C). Sendo S=substrato e I=inibidor. Fonte: Monteiro & Silva, 2009.

### 3.1.1 Classificação e nomenclatura

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classificou as enzimas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada, como mostra a Tabela 1. Posteriormente, esses grupos são subdivididos em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade. O número de classificação composto por quatro dígitos (Tabela 2) é conhecido como E.C. (*Enzyme Commission*) (Moraes *et al.*, 2013; Pereira, 2014; IUBMB).

Como exemplo temos a quimotripsina, E.C. 3.4.21.1, onde: 3 é a classe hidrolase (catalisa reações de hidrólise de ligações covalentes), 4 corresponde a sub-classe peptidase (hidrolisa ligações peptídicas), 21 serino-endopeptidase (enzima contendo serina no sítio ativo) e 1 quimotripsina.

Tabela 1. Classes enzimáticas segundo a IUBMB.

Número	Classificação	Tipo de reação catalisada	Enzimas
1	Oxirredutase	Transferência de elétrons $A^- + B \leftrightarrow A + B^-$	Hidrogenase, oxidase, peroxidase
2	Transferase	Transferência de grupos $A-X + B \leftrightarrow A + B-X$	Aminotransferase, acetiltransferase, fosforilase
3	Hidrolase	Hidrólise $A-B + H_2O \leftrightarrow A-H + B-OH$	Lipase, protease, amilase
4	Liase	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação $\begin{array}{c} X & Y \\   &   \\ A & - & B \end{array} \leftrightarrow A = B + X - Y$	Hidrogenase, oxidase, peroxidase
5	Isomerase	Rearranjos intramoleculares $\begin{array}{c} X & Y \\   &   \\ A & - & B \end{array} \leftrightarrow \begin{array}{c} Y & X \\   &   \\ A & - & B \end{array}$	Glicose-isomerase
6	Ligase	Condensação de duas moléculas associada à hidrólise de uma ligação de alta energia (em geral, do ATP) $A + B \leftrightarrow A-B$	Piruvatocarboxilase

Fonte: Adaptado de Pereira, 2014; Borzani *et al.*, 2001.

Tabela 2. Número de classificação das enzimas.

Número	Classificação
1	Classe
2	Sub-classe dentro da classe
3	Grupos químicos específicos que participam da reação
4	Enzima propriamente dita

Fonte: Adaptado de Monteiro & Silva, 2009.

### 3.2 Biotecnologia enzimática

A exploração comercial de enzimas abrange uma vasta gama de produtos enzimáticos. A finalidade do uso determina o grau de pureza com o qual a enzima deve ser produzida. Em operações de manufatura são empregadas as enzimas na forma de preparações brutas ou pouco purificadas, comercializadas em volumes muito elevados, tais como o malte, fonte de amilases, e o sobrenadante concentrado de fermentações industriais. Em contraste, os programas de pesquisa nas áreas química, farmacêutica ou médica empregam enzimas “finas”, altamente purificadas e de elevado custo (Faria, 2010; Reis, 2015).

A demanda por enzimas industriais, principalmente na área ambiental, está em aumento contínuo impulsionado por uma crescente necessidade de soluções sustentáveis. Atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica é o de produção e uso de enzimas de origem microbiana. Os microrganismos continuam a servir como uma das maiores e mais úteis fontes de muitas enzimas. As enzimas microbianas podem ser obtidas de fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Adrio & Demain, 2014; Santos, 2012).

Apesar da maior utilização das enzimas obtidas das fontes vegetais e animais, a preferência pelas enzimas microbianas fundamenta-se nos seguintes pontos: facilidade de obtenção de grandes populações celulares produtoras de enzimas, produção independente de fatores sazonais, facilidade de seleção de linhagens de alta produtividade por manipulação genética, procedimentos de extração de enzimas simples e econômicos e ainda a possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas (Fungaro & Maccheroni Jr., 2002; Said & Pietro, 2002; Brandão & Castro, 2004).

#### 3.2.1 Fontes de microrganismos de interesse

O crescente mercado para as enzimas exige a seleção de novos microrganismos produtores com maior produtividade, visando à redução de custos e a obtenção de enzimas com diferentes propriedades. Em decorrência, torna-se fundamental a pesquisa por novas fontes de microrganismos produtores de enzimas para aplicações comerciais com características bioquímicas e físico-químicas desejáveis. (Ghazala *et al.*, 2016; Tavares, 2011).

A obtenção de microrganismos que produzem enzimas com aplicações biotecnológicas pode ser feita de várias formas tais como o isolamento a partir de recursos naturais, a aquisição de linhagens de coleções de culturas, a obtenção de mutantes naturais e de mutantes induzidos por métodos convencionais, e ainda a obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas moleculares. A metagenômica é uma ferramenta molecular atualmente de grande relevância para a descoberta de novas enzimas (Vaz *et al.*, 2007; Saxena, 2015).

A natureza fornece uma vasta biodiversidade de recursos microbianos, no entanto a capacidade de produção de enzimas foi testada em menos de 2% dos microrganismos existentes no planeta, e menos de 1% dos microrganismos existentes podem ser cultivados. Estudos de microrganismos de ambientes naturais, especialmente em ambientes não convencionais e extremos, como no rumem de bovinos, intestino de cupim, aberturas vulcânicas, tundra ártica, ambientes marinhos e salinos, rejeitos de indústrias de processos, solos contaminados, produziram enzimas com características específicas para aplicações biocatalíticas, como lipase, oxidoreductase, amilase, nitrilase, beta-glucosidade, decarboxilase (Alves *et al.*, 2014; Adrio & Demain, 2014; Borrelli & Trono, 2015).

### 3.2.2 Características desejáveis dos microrganismos

Para uma aplicação industrial, deseja-se que os microrganismos apresentem características como: elevada eficiência na conversão do substrato em produto; permitir o acúmulo do produto no meio de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentado; não produzir substâncias incompatíveis com o produto; apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico; não ser patogênico; não exigir condições de processo muito complexas; não exigir meios de cultivo muito dispendiosos; permitir rápida liberação do produto ao meio (Saxena, 2015).

### 3.3 Produção industrial de enzimas

Após a obtenção do microrganismo, este é cultivado em fermentadores para a produção de quantidades industriais do biocatalisador. É fundamental a

otimização do meio de cultivo. Determinadas características gerais do meio devem ser consideradas, tais como: ser o mais barato possível; atender às necessidades nutricionais do microrganismo; auxiliar no controle do processo, como o caso de ser ligeiramente tamponado evitando assim variações drásticas de pH; evitar uma excessiva formação de espuma; não provocar problemas na recuperação do produto; ter composição razoavelmente fixa; não causar dificuldades no tratamento final do efluente. Parâmetros como pH, temperatura, condições de aeração e agitação devem ser adequados (Schmidell *et al.*, 2001; Roveda, 2007).

Os meios de cultivo a serem utilizados podem ser formulados a partir de matérias-primas naturais, como os resíduos agroindustriais, uma vez que o uso destes representa uma forma de se agregar valor aos resíduos abundantes, dando solução para o seu acúmulo que representa um sério problema ambiental, ou a partir de compostos quimicamente conhecidos (meios sintéticos). Esses meios devem conter fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento e micronutrientes, além de uma fonte indutora para a produção de enzimas, como o amido para amilase, uréia para a urease, carboximetilcelulase para celulase, azeite de oliva para lipase, entre outros exemplos (Orlandelli *et al.*, 2012; Messias *et al.*, 2011; Bon *et al.*, 2008).

### 3.3.1 Processo fermentativo

O processo fermentativo industrial consiste em duas etapas principais, que são divididas em: 1) operações de *upstream*, que são as etapas que antecedem a operação do reator, cuja finalidade é colocar o sistema nas condições previamente escolhidas para que as transformações no reator se desenvolvam em condições ótimas; e 2) operações de *downstream*, que são as operações de obtenção do produto e que englobam as operações de separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados (Figura 3) (Aquarone *et al.* 2001; Roveda, 2007; Orlandelli *et al.*, 2012).

Os processos submersos consistem naqueles em que o microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em biorreatores providos de agitação e aeração (para microrganismos aeróbios)



e outros controles, tais como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e formação de espuma. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido sendo facilmente acessíveis para a utilização pelos microrganismos (Roveda, 2007; Borzani *et al.*, 2001).

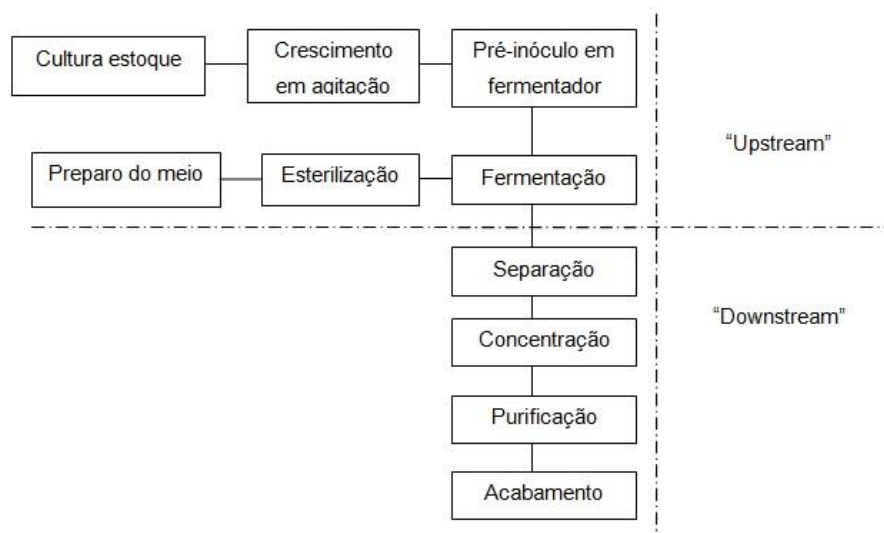


Figura 3. Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas por fermentação submersa. Fonte: Autora.

Para o produto que não é excretado no meio de cultivo, ou seja, é intracelular há a necessidade de romper a estrutura celular, e neste caso é importante a escolha de técnicas adequadas para a liberação do produto. O grau de pureza dependerá da opção do produto, extrato bruto ou enzima purificada. O produto final poderá se apresentar nas seguintes formas: cristalizado, liofilizado ou líquido concentrado. A sequência de operações pelas quais o meio contendo a substância a ser separada deve passar para obtenção de um produto de alta pureza constitui-se basicamente de quatro etapas: remoção do material insolúvel, isolamento primário, purificação e isolamento do produto final. A remoção do material insolúvel poderá ser feita por filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação. O isolamento primário poderá ser realizado pela extração por solventes, por precipitação ou por ultracentrifugação (Bassani *et al.*, 2010; Barbosa, 2011).

O processo de purificação destina-se a remover as impurezas bem como a concentrar o produto, e pode-se optar pelos vários tipos de cromatografia, pela adsorção ou pela precipitação fracionada. A última etapa compreende o

isolamento do produto final e as operações incluem a centrifugação e subsequente secagem de um produto cristalizado, liofilizado ou seco por *spray drying* (Vaz *et al.*, 2007; Silva, 2014).

### 3.4 Mercado e aplicações enzimáticas

O mercado de enzimas está dividido em dois grandes segmentos: o de enzimas industriais o qual abrange as enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal; e o de enzimas especiais, representado pelas enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa. A comercialização de enzimas industriais é crescente. Em 2002, o mercado enzimático foi estimado em 1,5 bilhões de dólares. Em 2009, o mercado aumentou para 3,1 bilhões de dólares e em 2015 o mercado foi estimado em 4,4 bilhões de dólares (Costa, 2014; Singh *et al.*, 2016).

Atualmente, são conhecidas cerca de 4000 enzimas e destas aproximadamente 200 são as mais utilizadas comercialmente, sendo a maioria de origem microbiana. As enzimas são usadas em várias áreas, como alimentos, ração, detergente, curtimento, têxteis, lavanderia, produtos farmacêuticos, cosméticos e indústrias de química fina e categorizadas com base em aplicações específicas. A demanda dessas enzimas está representada na Figura 4. Estas aplicações industriais representam mais de 80% do mercado global de enzimas (Tabela 3). (Kumar *et al.*, 2014; Monteiro & Silva, 2009).

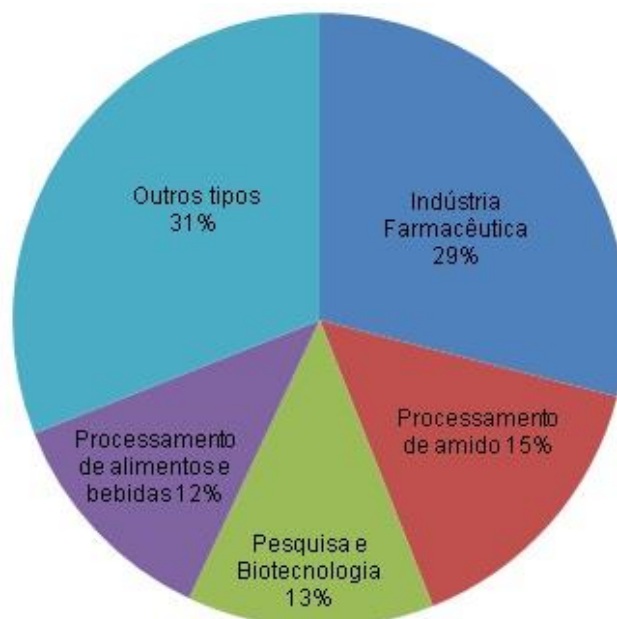


Figura 4. Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas.  
Fonte: Monteiro & Silva, 2009.

Tabela 3. Algumas aplicações industriais das enzimas.

Aplicação	Enzima	
Aplicação técnica	Polpa e Indústria de papel	Amilase, lipase, celulase, $\beta$ -xilanase
	Indústria têxtil	Amilase, celulase, pectinase, lacase
	Detergentes	Protease, lipase, amilase, celulase
Processamento de alimentos	Laticínios	Lipase, lisosima, $\beta$ -galactosidade, lactase
	Panificação	$\alpha$ -amilase, $\beta$ -xilanase, oxidorreductase, lipase, protease
	Sucos	Amilase, pectinase, celulase, lacase
	Indústria de cerveja	$\alpha$ -amilase, protease, xilanase, amiloglucosidade, $\beta$ -galactosidade,
Alimentos para animais	Xilanase, fitase, protease, $\alpha$ -amilase	
Síntese orgânica	Lipase, esterase, amilase, álcool desidrogenase	
Indústria de	Oxidase, peroxidase, isomerase,	

---

Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2012.

