

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/01/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LIPASES EXTRACELULARES

Tainá Carolini Maria
Bióloga

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LIPASES EXTRACELULARES

Tainá Carolini Maria

Orientadora: Profa. Dra. Eliana G. de Macedo
Lemos

Coorientadoras: Dra. Pâmela A. Maldaner
Pereira

Dra. Elisângela Soares Gomes Pepe

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2023

M332e Maria, Tainá Carolini
Expressão, purificação e caracterização de lipases extracelulares /
Tainá Carolini Maria. -- Jaboticabal, 2023
49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Eliana G. de Macedo Lemos
Coorientadora: Pâmela A. Maldaner Pereira

1. Bioquímica. 2. Análise enzimática. 3. Lipase. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Pesquisa sobre lipases e sua ação em ácidos graxos de cadeias longas terá amplo impacto: indústria de alimentos, biotecnologia, saúde, biorremediação, sustentabilidade e avanços científicos. Maior compreensão levará a processos eficientes, medicamentos inovadores e gestão de resíduos aprimorada, impulsionando progresso científico.

Potential impact of this research

Research on lipases and their ability to degrade long-chain fatty acids promises substantial impact across various domains: food industry, biotechnology, human health, bioremediation, pharmacology, sustainability, and scientific advancement. In-depth understanding of lipase functioning will yield opportunities for more efficient and sustainable processes, potentially influencing drug formulation and organic waste management. The research may also stimulate further scientific breakthroughs, contributing to the expansion of knowledge in this field.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES EXTRACELULARES

AUTORA: TAINÁ CAROLINI MARIA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

COORIENTADORA: PAMELA APARECIDA MALDANER PEREIRA

COORIENTADORA: ELISÂNGELA SOARES GOMES PEPE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / UNESPCâmpus de Jaboticabal

Profa. Dra. ELENÍ GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / IBILCE UNESP São José do Rio Preto

Profa. Dra. TSAI SIU MUI (Participação Virtual)
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP - Piracicaba, SP

Jaboticabal, 18 de julho de 2023

Documento assinado digitalmente
 TSAI SIU MUI
Data: 25/07/2023 11:08:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Data: 31/07/2023 11:35:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 ELENÍ GOMES
Data: 26/07/2023 12:14:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tainá Carolini Maria, nascida em 19/02/1996 na cidade de Monte Alto – SP, graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista, e mestrado em Microbiologia Agropecuária pela mesma universidade.

AGRADECIMENTOS

É com imensa alegria que dedico este trabalho a Deus, fonte de toda sabedoria e inspiração, e começo agradecendo a minha família, especialmente aos meus pais, Antônio e Beatriz, por seu amor incondicional, apoio constante e crença inabalável em meu potencial; as minhas irmãs, Aline e Lorrani, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando-me e celebrando cada conquista; ao meu sobrinho Antony, que trouxe tanta alegria e inspiração para minha vida; a Mia, por sua lealdade incondicional e companhia amorosa durante todas as horas de estudo; e ao Pedro, por seu amor, paciência e apoio.

Agradeço de coração à minha orientadora Eliana, que me guiou com sabedoria, experiência e dedicação. Sua orientação meticulosa e valiosas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação. Sou grata pela sua paciência, incentivo e pelos desafios que me fez enfrentar para crescer academicamente.

Às minhas coorientadoras, Elis e Pâmela, agradeço pelo apoio adicional e valiosas contribuições em minha pesquisa. Sua expertise e orientação foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao técnico João Carlos, por sua disponibilidade, habilidade e dedicação em auxiliar-me nas atividades práticas e experimentais. Sua experiência e conhecimento foram cruciais para o sucesso dos experimentos realizados.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, agradeço pela amizade, colaboração e pelo ambiente encorajador em que crescemos juntos. Suas contribuições científicas e apoio emocional foram inestimáveis durante toda essa jornada.

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela oportunidade de estudar e desenvolver minha pesquisa nesse ambiente acadêmico de excelência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 19/20825-0.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos mencionados e àqueles que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal, meu mais profundo agradecimento. Que este trabalho possa trazer contribuições significativas para a área de microbiologia agropecuária e inspire outros pesquisadores a seguir em busca do conhecimento e do progresso científico.