A demanda mundial de enzimas é atendida por 12 empresas principais e por 400 fornecedores menores. Cerca de 60% do total de enzimas industriais são produzidas na Europa, porém, na última década, China e Índia vêm se destacando no mercado produtor e consumidor. O mercado enzimático é altamente competitivo, sendo a dinamarquesa Novozymes a maior empresa do setor, seguida pela DSM (Holanda), DuPont (EUA) e Roche (Suíça) (Li *et al.*, 2012; Costa, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Choudhury & Bhunia, 2015).

Em torno de 75% de todas as enzimas industriais são de ação hidrolítica. As proteases, carboidrases e as lipases constituem o maior grupo de enzimas comercializadas no mundo. Estima-se que o mercado global enzimático cresça de 6-7% ao ano e que em 2017 chegue a US\$ 7 bilhões. A demanda será impulsionada devido ao aumento na aplicação na produção de alimentos e bebidas, produtos de limpeza, produtos farmacêuticos, ração animal, além das crescentes tecnologias relacionadas com enzimas para abordar questões ambientais. Essa demanda na produção enzimática irá beneficiar a queda dos custos de sequenciamento de DNA, permitindo aumentar a utilização de enzimas na área da biotecnologia, pesquisa e aplicações em diagnósticos (Messias *et al.*, 2011; Freedonia, 2014; Li *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016).

Embora o Brasil seja um país essencialmente importador das enzimas que utiliza, o país possui um enorme potencial para esta produção devido à abundância de matéria orgânica que pode ser usada como substrato de baixo custo para as fermentações (resíduos agrícolas, como palha de arroz e bagaço de cana) e também, devido à enorme biodiversidade biológica ainda pouco explorada para a descoberta de novas enzimas de interesse industrial (Orlandelli *et al.*, 2012; Costa, 2014).

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil, no período de janeiro a novembro de 2016, o país importou 71,47% das enzimas e exportou 28,53%. Além disso, o país apresenta um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. As porcentagens das principais enzimas com aplicação industrial,

importadas e exportadas pelo Brasil estão apresentadas nas Figuras 5 e 6 (MDIC/SECEX, 2016; Costa, 2014; Silva, 2014).

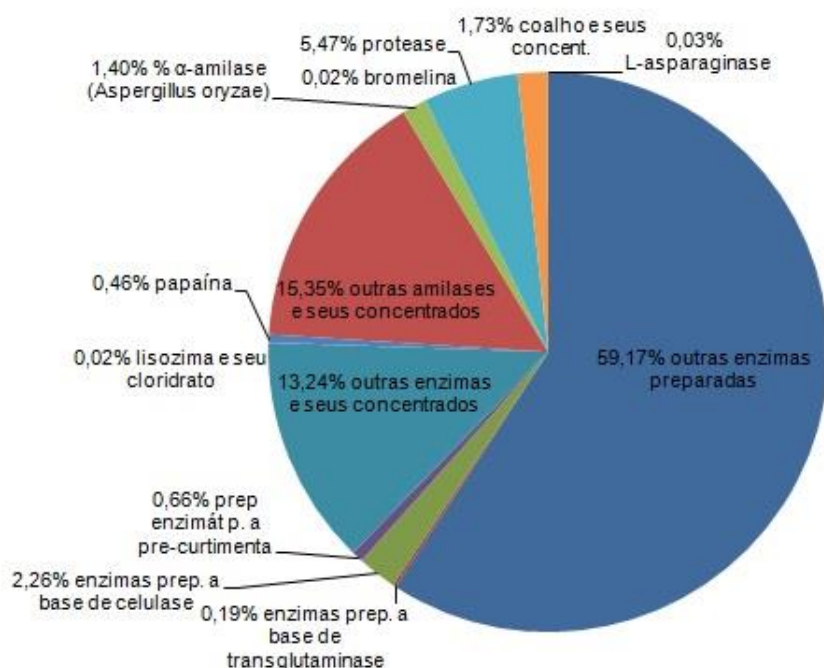


Figura 5. Importação de enzimas pelo Brasil no período de janeiro a novembro de 2016. Fonte: MDIC/SECEX.

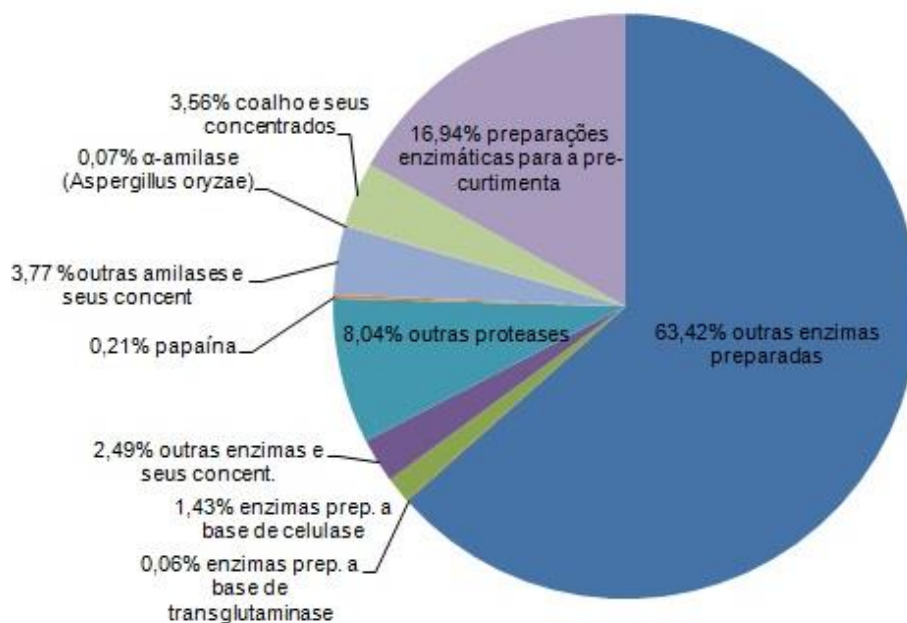


Figura 6. Exportação de enzimas pelo Brasil no período de janeiro a novembro de 2016. Fonte: MDIC/SECEX.

### 3.5 Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolases) são enzimas hidrolíticas, atuando na interface orgânico-aquosa, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (mais de 10 carbonos), formando glicerol e ácidos graxos (Verma *et al.*, 2012).

A Figura 7 ilustra como ocorre a reação de hidrólise, sendo que as lipases atuam sobre a ligação éster.

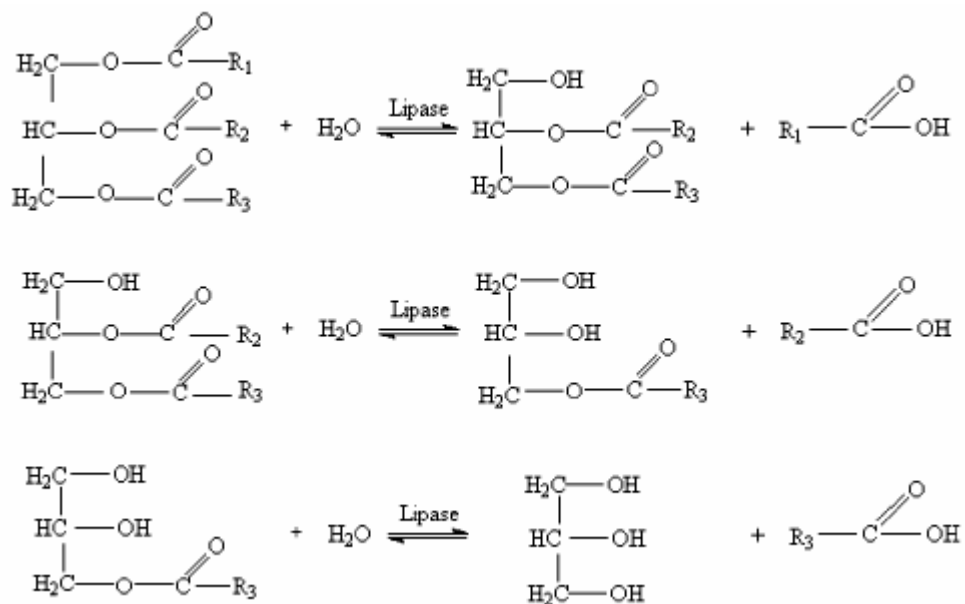


Figura 7. Hidrólise sequencial de um triacilglicerol por uma lipase. Fonte: Castro *et al.*, 2004.

Em condições limitantes de água no meio reacional, as lipases são capazes de reverter as reações de hidrólise para o sentido de esterificação e catalisar outras reações como transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise) e aminólises (síntese de aminas) (Figura 8) (Carvalho *et al.*, 2003; Paques & Macedo, 2006).

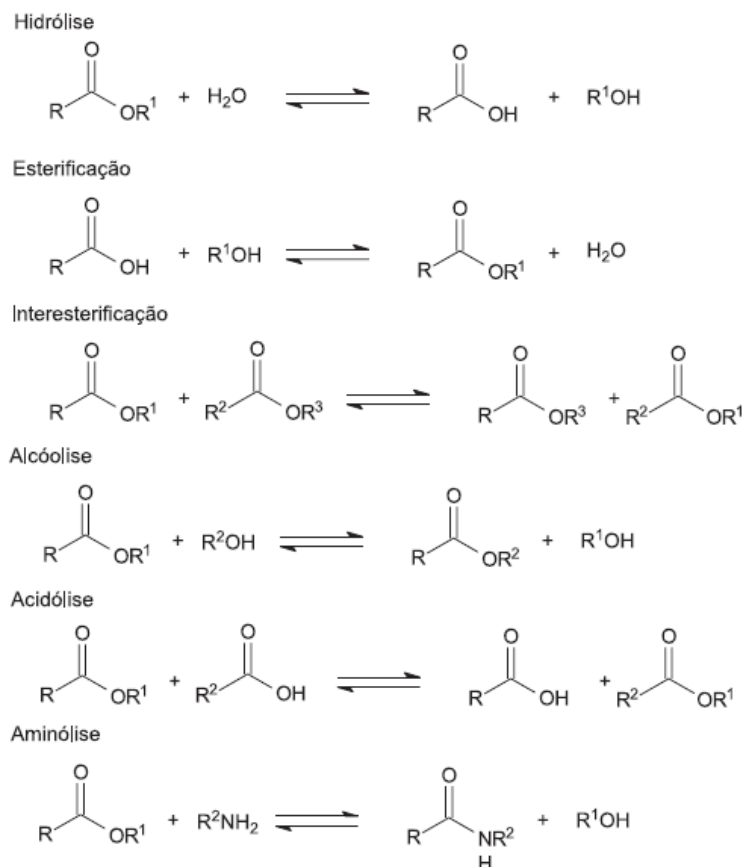


Figura 8. Reações catalisadas por triacilglicerol acil hidrolases. Fonte: Paques & Macedo, 2006.

As enzimas lipolíticas possuem atividade em pH na faixa de 4,0 a 9,0 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. São enzimas usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C (Mendes, 2004; Dors, 2006). Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Gurung *et al.*, 2013).

### 3.5.1 Estrutura proteica e ação catalítica das lipases

As lipases possuem massa molar entre 20 e 75 kDa e apresentam uma estrutura terciária padrão com um dobramento de  $\alpha/\beta$  hidrolase (Figura 9). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central formado por uma folha  $\beta$  central, consistindo de oito diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ), conectadas com seis  $\alpha$  hélices (A-F) (Borrelli & Trono, 2015; Manoel, 2011).

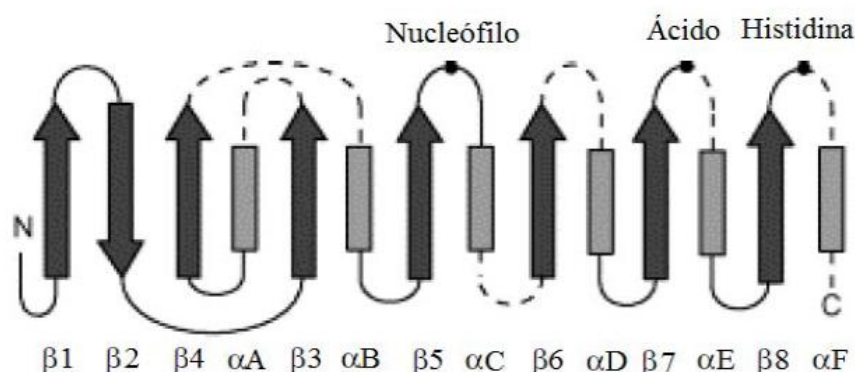


Figura 9. Modelo estrutural de αβ hidrolases. Fonte: Pouderoyen *et al.*, 2001.

A partir da estrutura proteica pode-se entender melhor a propriedade catalítica das enzimas. O primeiro ponto a considerar é a grande diferença de tamanho entre a enzima e seus substratos. Os reagentes, aqui chamados de substratos, devem ligar-se à molécula da enzima em uma região específica de sua superfície, chamada sítio ativo. O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da molécula globular da enzima, constituída por grupos R de aminoácidos que podem estar distanciados na estrutura primária da proteína, mas que os dobramentos da estrutura terciária trouxeram à proximidade uns dos outros. É esta forma definida de sítio ativo que confere a especificidade da catálise enzimática. Para ser reconhecida como substrato uma molécula deve ter a forma adequada para acomodar-se no sítio ativo e grupos químicos capazes de estabelecer ligações com os grupos R ali presentes (Borzani *et al.*, 2001; Escallón, 2009).

O seu mecanismo de ação está baseado no sítio ativo presente, formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, ácido aspártico ou glutâmico e histidina. O nucleófilo catalítico serina é responsável pela catálise e está unido por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina; o resíduo carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina poderá ser um aspartato ou glutamato (Costa, 2014). Dessa forma, para que a catálise tenha início é necessário que ocorra a “ativação interfacial”. Essa ativação pode ser explicada por meio da estrutura tridimensional da lipase. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (borda ou *lid*), sendo que nesta conformação a enzima é considerada inativa. Quando há



ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa sofre uma mudança conformacional, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase ao substrato. Nesta conformação a lipase é considerada ativa conforme Figura 10. (Castro *et al.*, 2004; Barbosa, 2011; Ghanem, 2007; Manoel, 2011).

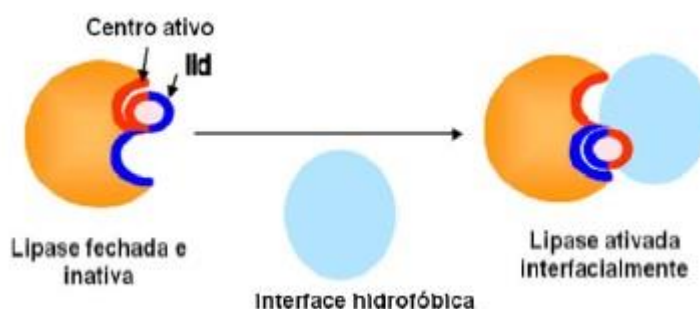


Figura 10. Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas. Fonte: Volpato, 2009.

A relação espacial entre substrato e enzima não deve ser vista segundo um modelo rígido de chave-fechadura. A aproximação e a ligação do substrato à enzima, altera o balanço de forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, moldando sua forma à forma do substrato e fazendo-a adquirir uma nova conformação, ideal para a catálise. Assim como a enzima, os substratos têm sua conformação tencionada e distorcida aproximando-se da conformação do estado de transição. Além disso, o substrato corretamente posicionado no sítio ativo está próximo de grupos R decisivos para a catálise (Borzani *et al.*, 2001; Roveda, 2007).

Jaeger & Reetz (1998) obtiveram um modelo estrutural em 3D para a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* com a presença da tampa, seguindo o modelo da lipase de *Burkholderia glumae*, ambas obtidas por cristalografia de raio-X. Todavia, apesar de apresentarem a tampa em suas estruturas, não houve ativação interfacial.

Determinadas lipases não apresentam o sítio ativo recoberto pela tampa e não precisam da interface para desempenhar sua atividade hidrolítica como é o caso das cutinases que são as menores estruturas de lipases conhecida e são

encontradas em diversos microrganismos fitopatogênicos. Fungos como *Fusarium solani* e *Alternaria solani* são produtores de cutinases (Auyong *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2006).

### 3.5.2 Obtenção e isolamento das lipases

As lipases estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (estômago, tecido adiposo, vascular e linfático, lisossomos), vegetais (oleaginosas) e microbianas (bactérias e fungos). A maioria das lipases utilizadas como catalisadores são de origem microbiana. Podem ser encontradas em diversos habitats, tais como resíduos industriais, subprodutos do processamento de óleos vegetais, efluentes industriais, indústria leiteira, solos contaminados por óleo, sementes oleaginosas e em alimentos em decomposição (Poppe, 2012; Carvalho *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005). Entretanto, a busca e seleção de microrganismos com atividade lipolítica pode levar à descoberta de novas lipases, com características únicas e adaptadas ao ambiente onde elas foram isoladas (Kumar *et al.*, 2005; Volpato, 2009). A Tabela 4 apresenta alguns exemplos de microrganismos com atividade lipolítica registrados na literatura.

Entre as bactérias Gram negativas o gênero *Pseudomonas* apresenta-se como um dos mais importantes com diferentes espécies produzindo lipase, sendo a espécie *P. aeruginosa* a de maior destaque. Outros gêneros muito estudados são *Burkholderia*, *Chromobacterium* e *Acinetobacter*. Entre as bactérias Gram positivas, os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* são os mais estudados. Enquanto muitas dessas enzimas são ativas sob temperaturas ao redor de 60°C e pH 7,0, as lipases de *Bacillus thermoleovorans* podem agir moderadamente sob valores extremos de pH e temperatura. Possivelmente as lipases com maior aplicabilidade são as de *Bacillus subtilis* que possuem atividade alcalina (pH 9-10) e termoestabilidade a 60-65°C (Sharma *et al.*, 2001; Haki & Rakshit, 2003; Willerding, 2007).

Tabela 4. Microrganismos produtores de lipase.

<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Chen <i>et al.</i> (1998)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Pemberton <i>et al.</i> (1997)
<i>Aeromonas</i> sp.	Lee <i>et al.</i> (2003), Charoenpanicha <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Chen <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus cereus</i>	El-Shafei & Rezkallah (1997)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Kim <i>et al.</i> (1998)
<i>Candida antarctica</i>	Alford & Pierce (1961), Arroyo <i>et al.</i> (1999), Robles-Medina <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida rugosa</i>	Jaeger & Reetz (1998)
<i>Geotrichum</i> sp.	Lotrakul & Dharmsthiti (1997)
<i>Penicillium roquefort</i>	Alford & Pierce (1961)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sharon <i>et al.</i> (1998), Mobarak-Qamsari <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Kaieda <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rajmohan <i>et al.</i> (2002)
<i>Psychrobacter</i> sp.	Zeng <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Robles-Medina <i>et al.</i> (2009)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Glogauner <i>et al.</i> (2011)
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Uttatree & Charoenpanich (2011)
<i>Burkholderia</i> sp.	Yuan <i>et al.</i> (2010)
<i>Acinetobacter junii</i>	Anbu <i>et al.</i> (2011)

Fonte: Andualema & Gessesse, 2012.

Dois métodos qualitativos para seleção de microrganismos produtores de lipases estão descritos na literatura. Cardenas *et al.* (2001) descreveu a metodologia usando meio com ágar contendo tributirina como substrato e a formação de um halo translúcido ao redor da colônia indicando a produção da lipase gerada pelo consumo do substrato. Wang *et al.* (1995) descreve o outro

método, utilizando meio com ágar contendo rodamina B e a produção da lipase é indicada por um halo alaranjado visível sob luz UV.

Entre os vários métodos disponíveis para acompanhar a atividade de lipase presente no meio fermentativo, os mais utilizados são os colorimétricos que utilizam substratos sintéticos como ésteres de ácidos graxos de *p*-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato) e o titulométrico (pH STAT) que usa a trioleína como substrato padrão (Gupta *et al.*, 2003; Hasan *et al.*, 2009).

### 3.5.3 Aplicação das lipases

Os principais motivos para as lipases apresentarem enorme potencial biotecnológico incluem sua estabilidade em solventes orgânicos, não necessitarem de co-fatores, possuírem uma grande especificidade ao substrato, exibirem uma alta enantioseletividade, pH e temperatura de atuação, além de poderem ser produzidas em abundância por fermentação, apresentarem menor custo de produção, baixa geração de resíduos e por não serem nocivas à saúde humana (Silva *et al.*, 2005; Volpato, 2009; Pereira, 2014).

A função mais proeminente de uma lipase extracelular para um microrganismo é a digestão de lipídeos para aquisição de nutrientes. A Figura 11 ilustra todas as supostas funções que uma lipase apresenta para a sobrevivência microbiana. A reação lipolítica pode abastecer o microrganismo com fontes de carbono para o seu crescimento; os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro. A lipase pode proporcionar condições sinérgicas para outras enzimas e através de hidrólise inespecífica também pode apresentar atividade fosfolipolítica. Tanto as lipases quanto os seus produtos finais de hidrólise podem apresentar diferentes efeitos imunológicos, participando, por exemplo, de processos inflamatórios. Os microrganismos que secretam lipases apresentam vantagens na competição com outros microrganismos sendo estas enzimas um mecanismo de defesa (Stehr *et al.*, 2003; Messias, 2008; Tavares, 2013).

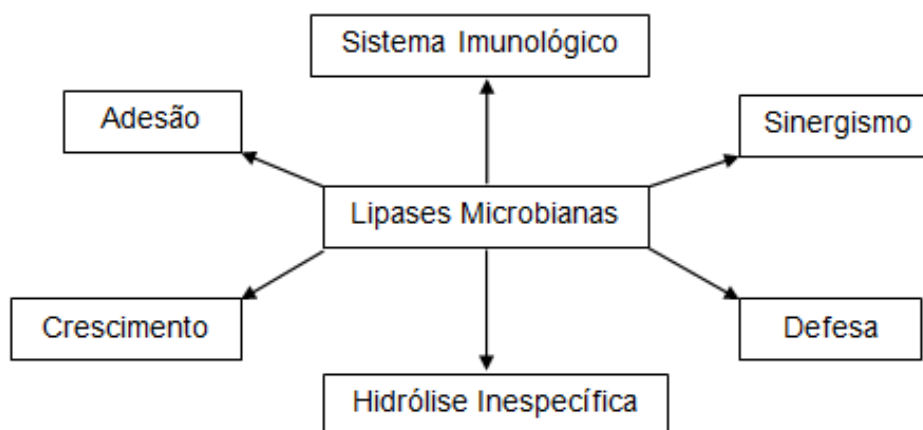


Figura 11. Prováveis funções das lipases extracelulares microbianas. Fonte: Autora.

As lipases se destacam entre as hidrolases devido as suas múltiplas aplicações. São utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes, conforme apresenta a Tabela 5 (Messias *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016).

Tabela 5. Aplicações industriais das lipases.

<b>Indústria</b>	<b>Aplicação</b>
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração de processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento de propriedades funcionais da gema do ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução do conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos e hidrólise de óleos naturais
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de

	racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão
Médica	Determinação de lipídeos no sangue
Couro	Remoção de gorduras da matéria prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes

Fonte: Colla *et al.*, 2012.

Na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas no melhoramento da textura de pães, otimização do tempo de maturação de salsichas fermentadas, na hidrólise de gorduras do leite e também para alterar o sabor do leite, pelo desenvolvimento de aromas em queijos e derivados (Bon *et al.*, 2008; Gandra *et al.*, 2008). Uma das maiores aplicações industriais das lipases tem sido como aditivos em detergentes, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água (Hasan *et al.*, 2006). Estas hidrolases são adicionadas aos detergentes líquidos e sólidos, domésticos e industriais, e devem ser estáveis em pH alcalino e em altas temperaturas, não sofrendo desnaturação pela ação de surfactantes. A principal vantagem do uso de lipases nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais, incluindo-se a vida aquática (Hasan *et al.*, 2006; Messias, 2011).

Dentre as aplicações na indústria oleoquímica merece destaque a interesterificação de óleos, que permite a valorização de um óleo mais barato por meio da composição em ácidos graxos (Cabral *et al.*, 2003).

Segundo Iso *et al.*, (2001), o emprego das lipases na produção de biodiesel também é bastante estudado. Nesta reação são produzidos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, que podem ser empregados como combustível, sem a desvantagem de gerar óxidos de enxofre e de particulados. Comparado ao método químico, o método enzimático simplifica o procedimento para recuperação de ésteres etílicos e metílicos (biodiesel) e dos subprodutos gerados (glicerol), eliminando a geração de resíduos (Yang *et al.*, 2007).

Na indústria farmacêutica e química fina, o potencial das lipases é conferido pela sua característica de regio, enantio e quimiosseletividade, que

permite a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos (Cabral *et al.*, 2003).

As lipases são utilizadas no tratamento de resíduos domésticos, na limpeza de tubulações de esgotos, fossas sépticas e sumidouros e também para acelerar a biodegradação de polímeros e lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (Choudhury & Bhunia, 2015). A versatilidade das lipases, aliada ao desenvolvimento dos conhecimentos e técnicas associadas à biologia molecular dos microrganismos mostram que sua utilização será ampliada consideravelmente nos próximos anos. A Tabela 6 mostra as lipases comercialmente disponíveis no mercado (Barbosa, 2011; Freire & Castilhos, 2008).

Tabela 6. Exemplos de lipases comerciais disponíveis no mercado.

<b>Microrganismo produtor</b>	<b>Principal aplicação</b>	<b>Empresas que comercializam</b>
<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
<i>Candida antarctica</i>	Síntese orgânica	Boehringer Mannheim, Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo para detergentes	Boehringer Mannheim, Novozymes
<i>Rhizomucor miehei</i>	Processamento de alimentos	Biocatalysts, Amano, Boehringer Mannheim
<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese orgânica	Boehringer Mannheim, Fluka, Amano
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo para detergente	Genencor
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo para detergente	Genencor
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica	Asahi, Biocatalysts

Fonte: Messias, 2011.

O uso de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos de intensificar as restrições à poluição ambiental. No caso brasileiro, o controle ambiental é ainda mais relevante à preservação dos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constituem um ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade nacional no cenário mundial (Mendes & Castro, 2005).

### 3.6 Tratamento de efluentes com enzimas lipolíticas

Muitos estudos estão sendo realizados para a utilização de lipases no tratamento de efluentes como uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais. Águas residuais provenientes de laticínios, abatedouros, indústrias de produtos fritos contém óleo e graxa em quantidade significativa, o que não é propenso à degradação pelo tratamento de efluente convencional. A eliminação direta deste tipo de águas residuais por processos anaeróbios convencionais causa problemas graves. Assim, os lipídios tendem a aderir à superfície do lodo, o que limita o transporte de substratos solúveis para o microrganismo e reduz a eficiência operacional. Além disso, resulta na produção de espuma e odores desagradáveis. Portanto, estudos demonstram que o pré-tratamento deste tipo de efluente catalisado pela lipase permite melhoria notável na eficiência do tratamento convencional (Camarota & Freire, 2006; Li & Zong, 2010; Bueno, 2012; Alberton, 2009).

O tratamento de efluentes pode ser realizado por meio do uso de enzima purificada ou extrato enzimático bruto (caldo fermentado). A vantagem da utilização de enzima purificada reside no fato da enzima estar mais concentrada, possuindo atividade enzimática mais elevada que o extrato bruto. Porém o extrato enzimático apresenta baixo custo de produção, podendo ser produzido pela própria indústria (Ertugrul *et al.*, 2007, Robles *et al.*, 2000).

Nos estudos realizados por Jeganathan *et al.* (2007) com o pré-tratamento de águas residuais oleosas por lipase imobilizada, observou-se que a utilização da lipase imobilizada aumentou a biodegradabilidade dos efluentes, sendo a redução da DQO e de óleo e gordura de 49 e 45% sem pré-tratamento, e 65 e 64% com pré-tratamento, respectivamente. Além de poder reutilizar a lipase imobilizada por até quatro ciclos com uma atividade de 55%.



Lanciotti *et al.* (2005) trabalharam com 62 cepas de *Yarrowia lipolytica* de diferentes origens para o tratamento de efluentes de fábricas de azeite de oliva. Todas as 62 cepas estudadas demonstraram bom crescimento nos efluentes. Vinte dessas cepas foram selecionadas pelo maior potencial de crescimento, e foram incubadas no efluente por 72 h. Em seguida, foi analisada a eficiência da remoção de matéria orgânica nas amostras pela redução de DQO, obtendo-se valores entre 1,47 e 41,22 % de remoção. Nove das cepas selecionadas proporcionaram uma remoção maior que 20 %.

Prasad *et al.* (2010) avaliando as bactérias *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *S. marsescens*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* em consórcio para tratamento de efluente rico em lipídios obtiveram a redução da DBO do efluente de 3200 mg/L para 40 mg/L e os valores de lipídeos do efluente foram reduzidos de 25000 mg/L para 80 mg/L após 12 dias de incubação.

Desta forma, pode-se afirmar que a enzima lipase tem um grande potencial no tratamento de efluentes gordurosos tendo em vista sua grande especificidade e capacidade de hidrolisar os lipídeos presentes nesses efluentes.

### 3.7 Wetland

*Wetlands* construídos são um sistema de tratamento e polimento de esgotos envolvendo fenômenos físicos, químicos e biológicos. São áreas úmidas que utilizam plantas aquáticas em substratos feitos de materiais inertes como areia e cascalho. As interações entre planta e substrato formam um biofilme que abriga população de microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, nitrificação e desnitrificação. O processo físico envolve a sedimentação e a filtração das partículas em suspensão, sendo o maior responsável pela redução da DBO. O processo químico do tratamento envolve a adsorção, aglutinação e a precipitação, responsáveis pela remoção do fósforo e metais pesados. Além dos microrganismos, as macrófitas também desempenham um papel importante no que se refere à remoção de nutrientes e metais. (Sezerino *et al.*, 2015, Wendland & Chiarawatchai, 2006). A Figura 12 ilustra o funcionamento de uma *wetland* construída.

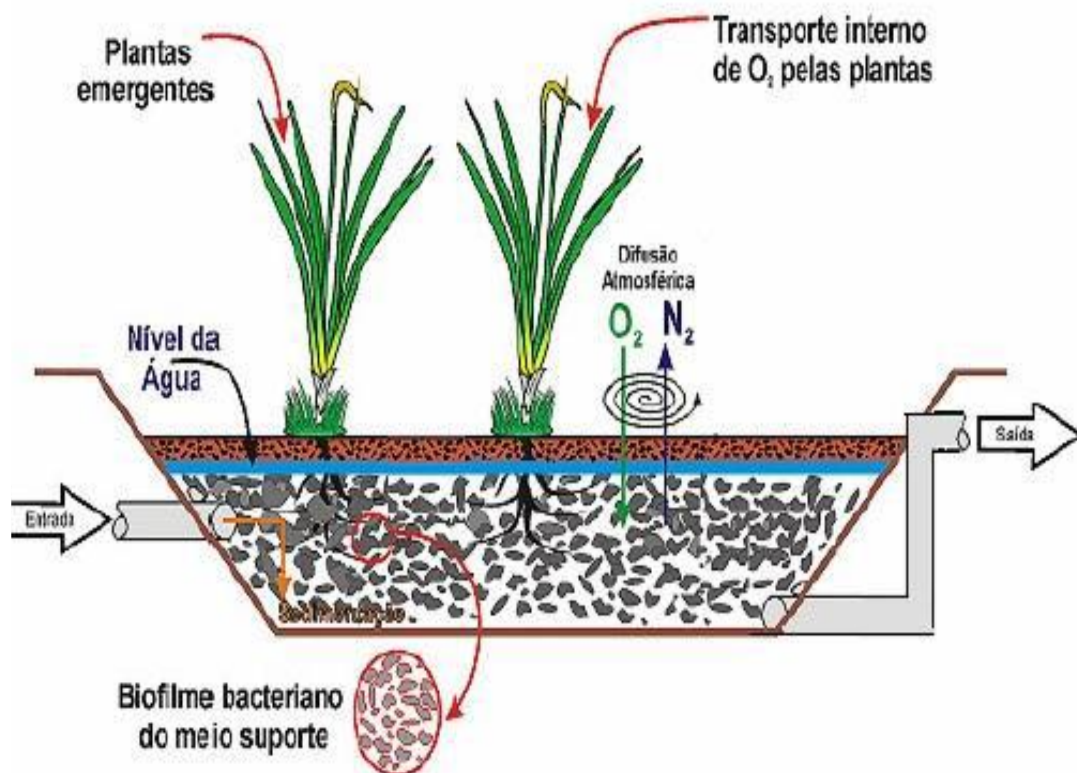


Figura 12. *Wetland* construída. Fonte: Leal, 2009.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Considerações gerais

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Campus Centro.

### 4.2 Local da coleta das amostras

O hotel que comporta o sistema de tratamento biológico fica localizado no Vale dos Vinhedos, no Município de Bento Gonçalves, RS. Esse hotel possui restaurante em suas dependências, sendo conhecido por ter em seu portfólio tratamentos vinoterápicos de relaxamento.

### 4.3 Microrganismos provenientes da *wetland*

Utilizaram-se 20 cepas provenientes do efluente de um sistema *wetland*, pertencentes à coleção do laboratório e armazenadas em glicerol em -20°C. As amostras foram inicialmente inoculadas em placas de Petri contendo ágar tripton de soja (TSA), pelo método de espalhamento em superfície e incubadas em estufa a 25°C e a 30°C por 24-48h. As colônias foram esgotadas em placas com TSA, para verificação da pureza das culturas através da análise visual das colônias e pela metodologia de coloração de Gram. Após, os isolados foram transferidos para tubos contendo TSA inclinado para posterior manipulação.

### 4.4 Microrganismos provenientes da caixa de gordura

Em frascos de vidro estéreis foram coletadas alíquotas do efluente proveniente da caixa de gordura do restaurante do hotel em dois pontos: efluente bruto na caixa de gordura (Figura 13 A) e o efluente tratado na caixa de saída do efluente (Figura 13 B). As amostras foram conservadas em gelo e levadas ao laboratório, onde foram realizadas diluições seriadas em água peptonada até a diluição de  $10^{-4}$ . As diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  foram inoculadas pelo método de espalhamento em superfície de placas contendo ágar TSA e incubadas em estufa a 25°C e a 30°C, por 48h.



Figura 13. (A) Caixa de gordura. Coleta do efluente bruto. (B) Coleta na saída do efluente tratado. Fonte: Autora.

Após o crescimento as colônias foram esgotadas em placas com TSA, para verificação da pureza através da análise visual e pelo método de Gram.

#### 4.5 Seleção dos microrganismos lipolíticos

Para selecionar os microrganismos produtores do complexo lipolítico, foram feitos ensaios em placa de Petri contendo meio de cultura conforme Kouker e Jaeger (1987) com modificações: peptona 0,5%, extrato de levedura 0,1%, NaCl 0,4%, ágar 1,5% e solução de Rodamina B 0,1%. O meio autoclavado foi resfriado a uma temperatura de aproximadamente 60°C, para a adição de 2,5% de azeite de oliva previamente esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Todos os isolados foram inoculados na forma de picada e incubados por até 72h em estufa nas temperaturas de 25°C e 30°C. O crescimento dos isolados foi avaliado diariamente e a hidrólise do óleo observada pela fluorescência de cor alaranjada nas colônias quando expostas a luz UV de 350 nm.

As bactérias que apresentaram crescimento significativo foram testadas novamente no mesmo meio de cultura, sem a adição de extrato de levedura, em uma condição menor de nutrientes, com objetivo de induzir a utilização do azeite e assim selecionar as melhores cepas produtoras da enzima. Todos os isolados foram inoculados na forma de picada e incubados por até 72h, a 25°C e a 30°C. Diariamente foram feitas as avaliações do crescimento e produção de enzimas conforme descrito anteriormente.

#### 4.6 Seleção dos microrganismos lipolíticos utilizando diferentes óleos

Para avaliar a capacidade de hidrólise de outros substratos, as bactérias com melhor crescimento no meio sem a adição de extrato de levedura, foram selecionadas e ensaiadas em meio de cultura contendo diferentes óleos vegetais como fontes de carbono.

Os óleos vegetais utilizados foram óleo de canola e óleo de semente de uva, ambos da marca Pазze. O meio de cultivo estéril utilizado era composto por peptona 0,5%, NaCl 0,4%, ágar 1,5%, rodamina B 0,1%. A este meio foi adicionado 2,5% dos óleos esterilizados por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , e vertidos em placa de Petri. Todos os isolados foram inoculados na forma de picada e incubados por até 72h em estufa a 25°C e a 30°C. As placas foram avaliadas diariamente, e a hidrólise do óleo foi determinada pela fluorescência de cor alaranjada nas colônias, quando expostas à luz UV de 350 nm.

#### 4.7 Identificação bioquímica

Para a identificação bioquímica, todos os isolados foram crescidos por 18-24h e corados pelo Gram para a confirmação da pureza. Uma vez verificado se os isolados eram Gram positivos ou negativos, os mesmos foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos: teste da oxidação/fermentação, utilização do citrato, fermentação da lactose e glicose, oxidase, prova da catalase, produção de H<sub>2</sub>S, indol e motilidade, produção de nitrato, vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), gelatina, uréia, bile esculina e celobiose. Também foi testado o crescimento em ágar MacConkey e em ágar cetrimida. A identificação bioquímica foi realizada conforme determinado na bibliografia especializada (Mac Faddin 2000; Bergey's, 2000).

#### 4.8 Cultivo submerso em agitador orbital

Com a cepa que apresentou maior fluorescência nos ensaios em placa com os três diferentes substratos, foram realizados ensaios em cultivo submerso.

Para o preparo do inóculo, o microrganismo selecionado foi crescido em placa com ágar TSA durante 12 horas em estufa a 30°C e com o auxílio de uma

alça de platina foi inoculado em Erlenmeyer de 150 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo contendo peptona 0,5%, NaCl 0,4%, acrescido de azeite de oliva 2,5% previamente filtrado. O frasco foi mantido em agitador orbital a 120 rpm e temperatura de 30°C por 12 horas.

Foram inoculados, em duplicata para cada ponto de coleta, 2,5 mL do inóculo em Erlenmeyers com 50 mL do meio de cultivo, acrescido de azeite de oliva, incubados a 30°C em agitador orbital a 120 rpm por 24h.

Foram retiradas assepticamente 3 mL de amostras do meio de cultura no tempo zero e a cada duas horas, até 24h. Uma alíquota de 1 mL foi utilizada para determinar a densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Uma alíquota de 1,5 mL em eppendorf foi centrifugada a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs, e imediatamente congelados e armazenados para os ensaios da atividade lipolítica. O mesmo procedimento e as mesmas condições foram repetidos para os óleos de canola e óleo de semente de uva.

#### 4.9 Cultivo submerso na presença de emulsionante

Para avaliar a produção enzimática na presença de emulsionante, foram feitos ensaios nas mesmas condições do item anterior, com adição de 0,01% de Tween 80, estéril, aos meios de cultivo.

#### 4.10 Cultivo submerso em biorreator

Os ensaios foram realizados em biorreator de bancada marca Braun modelo BIOSTAT B. (Figura 14).



Figura 14. Biorreator de bancada usado no ensaio. Fonte: Autora.

Todos os procedimentos e as condições usadas foram iguais nos ensaios com o substrato azeite de oliva, óleo de canola e óleo de semente de uva.

O meio de cultura utilizado no cultivo submerso no biorreator foi preparado usando peptona 0,5%, NaCl 0,4%, Tween 80 0,01%, em um volume de 1,5 litro. O frasco do biorreator contendo o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm, por 30 minutos, 24 horas antes do início do ensaio. Como fonte de carbono utilizou-se 2,5% de azeite de oliva filtrado estéril. O inóculo foi preparado utilizando o mesmo meio de cultura usado no biorreator, incubado a 30° por 12 h sob agitação de 120 rpm. O volume do inóculo utilizado no ensaio foi de 5%.

No biorreator, a temperatura utilizada foi de 30°C, a aeração mantida em 1,5 vvm com ar estéril e agitação de 300 rpm. Devido à presença do óleo de oliva e do Tween 80 como indutores e à produção de complexos lipolíticos pelo microrganismo não foi necessária a utilização de antiespumante durante o processo. Amostras de 10 ml foram retiradas no tempo zero e a cada duas horas, durante 24 horas. Com as amostras foi determinada a densidade ótica em 540 nm, o pH da amostra e avaliada a atividade lipolítica, conforme descrito no item 4.11.

#### 4.11 Atividade lipolítica por espectrometria

A atividade lipolítica foi determinada por espectrofotometria usando *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato, de acordo com o método descrito por Winkler & Stuckmann (1979). Adicionou-se 0,1 mL do sobrenadante da amostra a 0,9 mL de uma solução contendo 3 mg de pNPP dissolvido em 1 mL de álcool isopropílico, e diluído em 9 mL de uma solução contendo Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, 2 mg de Triton X-100 e 0,5 mg de goma arábica. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro em de 410 nm. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 micromol de *p*-nitrofenol (p-NP) em 1 minuto, por mL de sobrenadante nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A equação de hidrólise do pNPP está demonstrada na Figura 15.

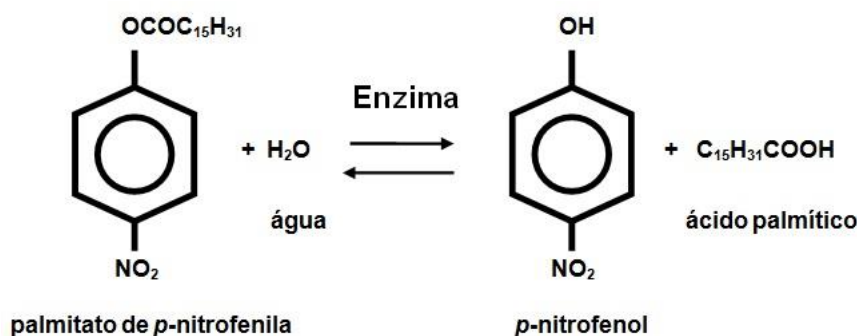


Figura 15. Equação química da reação do palmitato de *p*-nitrofenila. Fonte: Autora.

#### 4.12 Identificação molecular

Foi realizada a identificação molecular do isolado bacteriano que apresentou maior fluorescência com os três substratos utilizados nos ensaios e análises deste trabalho.

##### 4.12.1 Extração de DNA

A extração do DNA realizou-se pelo método de aquecimento em termociclador. A amostra do microrganismo crescida em TSB por 18 h a 30°C foi colocada em microtubos, e estes submetidos ao termociclador a 100°C por 10 minutos. Após, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante utilizado para avaliar a qualidade do DNA extraído em espectrofotômetro Nanodrop.



#### 4.12.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para amplificação da região 16S do DNA ribossomal, foram empregados os *primers* 8F 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' (Turner et al.,1999) e 1544R 5' AGAAAGGAGGTGATCCAGCC 3' (Dorsch and Stackebrandt, 1992). A amplificação foi realizada em volume final de 25 µL e foi utilizado na reação 15,8 µL de água miliq, 2,5 µL de tampão (10X), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1 µL de BSA (1 mg/mL), 1 µL de desoxinucleotideo trifosfato (1mM), 1 µL de primer 8F (10 pmol), 1 µL de primer 1544R (10 pmol) e 0,2 µL de taq polimerase (5 U/ µL) e 1 µL de DNA (50 ng/µL). A amplificação foi realizada em um termociclador programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos.

#### 4.12.3 Eletroforese em gel de agarose

O fragmento obtido através da técnica da PCR foi observado em gel de agarose 1%. O gel foi submetido a uma ddp de 80 Volts em tampão TAE 1X por um período de 45 minutos e os fragmentos visualizados em transiluminador sob luz ultra violeta no equipamento MS Major Science, Smart View Pro 1200 Imager System.

O produto da amplificação foi purificado utilizando-se o Kit PCR Products Purification Kit (Ludwig Biotec). O sequenciamento foi realizado na empresa Ludwig Biotec utilizando equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A sequência obtida foi comparada com as sequências disponíveis no BLAST/NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 4.13 Determinação da massa molecular da lipase

#### 4.13.1 Eletroforese em gel de poli-acrilamida

Para determinar a massa molecular da lipase produzida pelo isolado, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida 12% (SDS-PAGE). Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao tampão de amostra (Anexo 1, item 1.1) na proporção de 1:1 e colocadas em banho de água a 100°C durante 5 minutos.

Uma alíquota de 35 µL da amostra foi aplicada no gel. Foi utilizado 5 µL do marcador de massa molecular BenchMarck™ Protein Ladder (Invitrogen), diluído 1:10, que apresenta proteínas na faixa de 10 a 220 kDa. A migração eletroforética foi realizada em tampão Tris-glicina (Anexo 1, item 1.5) a 50 mA, 100V, por 2 horas. Após, o gel foi corado pelo método do nitrato de prata, segundo Alfenas (1998).

#### 4.13.2 Revelação do gel de poliacrilamida

Depois de terminada a eletroforese, o gel foi lavado rapidamente com água destilada. O gel foi mantido no pré-fixador 1 (Anexo 1, item 1.6) por 4 horas, em seguida o gel ficou *overnight* no pré-fixador 2 (Anexo 1, item 1.7). Após, o gel foi lavado com água destilada durante 15 minutos e ficou no pré-fixador de glutaraldeído (Anexo 1, item 1.8) por 45 minutos. Foram feitos três enxágues com água destilada, por 15 minutos e em seguida, lavado com uma solução de etanol (Anexo 1, item 1.9) por duas vezes, durante 15 minutos cada enxágue. A coloração com a solução de prata amoniacal (Anexo 1, item 1.11) foi feita durante 60 minutos no escuro. Transcorrido o tempo, foram feitas lavagens com solução de etanol, duas vezes por 15 minutos, no escuro. Após, a solução aquosa de etanol foi removida e adicionada a solução reveladora (Anexo 1, item 1.12), na presença de luz. As bandas de proteína apareceram entre 1 e 2 minutos após a adição da solução reveladora. Em seguida, a solução reveladora foi removida e adicionada a solução de inativação durante 2 horas. (Anexo 1, item 1.13).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Seleção dos microrganismos lipolíticos

Os microrganismos isolados da *wetland* e da caixa de gordura foram crescidos em placas contendo meio de cultura, o indicador rodamina, tendo como substrato o azeite de oliva (20 isolados do efluente bruto e tratado da *wetland* e 45 isolados do efluente bruto e tratado da caixa de gordura), 29 foram positivos para a lipase, pois apresentaram halo fluorescente alaranjado quando expostos à luz UV com comprimento de onda de 350 nm. Destes, 7 eram oriundos da *wetland* e 22 da caixa de gordura.

Esses 29 isolados foram submetidos novamente a ensaios de crescimento em placa com meio de cultura contendo menos nutrientes. Destes, 12 isolados apresentaram atividade lipolítica. A Tabela 7 apresenta os isolados selecionados no ensaio. Os isolados crescidos em temperatura de 25°C, W6, G34 e G40, apresentaram intensidade média de fluorescência em placa contendo menos nutrientes, suplementado com azeite de oliva. Os isolados W13, W19, G33, G35, G39, G41, G49, G56 e G57 apresentaram baixa intensidade de fluorescência em placa quando expostos à luz UV. Quando crescidos na temperatura de 30°C, os isolados W6, G33, G34, G35 e G40 apresentaram alta intensidade de fluorescência, os isolados W13, W19, G39, G41 e G49 apresentaram média intensidade de fluorescência, e os isolados G56 e G57 apresentaram baixa intensidade de fluorescência.

Tabela 7. Resultados da observação quantitativa da fluorescência dos isolados, cultivados em meio com menos nutrientes, incubados a 25°C e 30°C por 72h, com azeite de oliva como substrato e Rodamina B como indicador.

Local da coleta	Isolado	25°C	30°C
<i>Wetland</i>	W6	++	+++
	W13	+	++
	W19	+	++
Caixa de gordura	G33	+	+++
	G34	++	+++
	G35	+	+++

G39	+	++
G40	++	+++
G41	+	++
G49	+	++
G56	+	+
G57	+	+

Intensidade da fluorescência: (+) baixa intensidade, (++) média intensidade, (+++) alta intensidade.

## 5.2 Seleção dos microrganismos utilizando diferentes óleos

Os 12 isolados com melhor atividade lipolítica em placa com azeite de oliva como substrato, foram avaliados nas mesmas condições usando óleo de canola e óleo de semente de uva como substrato.

Na temperatura de 25°C com o óleo de semente de uva, os isolados G35 e G40 apresentaram média intensidade de fluorescência em placa. Os isolados W6, W13, W19, G33, G34, G39, G41 e G57 apresentaram baixa intensidade de fluorescência, e os isolados G49 e G56 não apresentaram fluorescência (Tabela 8).

Na temperatura de 30°C com o óleo de semente de uva, os isolados G33, G35 e G40 apresentaram alta intensidade da fluorescência. Os isolados W6, W13, W 19, G34, G39 e G41 apresentaram média intensidade e os isolados G49, G56 e G57 apresentaram baixa intensidade (Tabela 8).

No ensaio em placa usando como substrato óleo de canola a 25°C, os isolados W6 e G40 apresentaram média intensidade fluorescente, os isolados W13, W19, G33, G34, G35, G39, G41 e G57 apresentaram baixa intensidade de fluorescência e o isolado G56 não apresentou fluorescência (Tabela 8). Na temperatura de 30°C com o substrato óleo de canola, o isolado G34 apresentou maior fluorescência. Os isolados W6, W13, W19, G33, G35, G40, G41 e G49 apresentaram média intensidade fluorescente e os isolados G39, G56 e G57 apresentaram baixa intensidade fluorescente quando expostos à luz UV.

Tabela 8. Isolados submetidos ao ensaio em placa com os substratos óleo de semente de uva e óleo de canola com indicador Rodamina B a 25°C e 30°C, durante 72h.

Local da coleta	Isolado	Óleo de semente de uva		Óleo de canola	
		25°C	30°C	25°C	30°C
Wetland	W6	+	++	++	++
	W13	+	++	+	++
	W19	+	++	+	++
Caixa de gordura	G33	+	+++	+	++
	G34	+	++	+	+++
	G35	++	+++	+	++
	G39	+	++	+	+
	G40	++	+++	++	++
	G41	+	++	+	++
	G49	-	+	+	++
	G57	+	+	+	+

Intensidade da fluorescência: (+) baixa intensidade, (++) média intensidade, (+++) alta intensidade.

Os isolados crescidos na temperatura de 30°C evidenciou-se uma maior fluorescência quando comparados ao crescimento à temperatura de 25°C. O isolado que apresentou maior fluorescência e mais evidente nos três substratos foi o identificado como G40 (Figura 16).

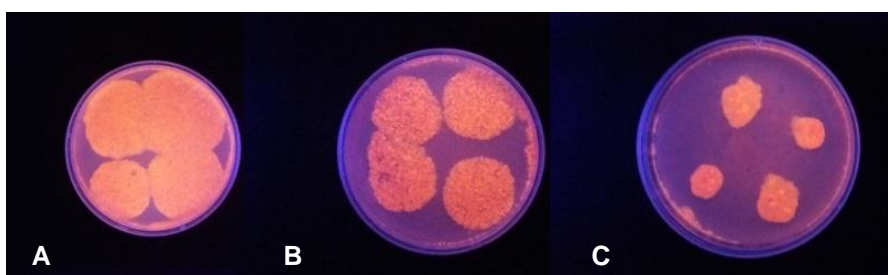


Figura 16. Isolado G40. (A) cultivo em azeite de oliva, (B) cultivo em óleo de semente de uva e (C) cultivo em óleo de canola a 30°C durante 72h. Fonte: Autora.

### 5.3 Identificação bioquímica.

Os isolados utilizados nos ensaios no presente trabalho foram submetidos a testes bioquímicos (Tabela 9) para sua identificação. Todos os isolados são Gram negativos, sendo seis com forma de bacilos e seis cocobacilos. Destes, quatro isolados foram identificados como sendo do gênero *Enterobacter*, três do gênero *Burkholderia*, dois do gênero *Acinetobacter*, dois do gênero *Pseudomonas* e um isolado do gênero *Klebsiella*. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9. Caracterização morfológica e bioquímica dos 12 isolados.

Isolado	Forma celular	Gram	Cit	Cat	Oxid	Lac	O/F	Nit	VM/VP	Ind	H <sub>2</sub> S	Mot	Gli	Gelat	Ure	Esc	Cel	MC	Cet
W6	Bacilo	-	+	+	-	+	+/+	-	-/+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
W13	Bacilo	-	+	+	-	+	-/+	+	-/+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
W19	Coco bacilo	-	+	+	-	-	-/-	-	-/-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
G33	Coco bacilo	-	+	+	-	+	-/+	+	-/+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
G34	Bacilo	-	+	+	-	+	+/-	+	+/-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
G35	Coco bacilo	-	+	+	-	+	-/+	+	+/+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
G39	Bacilo	-	+	+	-	+	+/-	+	-/-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
G40	Coco bacilo	-	+	+	-	+	+/-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
G41	Coco bacilo	-	+	+	-	+	-/-	-	-/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
G49	Coco bacilo	-	+	+	-	+	-/+	-	-/+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
G56	Bacilo	-	+	+	-	+	-/+	+	+/+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
G57	Bacilo	-	+	+	-	+	+/-	+	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-

Cit: citrato; Cat: catalase; Oxid: oxidase; Lac: lactose; O/F: oxidação/fermentação; Nit: nitrato; VM/VP: vermelho de metila/VogesProskauer; Ind: indol; H<sub>2</sub>S: produção de H<sub>2</sub>S; Mot: motilidade; Gli: glicose; Gelat: gelatina; Ure: uréia; Esc: esculina; Cel: celobiose; MC:MacConkey; Cet:cetrimida.

Tabela 10. Identificação bioquímica dos 12 isolados.

<b>Isolado</b>	<b>Identificação bioquímica</b>
W6	<i>Klebsiella</i> sp.
W13	<i>Enterobacter</i> sp.
W19	<i>Pseudomonas</i> sp.
G33	<i>Enterobacter</i> sp.
G34	<i>Burkholderia</i> sp.
G35	<i>Pseudomonas</i> sp.
G39	<i>Burkholderia</i> sp.
G40	<i>Acinetobacter</i> sp.
G41	<i>Acinetobacter</i> sp.
G49	<i>Enterobacter</i> sp.
G56	<i>Enterobacter</i> sp.
G57	<i>Burkholderia</i> sp.

#### 5.4 Cultivo submerso em agitador orbital

Foram realizados ensaios em cultivo submerso com o isolado G40 identificado bioquimicamente como *Acinetobacter* sp., pois este foi o isolado que apresentou fluorescência mais alta nos ensaios de crescimento em placa com os três diferentes substratos analisados.

##### 5.4.1 Curva de crescimento

Ensaio em cultivo submerso foram realizados contendo azeite de oliva, óleo de canola e óleo de semente de uva ambos com e sem a presença do indutor Tween 80 para avaliar o crescimento do microrganismo nesses meios. Os microrganismos cresceram em agitador orbital a 120 rpm a 30°C durante 24 horas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 17. No meio de cultura com a presença dos óleos e Tween 80 como indutor, o microrganismo apresentou um crescimento mais rápido e constante demonstrando que a quantidade de indutor testada foi suficiente para emulsionar a solução e não foi tóxico ao microrganismo na quantidade testada.



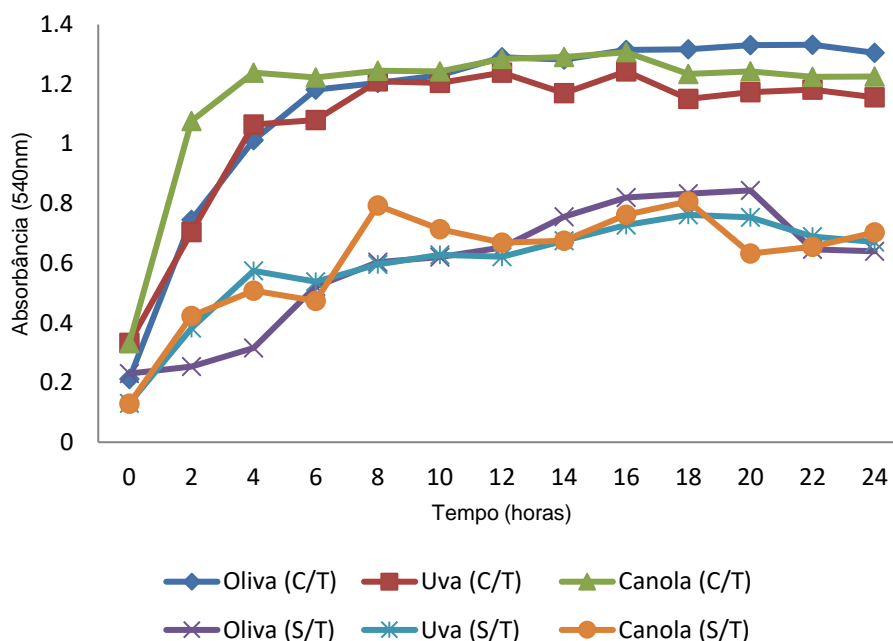


Figura 17. Curvas de crescimento do isolado G40 crescido em cultivo submerso suplementado com azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola com e sem Tween 80. C/T: Com Tween 80, S/T: Sem Tween 80.

#### 5.4.2 Atividade enzimática

O ensaio para avaliar a atividade enzimática foi conduzido em agitador orbital a 120 rpm, durante 24 horas e a atividade lipolítica determinada usando como substrato o pNPP nos três substratos, com e sem a adição do emulsionante. O meio de cultivo com adição de Tween 80 apresentou maior atividade enzimática do que no meio de cultivo sem a adição do emulsionante (Figura 18). Em ambos ensaios e nos três substratos avaliados o tempo com a atividade máxima da enzima foi em 16 horas de cultivo. O ensaio utilizando azeite de oliva com Tween 80 obteve a maior atividade enzimática com  $0,141 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , seguida pelo óleo de semente de uva com  $0,113 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e óleo de canola com  $0,079 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A atividade enzimática no ensaio em meio de cultivo nos três substratos sem a adição do Tween 80 apresentou valores bastante próximos de produção da lipase (Figura 18).

As maiores médias obtidas na produção da enzima lipase, foram observadas nos ensaios com a adição do emulsionante Tween 80 e com azeite de oliva no meio de cultivo ( $0,116 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), seguida pelo óleo de semente de uva ( $0,075 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e pelo óleo de canola ( $0,067 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). A média baixa

da atividade enzimática verificada nos ensaios sem a adição de Tween 80 no meio de cultivo, não apresentou diferença significativa entre os três substratos. Os resultados mostram que a média de atividade enzimática no meio de cultivo com azeite de oliva atingiu  $0,022 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , e as médias de atividade enzimática com o óleo de semente de uva e óleo de canola foram ambas de  $0,021 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Tabela 11).

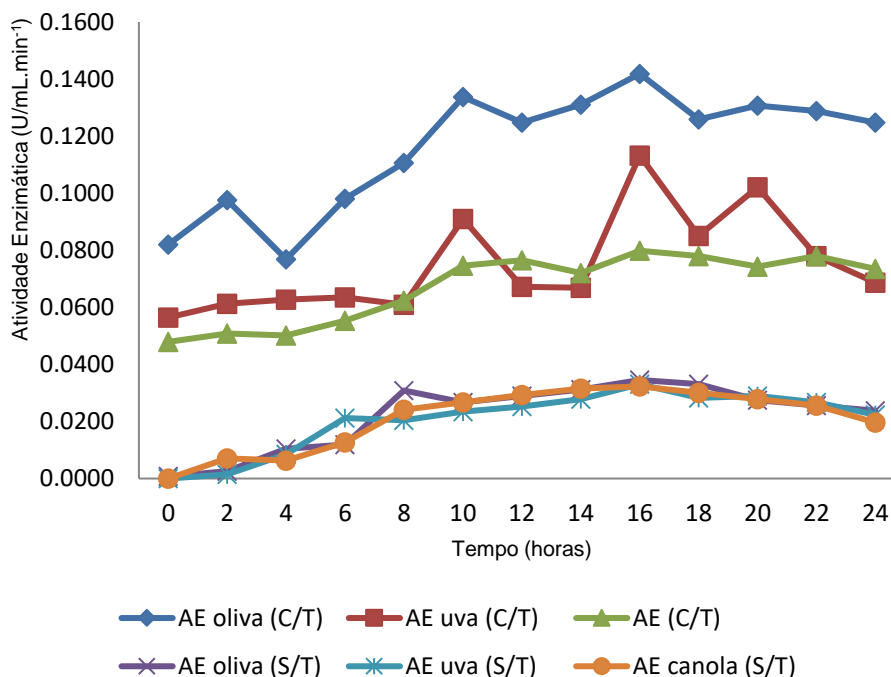


Figura 18. Atividades enzimáticas com os substratos azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola, com e sem a adição de Tween 80, obtidas em agitador orbital a 120 rpm durante 24 horas. AE: Atividade Enzimática, C/T: Com Tween 80, S/T: Sem Tween 80.

Tabela 11. Estatística descritiva dos dados de atividade enzimática determinada em agitador orbital com óleo de semente de uva, azeite de oliva e óleo de canola como substrato, com e sem indutor Tween 80, em cultivos durante 24 horas à  $30^{\circ}\text{C}$ .

Cultivo Submerso	Substrato	N	Média	DP	Mín.	Máx.	Soma
Agitador orbital com	Óleo de semente de uva	13	0,075	0,018	0,056	0,113	0,977

Tween 80	Azeite de oliva	13	0,116	0,021	0,077	0,142	1,507
	Óleo de canola	13	0,067	0,012	0,048	0,08	0,873
Agitador orbital sem Tween 80	Óleo de semente de uva	13	0,021	0,011	0,000	0,033	0,267
	Azeite de oliva	13	0,022	0,012	0,001	0,035	0,288
	Óleo de canola	13	0,021	0,011	0,000	0,032	0,273

DP: Desvio Padrão; Mín.: Mínimo; Máx.: Máximo; t: tempo em horas.

## 5.5 Cultivo submerso em biorreator

O cultivo submerso em biorreator foi realizado à temperatura de 30°C, com aeração de 1vvm e agitação de 300 rpm, utilizando como diferentes substratos o azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola, pelo período de 24 horas.

### 5.5.1 Atividade enzimática em cultivo submerso no biorreator

A melhor atividade enzimática foi observada no tempo 12 horas nos três substratos avaliados. A melhor atividade enzimática foi do azeite de oliva com 0,358 U/mL.min<sup>-1</sup>, seguida pelo óleo de semente de uva com 0,352 U/mL.min<sup>-1</sup> e pelo óleo de canola com 0,348 U/mL.min<sup>-1</sup> (Figura 19).

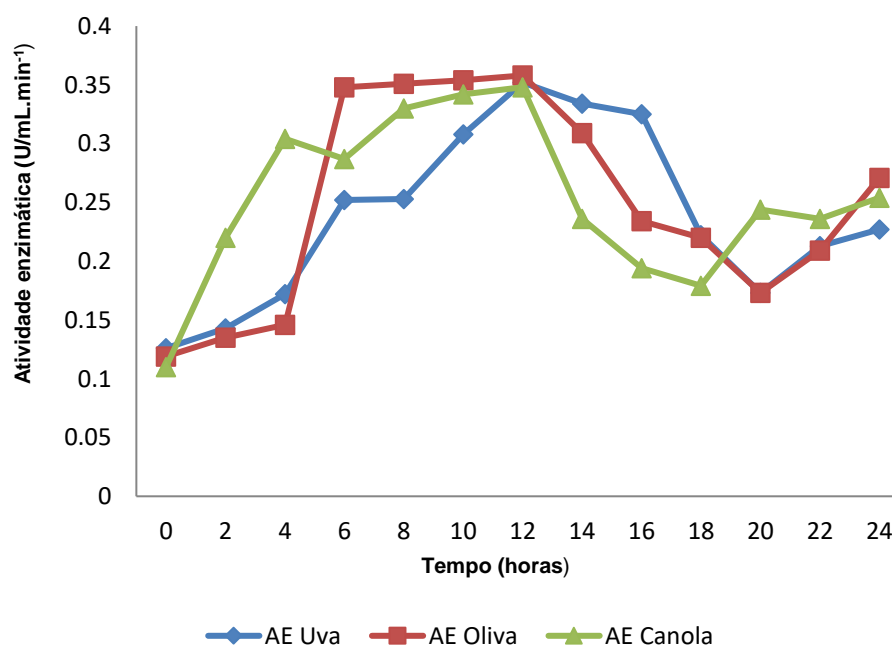


Figura 19. Atividade enzimática dos substratos azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola em cultivo submerso em biorreator a 30°C.

### 5.5.2 Crescimento celular e atividade enzimática

Nos três substratos avaliados observa-se o crescimento celular acentuado nas primeiras duas horas de ensaio. Após, o crescimento celular passa para a fase estacionária onde a atividade enzimática é mais elevada, e a partir das 22 horas começa a fase de declínio celular. As Figuras 20, 21 e 22 apresentam o crescimento celular versus a atividade enzimática no cultivo em biorreator utilizando azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola respectivamente.

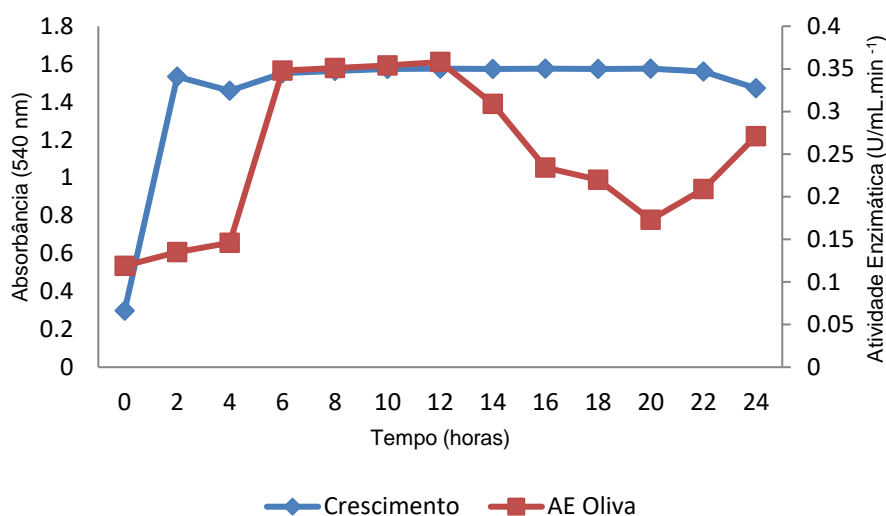


Figura 20. Crescimento celular versus atividade enzimática em biorreator suplementado com azeite de oliva. AE: Atividade Enzimática.

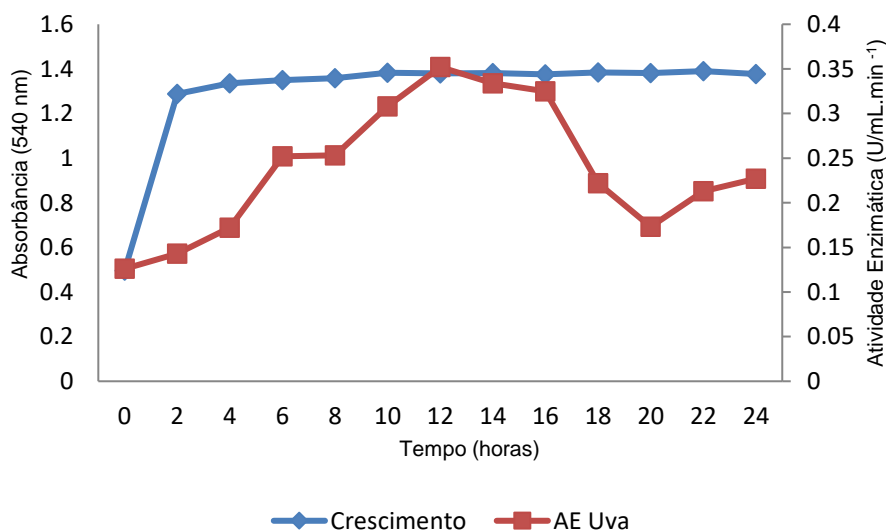


Figura 21. Crescimento celular versus atividade enzimática em biorreator suplementado com óleo de semente de uva. AE: Atividade Enzimática.

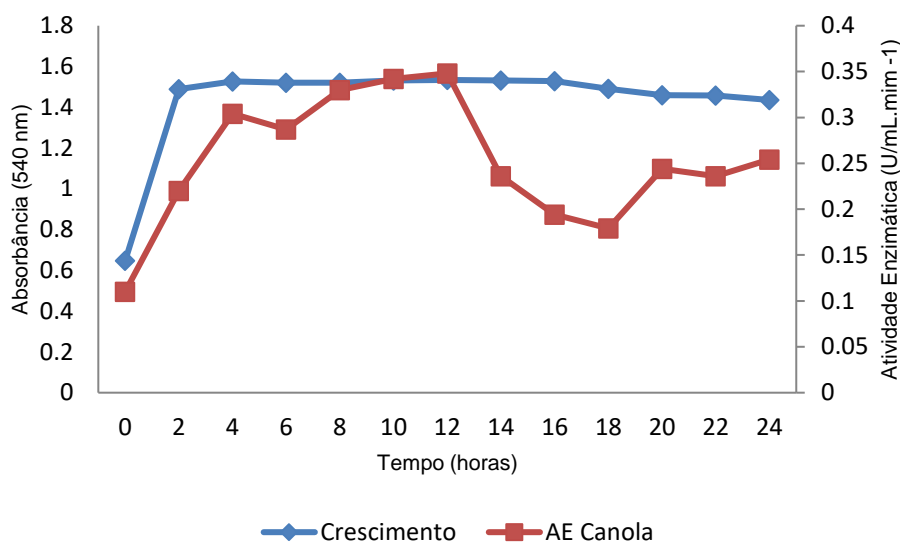


Figura 22. Crescimento celular versus atividade enzimática em biorreator suplementado com óleo de canola. AE: Atividade Enzimática.

A produtividade máxima foi calculada como sendo a relação entre as atividades enzimáticas máxima e a inicial alcançada nos ensaios no biorreator e no agitador, em cada substrato utilizado e o seu respectivo tempo de fermentação em que foi observada a atividade enzimática máxima. No biorreator, a produtividade máxima foi obtida nos substratos óleo de oliva e óleo de canola ( $0,02 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e no óleo de semente de uva ( $0,019 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), em média 85% a mais que a produtividade no agitador, sendo no óleo de oliva e óleo de semente de uva  $0,004 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e no óleo de canola  $0,002 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

### 5.5.3 pH

O pH de cada alíquota amostral foi determinado ao longo de todo o ensaio. O pH inicial do meio foi de 6,5, registrando-se uma discreta elevação nas primeiras duas horas de ensaio. Assim, o cultivo com azeite de oliva apresentou pH 7,07, o óleo de semente de uva pH 7,12 e o óleo de canola pH 6,88. Os valores de pH decaíram com todos os substratos a partir da quarta hora, mas mantiveram-se constantes até a décima oitava hora (Figura 23).

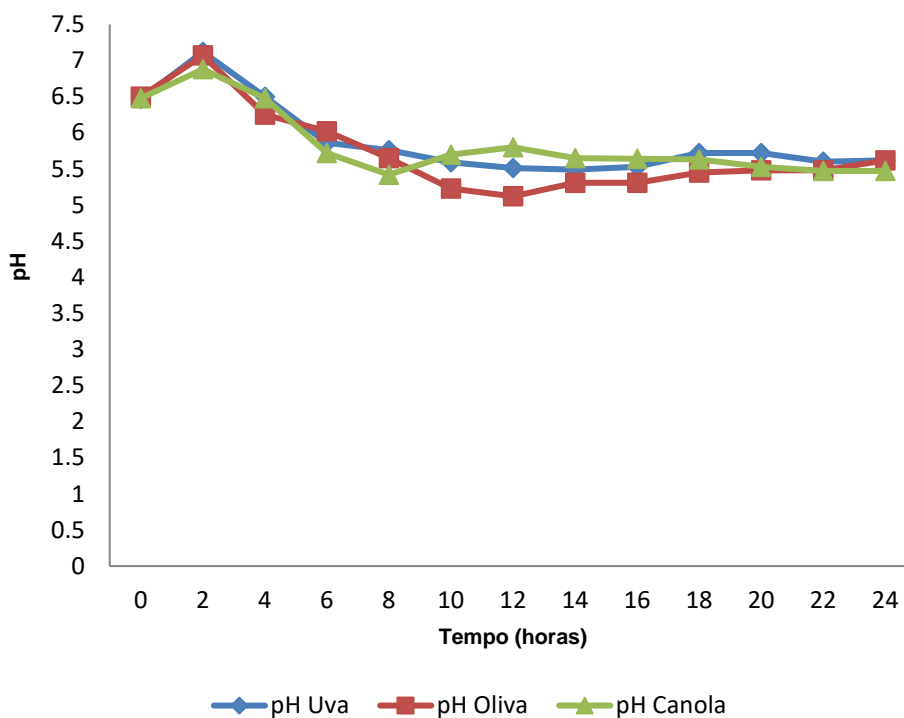


Figura 23. Variação do pH dos ensaios com azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola durante 24 horas em biorreator.

### 5.6 Identificação molecular

A identificação molecular do isolado G40 através do sequenciamento de fragmento da região 16S do DNA ribossomal confirmou a identificação bioquímica realizada previamente. Após a sequência ter sido comparada com as sequências homólogas depositadas no GenBank, o isolado G40 apresentou 98% de identidade com bactérias do gênero *Acinetobacter baylyi*.

### 5.7 Determinação da massa molecular

A análise de proteínas foi realizada através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Conforme observado na Figura 24 a coloração do gel revelou a presença de uma banda com peso molecular aproximado de 35 kDa.

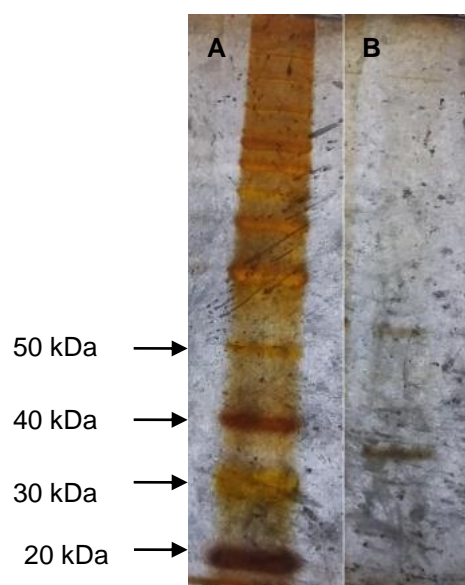


Figura 24. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). Em A: marcador de peso molecular, B: amostra contendo a enzima lipase. Fonte: Autora.

## 6. DISCUSSÃO

Os doze isolados oriundos da *wetland* e da caixa de gordura selecionados por apresentar melhor crescimento em meio com menos nutrientes nos três substratos, representam uma pequena fração da enorme diversidade de bactérias lipolíticas que podem ser isoladas do ambiente com o intuito de utilizá-las para produção de enzimas com finalidades biotecnológicas.

Musa & Tayo (2012) com o objetivo de identificar e caracterizar microrganismos produtores de lipase, isolaram 13 gêneros de bactérias lipolíticas em amostras de solo contaminado com óleos diversos, comida deteriorada e outros resíduos. Os gêneros de bactérias encontradas nestas amostras foram: *Acinetobacter* sp., *Yersinia* sp., *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Acidomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. e *Citrobacter* sp. Ankit *et al.* (2011) pesquisando microrganismos lipolíticos para utilização industrial, isolaram bactérias lipolíticas do gênero *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. de amostras de água com alta contaminação por óleo em vários rios da região de Bhopal, Índia.

Odeyemi *et al.* (2013) pesquisando o potencial de biodegradabilidade de microrganismos lipolíticos frente ao óleo de palma como substrato, encontraram 32 bactérias lipolíticas agrupadas nos gêneros *Enterococcus* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. e *Staphylococcus* sp., isoladas da água residual de restaurante e da água de lavatórios de mãos.

As 12 cepas lipolíticas selecionadas neste trabalho foram determinadas como Gram negativas, o que está de acordo com as pesquisas de diversos autores, os quais afirmam que a maioria das bactérias lipolíticas encontradas na natureza são Gram negativas (Dharmsthiti & Kuhasuntissak, 1999). Alguns autores descrevem que bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. apresentam maior produção extracelular de enzimas lipolíticas, comparadas com outras bactérias lipolíticas. Embora algumas bactérias lipolíticas sejam Gram positivas, como é o caso dos gêneros *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Clostridium* sp., a sua atividade lipolítica é menos expressiva do que a das bactérias Gram negativas (Rousenau & Jaeger, 2000).

Lipases extracelulares bacterianas são influenciadas por fatores nutricionais e fisiológicos como temperatura, pH e fontes de carbono. Neste



trabalho a temperatura ótima para produção de enzimas foi de 30°C. Entretanto, alguns autores mostram que as lipases bacterianas podem apresentar atividade ótima de produção em baixas e altas temperaturas, como mostra o trabalho de Ugras & Uzmez (2016), onde foi observado o máximo de atividade enzimática na temperatura de 40°C. Por outro lado, Pratuandekul & Dharmsthiti (1999) em sua pesquisa com *Acinetobacter calcoaceticus*, isolados de leite cru e cultivados em temperaturas entre 0 e 30°C, obtiveram a máxima atividade lipolítica detectada após 48 horas de cultivo na temperatura de 15°C. O valor encontrado foi três vezes maior do que a atividade enzimática após 24 horas de cultivo na temperatura de 30°C. Isso ressalta a importância de mais estudos da produção enzimática em diferentes temperaturas para otimizar a produção de enzimas lipolíticas para um melhor rendimento de produção.

A atividade lipolítica do presente estudo foi avaliada no intervalo de tempo entre 0 a 24 horas de cultivo. Os resultados demonstram que em agitador orbital o máximo de produção foi obtida após 16 horas de cultivo na temperatura de 30°C, e no cultivo em biorreator ocorreu após 12 horas de cultivo na mesma temperatura. Este resultado é similar ao encontrado por Anbu *et al.* (2011) no qual isolaram *Acinetobacter junii* de um solo contaminado com óleo na Coréia do Sul, e onde a melhor atividade enzimática foi observada depois de 12 horas de incubação na temperatura de 30°C. Gururaj *et al.* (2016), encontraram no trabalho também com bactérias do gênero *Acinetobacter* sp., a máxima atividade enzimática após 16 horas de incubação na temperatura de 30°C. Considerando os valores de máxima atividade lipolítica encontrada no presente trabalho, pode-se afirmar que a mesma é satisfatória, pois o microrganismo isolado tem a capacidade para a produção de lipase em um curto período de tempo. Deve-se considerar também que algumas bactérias requerem mais de 24 horas, ou até mesmo dias para atingirem o máximo de atividade lipolítica, característica que para fins industriais deve ser bem ponderada, pois para essa aplicação são preferíveis cepas que apresentem maior atividade enzimática em menos tempo de incubação (Niyonzima *et al.*, 2014; Orlandelli, 2012).

Um dos fatores mais importantes para o aumento da atividade lipolítica é a fonte de carbono, pois essas enzimas são indutivas e seus substratos preferenciais são os ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa (mais de

dez carbonos), como o ácido oléico (C18:1) encontrado em maior quantidade no azeite de oliva (78%). A quantidade de ácido oléico nos outros óleos testados nesse trabalho é de 56% no óleo de canola e 9% no óleo de semente de uva. Vários estudos confirmam uma alta produção de lipase em meios de cultivo na presença de azeite de oliva em uma concentração de 0,1% a 3% (Silva, 2013; Oliveira *et al.*, 2014, Feitosa *et al.*, 2010; Sooch & Kauldhar, 2013; Iqbal & Rehman, 2015). Quian & Yun (2009) em seus estudos relataram o aumento de 4% na atividade lipolítica na presença de óleo de oliva.

Dandavate *et al.* (2009) avaliaram o efeito dos óleos de mamona, oliva, milho e amendoim na produção de lipase por bactérias do gênero *Burkholderia*. A melhor produção foi observada no cultivo com óleo de oliva. Rodriguez *et al.* (2006) observaram que o uso de óleo de milho, óleo de amêndoa, óleo de amendoim, óleo de semente de uva, óleo de girassol e azeite de oliva para suplementar o bagaço de cana-de-açúcar, induziram a produção de altas taxas de lipase por *Rhizopus homothallicus*. Kobori & Jorge (2005) compararam diversos óleos vegetais como oliva, soja, canola, girassol, semente de algodão como substratos para lipase, e entre estes óleos o azeite de oliva promoveu a máxima produção da enzima. Sharma *et al.* (2001), entre outros autores, referenciam o azeite de oliva como componente barato e eficiente para análises de lipases e um bom substituto para substratos sintéticos, que geralmente são mais caros.

A peptona como fonte de nitrogênio usada neste trabalho, também é uma indutora da produção de lipase. Segundo Sharma *et al.* (2001), a peptona e o extrato de levedura apresentam-se como as melhores fontes nitrogenadas para lipases microbianas quando comparados às outras fontes como extrato de carne, triptona ou farelo de trigo.

Não houve diferença na atividade enzimática no cultivo submerso em biorreator nos três diferentes substratos avaliados. Este resultado é satisfatório, pois sugere que qualquer um desses substratos pode ser utilizado como fontes nutricionais alternativas e de baixo custo para a produção da lipase.

A utilização do emulsionante Tween 80 no ensaio de cultivo submerso em agitador orbital mostrou melhor crescimento do que no ensaio sem a utilização do emulsionante Tween 80. O surfactante Tween em pequenas

quantidades ajuda a dispersar homoganeamente o óleo pelo meio de cultivo, tornando o lipídeo mais acessível ao microrganismo. Também pode aumentar a permeabilidade celular aumentando dessa forma a secreção de diversas moléculas através da membrana celular (Silva *et al.*, 2005). Segundo Ramani *et al.* (2010), a adição de surfactantes no meio de cultivo pode aumentar tanto a atividade quanto a estabilidade da enzima. Em quantidades maiores, esse emulsificante torna-se uma das fontes de carbono lipídicas disponíveis ao microrganismo, atuando também como um indutor que aumenta a produção da lipase, pois apresenta ácidos graxos em sua composição.

O pH do ensaio nos três substratos no biorreator, nas duas primeiras horas aumentou e a partir da quarta hora de incubação decaiu. Fazendo a comparação com a curva de crescimento de cada ensaio observa-se que nas duas primeiras horas houve um aumento considerável no crescimento celular (fase exponencial) e após a curva de crescimento passa para a fase estacionária. Presume-se que o aumento do pH do meio nas duas primeiras horas seja devido ao crescimento bacteriano, onde na fase exponencial tem-se o período de maior atividade metabólica. Na quarta hora, o pH diminui, pois há o consumo de carbono, gerando metabólitos ácidos excretados para o meio externo das células bacterianas. Nessa fase há a síntese de vários metabólitos secundários, como as enzimas lipolíticas. Alguns autores observaram que a produção de lipase e o crescimento microbiano são fatores independentes e a maior produção de enzima foi observada na fase estacionária de crescimento (Almeida, 2012; Benjamin & Pandey, 2000; Nascimento & Martins, 2006).

No presente trabalho, a produção máxima de lipase após 12 horas de cultivo, apresentou pH do meio de cultivo de 5,51, 5,12 e 5,8 para os substratos óleo de semente de uva, azeite de oliva e óleo de canola respectivamente. Porém, segundo a literatura, lipases bacterianas preferem o pH alcalino ou perto da neutralidade (Gupta *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 1998). Anbu *et al.* (2011) avaliando atividade lipolítica de *Acinetobacter* também obtiveram o máximo de atividade lipolítica em pH ácido, de 6,0. Diferentes trabalhos com enzimas lipolíticas fúngicas são descritas em condições ácidas, como as de *Saccharomyces lipolytica*, *Aspergillus wentii*, *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *Rhizopus nigricans*, *R. oligosporus* (Ramani *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 1999).

Ramani *et al.* (2010) obtiveram uma lipase ácida de *Pseudomonas gessardii* em pH 3,5. A produção de enzimas lipolíticas no presente trabalho não foi prejudicada com a diminuição do pH durante o tempo do ensaio.

A massa molecular da lipase de bactérias do gênero *Acinetobacter* é bem variável. Estudos encontraram valores de massa molecular de 32 kDa em *Acinetobacter calcoaceticus*, 38 kDa em *Acinetobacter* sp., 43,8 kDa em *Acinetobacter* sp., 38 kDa em *A. radioresistens*, 53 kDa em *A. johnsonii* (Ng *et al.* 1999, Han *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2011).

Pressões ambientais são fatores importantes para a expressão de enzimas como as lipases por microrganismos. Ambientes fortemente contaminados, tais como efluentes com alta carga de lipídeos, tem se mostrado propícios para o *screening* e isolamento de espécies bacterianas produtoras dessas enzimas. O Brasil com sua ampla biodiversidade é um país pleno em ambientes diversos e adequados para a prospecção de microrganismos, e muito rico em diferentes matérias-primas para utilização como fontes nutricionais visando a produção de enzimas microbianas em escala industrial. Portanto, tornam-se necessários mais estudos e incentivos para que a tecnologia enzimática seja desenvolvida, inserindo o país e suas instituições de pesquisa de forma representativa nesta ciência que concilia de maneira harmônica, o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação do meio ambiente.

## 7. CONCLUSÃO

- O sistema de tratamento de efluentes do hotel mostrou ser um ambiente propício para o isolamento de bactérias lipolíticas;
- O microrganismo isolado, *Acinetobacter baylyi*, demonstrou alto potencial para a produção de enzimas lipolíticas;
- Nos ensaios em placa para avaliar a produção de lipase, a temperatura de 30°C promoveu halos maiores e mais intensos do que a temperatura de 25°C, sugerindo que a temperatura de 30°C é a temperatura ótima para produção da enzima;
- No cultivo submerso em biorreator para determinar a produção de lipases, não ocorreu diferença significativa entre os substratos azeite de oliva, óleo de semente de uva e óleo de canola, o que indica que qualquer um destes substratos pode ser utilizado como fonte de carbono para produção de enzimas lipolíticas;
- O cultivo submerso em biorreator na temperatura de 30°C apresentou valores mais altos de atividade enzimática do que os obtidos no agitador orbital, à mesma temperatura;

## 8. REFERÊNCIAS

- Adrio JL, Demain AL. 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Process. **Biomolecules**.
- Alberton D. 2009. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluentes de laticínios**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Alfenas, AC. 1998. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. UFV. 547p.
- Almeida AF. 2012. **Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii***. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
- Alves PDD, Siqueira FF, Facchin S, Horta CCR, Victória JMN, Kalapothakis E. 2014. Survey of microbial enzymes in soil, water and plant microenvironments. **The Open Microbiology Journal**. 1874-2858.
- Anbu P, Noh MJ, Kim DH, Seo JS, Hur BK, Min HK. 2011. Screening and optimization of extracellular lipase by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. **African Journal of Biotechnology**.
- Andualema B, Gessesse A. 2012. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. **Biotechnology**. 11: 100-118.
- Ankit M, Yaginik SK, Pranali M, K YS. 2011. Screening and temperature optimization for lipase producing bacteria from waste contaminated water. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**.
- Aquarone E, Lima UA, Borzani W, Schmidell W. 2001. **Biotecnologia na produção de alimentos**. V4. Blücher. 523 p.
- Auyong ASM, Ford R, Taylor PWJ. 2015. The Role of Cutinase and its Impact on Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology & Microbiology**. 2157-7471.
- Barbosa JMP. 2011. **Purificação e caracterização da lipase de *Bacillus SP. ITP-001***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade de Tiradentes. Aracaju.
- Bassani G, Fuciños P, Picó G, Farruggia B. 2010. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 75, p. 532-537.
- Benjamin S, Pandey A. 2000. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.

**Bergey's manual of determinative bacteriology.** 2000. Edited by: Holt, JG, Krieg, NR, Sneath, PHA, Staley JT, Williams ST. 9th ed. Philadelphia.

Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. 2008. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado.** Interciências Ltda. 506 p.

Borrelli GM, Trono D. 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences.** 20774-20840.

Borzani W, Schmidell W, Lima UA, Aquarone E. 2001. **Biotecnologia industrial: Fundamentos.** 1. ed. Edgard Blücher Ltda. 254 p.

Brandão RL, Castro IMC. 2004. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** Legis Summa. 416 p.

Bueno PRM. 2012. **Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes da indústria de alimentos.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

Cabral JMS, Aires MRB, Gama M. 2003. Engenharia Enzimática. Liedel. 250 p.

Cammarota MC, Freire DM. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewaters with high oil and grease content. **Bioresource Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210.

Cardenas F, Alvarez E, Castro-Alvarez MS, Sanchez-Montero JM, Valmaseda M, Elson SW, Sinisterra JV. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, n. 4-6, p. 111-123.

Carvalho PO, Campos PRB, Noffs MDA, Oliveira JG, Shimizu MT, Silva DM. 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, vol. 26, n. 1, p. 75-80.

Castro HF, Mendes AA, Santos JC, Aguiar CL. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova.** 1678-7064.

Choudhury P, Bhunia B. 2015. Industrial Application of Lipase: A Review. **Biopharm Journal.** 2454-1397.

Colla LM, Reinehr CO, Costa JAV. 2012. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC.**

Costa ACS. 2014. **Aplicação de lipases comerciais e não comerciais em reações de resolução cinética de alcoóis secundários quirais.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

Costa HB. 2014. **Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo – Vitória.

Dandavate V, Jinjala J, Keharia H, Madamwar D. 2009. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**.

Dharmsthiti S, Kuhasuntissak B. 1999. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**.

Dors, G. 2006. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. Dissertação (Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

Ertuğrul S, Dönmez G, Takaç S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdã, v. 149, p. 720-724.

Escallón AMV. 2009. **Estudo da expressão de lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenulatus* em *E. coli* recombinante**. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

Faria L A. 2010. **Hidrólise do óleo da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloeosporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Feitosa IC, Barbosa JMP, Orellana SC, Lima AS, Soares CMF. 2010. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum Technology**.

Freedonia G. 2014. **World Enzymes: Industry Study with Forecasts for 2017 & 2022**. The Freedonia Group. 338 p.

Freire DMG, Castilhos LR. 2008. **Lipases em Biocatálise**. Interciência. 503 p.  
Fungaro MHP, Maccheroni Jr W. 2002. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos**. Embrapa Meio Ambiente. 743 p.

Gandra KM, Bianchi MD, Godoy VP, Queiroz FPC, Steel CJ. 2008. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Ghanem A. 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721–1754.



Ghazala I, Haddar A, Romdhane MB, Chaanouni SE. 2016. Screening and molecular identification of new microbial strains for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Archives of biology and technology**.

Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 37, p. 63-71.

Gupta, R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763 – 781.

Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**.

Gururaj P, Ramalingam S, Ganesan ND, Gautam P. 2016. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. **Brazilian Journal of Microbiology**.

Haki GD, Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzyme: a review. **Bioresource Technology**. 89 (2003) 17-34.

Han SJ, Back HB, Yoon MY, Shin PK, Chung CS, Sung MH. 2003. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01. **Biochimie**. 85:501–10.

Hasan F, Shah A A, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251.

Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**.

Iqbal AS, Rehman A. 2015. Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* I-4 and its potential use in oil contaminated wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 1516-8913.

Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16(1), p. 53-58.

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Recommendations on biochemical & organic nomenclature, symbols & terminology etc.** Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 20 dez.2016.

Jaeger KE, Reetz MT. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16(9), p. 396-403.

Jeganathan J, Bassi A, Nakhla G. 2007. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. **Journal of Hazardous Materials B**. Vol. 137, p.121-128.

Kobori CN, Jorge N. 2005. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e agrotecnologia**. 1008-1014.

Kumar A, Dhar K, Kanwar SS, Arora PK. 2016. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**. 10.1186/s12575-016-0033-2.

Kumar S, Kikon K, Upadhyay A, Kanwar SK, Gupta R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expr Purif**. 41:38-44.

Kumar V, Singh D, Sangwan P, Gill PK. 2014. Global Market Scenario of Industrial Enzymes. **Industrial Enzymes**. 978-1-63321-338-8.

Lanciott R, Gianotti DB, Suzzi G, Mastrocola D, Guerzoni ME. 2005. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresource Technology**, Vol. 96, p. 317-322.

Leal FK. 2009. Estudo comparativo de leitos percolados e banhados construídos de fluxo vertical aplicados à remoção de fósforo em esgoto sanitário. Dissertação (Mestrado em recursos hídricos e saneamento ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre.

Li N, Zong M. 2010. Review: lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdã, v. 66, p. 43–54.

Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X. 2012. Thechnology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. e201209017.

Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. 2001. **Biotecnologia Industrial**. V. 3. 1. ed. Edgard Blücher Ltda. 593 p.

MacFaddin, JF. 2000. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 912 p.

Manoel EA. 2011. **Resolução de derivados racêmicos do mio-inositol catalisada por lipases**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Marchi CE, Borges MF, Mizubuti ESG. 2006. Atividade amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, p. 345-352.

MDIC – Ministério do Desenvolvimento da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. SISCOMEX – Sistema Integrado de Comércio Exterior. Disponível em: <http://alicesweb.mdic.gov.br>. Acesso em 20 dez. 2016.

Mendes AA, Castro HF. 2005. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**. 2, 296-305.

Mendes AA. 2004. **Avaliação da biodegradabilidade de efluentes com alto teor de lipídeos previamente tratados com enzimas hidrolíticas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena.

Messias JM, Costa BZ, Lima VMG, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa AM. 2011. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. 10.5433/1679-0375.

Messias JM. 2008. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

Monteiro VN, Silva RN. 2009. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**. 1981-8521.

Moraes C, Oliveira Jr FOR, Masson G, Rebello KM, Santos LO, Bastos NFP, Faria RCR. 2013. **Série em Biologia Celular e Molecular**. Instituto Oswaldo Cruz. 86p.

Musa H, Tayo ACB. 2012. Screening of microorganisms isolated from different environmental samples for extracellular lipase production. **AU Journal of Technology**. 15(3): 179-186.

Nascimento WCA, Martins MLL. 2006. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Ng IS, Tsai SW, Chen SJ. 1999. Purification and characterization of extracellular lipase from *Acinetobacter radioresistens* CMC-2. **J Chin Inst Chem Eng**. 30: 355–362.

Niyonzima FN, More SS. 2014. Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1. **Brazilian Journal of Microbiology**.

Odeyemi AT, Aderiye BL, Bamidele OS. 2013. Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* spp. from restaurant wastewater and receiving stream. **Journal of Microbiology Research**.

Oliveira DS, Ferraz LR, Treichel H, Oliveira D. 2014. Farelo de arroz como substrato para a produção de lipases microbianas. **RAMVI**.

Orlandelli RC, Specian V, Felber AC, Pamphile JA. 2012. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**. 1980-0002.

Paques FW, Macedo GA. 2006. Lipases de latex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, n. 1, p. 93-99.

Pereira RM. 2014. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas.

Poppe JK. 2012. **Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em suportes hidrofóbicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Pouderoyen GV, Thorsten E, Jaeger KE, Dijkstra BW. 2001. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzyme, **J. Mol. Biol.**, v. 309, p. 215-226.

Prasad MP, Manjunath K. 2010. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. **Indian Journal of Biotechnology**.

Pratuangdejkul J, Dharmsthiti S. 1999. Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. **Microbiological Research**.

Qian Z, Chun-Yun ZG. 2009. Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, p.1273-1279.

Ramani K, Chockalingam E, Sekaran G. 2010. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughter house waste as a substrate. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 37: 531-535.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VS. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. **Microbiol Mol Bio Rev** 62:597-635.

Reis RLS. 2015. **Avaliação da eficiência de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 no biotratamento de resíduos da indústria de laticíneos**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco. Recife.

Robles A, Lucas R, Cienfuegos R, Gálvez A. 2000. Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strain of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. **Bioresource Technology**.

Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, González V, Bhagnagar T, Roussos S, Cordova J, Baratti J. 2006. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 2264-2269.

Rousenau F, Jaeger K. 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**. 82:1023–1032.

Roveda M. 2007. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através da fermentação submersa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

Said S, Pietro R CLR. 2002. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**. Eventos. 121 p.

Santos RR. 2012. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Saxena RK, Ghosh PK, Gupta R, Davidson WS, Barodoo S, Gulati R. 1999. Microbial lipase: potential biocatalyst for the future industry. **Current Science**. v.77, 101–115.

Saxena S. 2015. Microbial enzymes and their industrial applications. **Applied Microbiology**. 978-81-322-2259-0.

Schmidell W, Lima UAL, Aquarone E, Borzani W. 2001. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. Edgard Blücher. 541 p.

Sezerino PH, Bento AP, Decezaro ST, Magri ME, Philippi LS. 2015. Experiências brasileiras com *wetlands* construídos aplicados ao tratamento de águas residuárias: parâmetros de projeto para sistemas horizontais. *Engenharia Sanitária Ambiental*.

Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases: Research review paper. **Biotechnology Advances**.

Silva HN, Lima RC, Pinotti LM. 2013. Produção de lipases por *Bacillus megaterium*. **X Congresso Brasileiro de Engenharia Química**.

Silva KAC. 2014. **Principais enzimas utilizadas como aditivos na indústria da panificação**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Bioquímica) – Universidade de São Paulo, Lorena.

Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein H. 2005. Production and extraction of the extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326.

Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21<sup>st</sup> century. **Biotech**. 10.1007/s13205-016-0485-8.

Sooch BS, Kauldhar BS. 2013. Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas* sp. BWS-5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.

Stehr F, Kretschmar M, Kröger C, Hube B, Schäfer W. 2003. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis**. v. 22, p. 347-355.

Tavares LLP. 2011. **Produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) a partir de meios a base de resíduo da indústria de sorvete**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco. Recife.

Tavares P. 2013. **Bioprospecção de lipases a partir de metagenoma no solo e sua aplicação para produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade Federal de Brasília. Brasília.

Ugras S, Uzmez S. 2016. Characterization of a newly identified lipase from a lipase-producing bacterium. **Frontiers in Biology**.

Vaz RS, Prado MRM, Carvalho F. 2007. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Vol.37. 79 p.

Verma N, Thakur S, Bhatt AK. 2012. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). **International Research Journal of Biological Sciences**.

Volpato G. 2009. **Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Wang HK, Shao J, Wei YJ, Zhang J, Qi W. 2011. A novel low temperature alkaline lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 suitable for detergent formulation. **Food Technol Biotechnol**. 49:96–102.

Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A 30-1 (ATCC 53841). **Journal Fermentation Bioengineering**. 79(5):433–438.

Wendland C, Chiarawatchai N. 2006. Constructed wetlands for wastewater treatment- Institute of Wastewater Management, Hamburgo University of Technology.

Willerding AL. 2007. **Bactérias produtoras de lipase e aplicação no processo de hidrólise do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.)**. – Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. Manaus.

Yang J, Guo D, Yan Y. 2007. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 91-96.

## 9. ANEXO

### Anexo 1: Gel de poliacrilamida

#### 1.1 Tampão de amostra

5 ml de glicerol

2,5 ml de Tris HCl 1M, pH 6,8

0,5 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol

5 ml de solução SDS 10%

2,5 ml de azul de bromofenol

Completar o volume para 25 ml e armazenar a solução em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2 Gel de resolução – 12% de acrilamida (para 20 ml)

6,6 ml água

8,0 ml solução acilamida

5,0 ml Tris 1,5 M, pH 8,8

0,2 ml (DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato Sódio

0,2 ml (PSA) 100 g/L de Persulfato de Amônia

0,008 ml (TEMED) Tetrametietilenodiamina

OBS. Usar álcool isopropílico como tampão até o gel secar no molde do gel.

#### 1.3 Gel de empilhamento (para 6 ml)

4,1 ml água

1,0 ml solução acilamida

0,75 ml Tris 1M, pH 6,8

0,06 ml (DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato Sódio

0,06 ml (PSA) 100 g/L de Persulfato de Amônia

0,006 ml (TEMED) Tetrametietilenodiamina

#### 1.4 Persulfato de amônia 10%

0,05 g persulfato de amônia

0,5 ml água destilada

#### 1.5 Tampão Tris-glicina pH 8,3 (tampão de corrida)

3 g Tris

14,4 g glicina

1 g SDS

1000 ml água

#### 1.6 Prefixador 1

100 ml metanol

86 ml água destilada

14 ml ácido acético

#### 1.7 Prefixador 2

20 ml metanol

160 ml água destilada

20 ml ácido acético



1.8 Prefixador com glutaraldeído

100 ml de glutaraldeído (25%)

100 ml formaldeído (37%)

200 ml água destilada

1.9 Solução aquosa de etanol

200 ml etanol (95%0

800 ml água destilada

1.10 Solução de Hidróxido de Sódio

0,1 g hidróxido sódio

380 ml solução aquosa de etanol

1,5 ml hidróxido de amônia concentrado

1.11 Solução de prata amoniacal

1 g nitrato de prata

20 ml água destilada

Adicionar lentamente essa solução à solução de hidróxido de sódio, sob agitação suave. Se o sal de prata não for totalmente solúvel, adicionar hidróxido de amônia até a diluição. A solução de prata amoniacal deve ser preparada na hora e no escuro.

1.12 Solução reveladora (preparar somente na hora do uso)

200 ml etanol

200 ml formaldeído (37%)

100 ml ácido cítrico (2,3M)

1.13 Solução inativadora (preparar somente na hora do uso)

400 ml de etanol aquoso

4 ml ácido acético