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES EXTRACELULARES

RESUMO - Lipases verdadeiras são caracterizadas pela capacidade de catalisar a liberação de ácidos graxos livres de triacilgliceróis de cadeia longa na interface óleo-água. As lipases bacterianas são as que apresentam maior versatilidade, são mais estáveis e reativas em meio orgânico. Quanto às suas aplicações, destacam-se o uso na produção de biodiesel e na biorremediação de águas residuais. É estimada a existência de 5000 enzimas lipolíticas bacterianas, entretanto, apenas 10% dessas foram estudadas experimentalmente, por isso a importância de buscar por lipases com novas especificidades. Diante disso, o principal objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar novas lipases verdadeiras. Para tanto, 10 isolados bacterianos foram avaliados quanto a atividade lipolítica e, em seguida, quanto a atividade lipolítica no sobrenadante. Aqueles com resultado positivo, tiveram suas lipases parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônio e posteriormente foi realizado um zimograma para confirmar atividade lipolítica das enzimas. Os microrganismos, por sua vez, tiveram o DNA extraído para o sequenciamento do gene 16S rRNA, seguido de análises filogenéticas. Uma das lipases obtidas foi submetida a um ensaio de cromatografia gasosa para observação do padrão de degradação dos ácidos graxos presentes no azeite de oliva, e a mesma foi caracterizada bioquimicamente. Quatro dos microrganismos avaliados apresentaram halo de degradação em meio de cultura LB suplementado com azeite de oliva e três deles apresentaram evidência de produção de enzimas extracelulares, através da detecção de proteína por eletroforese SDS-Page no sobrenadante filtrado de cultura líquida induzida com azeite. Após a purificação, as lipases obtidas tiveram a atividade lipolítica comprovada através do zimograma. Os microrganismos foram classificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. O isolado denominado D15, escolhido para a continuação dos estudos por apresentar o maior halo lipolítico, produz uma lipase com atividade específica de 0.297 U/mg para o substrato C14 em condições iniciais de análise (pH 8, 30 °C), esta enzima também apresentou uma degradação expressiva dos ácidos graxos presentes no azeite, seu pH e temperatura ótimos foram 4,5 e entre 40 e 60 °C (substrato C12), respectivamente. As características apresentadas pela lipase produzida pelo isolado D15 são muito interessantes do ponto de vista biotecnológico, com potencial de aplicação na indústria alimentícia, por exemplo, devido a preferência por pH ácido e estabilidade em uma ampla faixa de temperatura; e biorremediação, já que apresentou alta capacidade de degradação de ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, outras duas lipases bacterianas extracelulares foram obtidas, podendo serem exploradas em estudos posteriores.

Palavras-chave: atividade lipolítica, degradação de azeite, perfil de ésteres metílicos por cromatografia gasosa

EXPRESSION, PURIFICATION, AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR LIPASES

ABSTRACT - True lipases are characterized by their ability to catalyze the release of long-chain free fatty acids from triglycerides at the oil-water interface. Bacterial lipases are the most versatile, stable, and reactive in organic media. Their applications include the production of biodiesel and the bioremediation of wastewater. It is estimated that there are 5,000 bacterial lipolytic enzymes, but only 10% of these have been experimentally studied, highlighting the importance of seeking lipases with new specificities. Therefore, the main objective of this work was to identify new true lipases. To this end, 10 bacterial isolates were evaluated for lipolytic activity and then for lipolytic activity in the supernatant. Those with positive results had their lipases purified by ammonium sulfate precipitation, followed by zymogram analysis to confirm the lipolytic activity of the purified enzymes. The microorganisms, in turn, had their DNA extracted for 16S rRNA gene sequencing, followed by phylogenetic analysis. One of the obtained lipases was subjected to gas chromatography to observe the degradation pattern of fatty acids present in olive oil, and it was biochemically characterized. Four of the evaluated microorganisms showed degradation halo in LB culture medium supplemented with olive oil, and three of them showed evidence of extracellular enzyme production through protein detection by SDS-Page electrophoresis in the filtered supernatant of oil-induced liquid culture. After purification, the obtained lipases had their lipolytic activity confirmed by zymogram analysis. The microorganisms were classified as belonging to the Burkholderia genus. The isolate named D15, chosen for further studies due to its largest lipolytic halo, produces a lipase with a specific activity of 0.297 U/mg for the C14 substrate under initial analysis conditions (pH 8, 30 °C). This enzyme also showed significant degradation of fatty acids present in olive oil, with optimal pH and temperature of 4.5 and between 40 and 60 °C (substrate C12), respectively. The characteristics exhibited by the lipase produced by the D15 isolate are highly interesting from a biotechnological standpoint, with potential applications in the food industry, for example, due to its preference for acidic pH and stability over a wide temperature range, and in bioremediation, as it demonstrated a high capacity for degrading long-chain fatty acids. Furthermore, two other extracellular bacterial lipases were obtained, which could be explored in further studies.

Keywords: lipolytic activity, olive oil degradation, profile of methyl esters by gas chromatography.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas fundamentais aos processos metabólicos celulares, e devido a algumas características que elas apresentam, como alta disponibilidade e produtividade, estabilidade química, capacidade de adaptação e ausência de impactos ao ambiente, elas vêm sendo cada vez mais utilizadas na indústria em diversos setores, como alimentício, farmacêutico, químico e energético (Ken Ugo et al., 2017).

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 1992) as enzimas podem ser agrupadas em sete categorias, de acordo com a reação de catálise específica que realizam (McDonald e Tipton, 2022). Dentre essas categorias, as hidrolases são capazes de hidrolisar diversos compostos, incluindo ésteres e triglicerídeos. Nessa categoria, destacam-se as lipases, que têm uma ampla especificidade de substrato e são capazes de catalisar a liberação de ácidos graxos livres a partir de triacilgliceróis de cadeia longa (Ramnath et al., 2017), sendo amplamente utilizadas devido a sua versatilidade (Javed et al., 2018).

As lipases são encontradas em plantas, animais e em microrganismos, sendo que as lipases bacterianas apresentam maior versatilidade, são mais estáveis e reativas em meio orgânico (Ramnath et al., 2017). Estas podem ser intracelulares, extracelulares ou fixadas a membrana; apresentam uma facilidade de manipulação genética e ambiental que permite a produção de enzimas alteradas com alta diversidade catalítica (Javed et al., 2018). As enzimas lipolíticas possuem grande valor na aplicação industrial, sendo empregadas, principalmente, na indústria alimentícia, têxtil, de couro, farmacêutica, cosmética, química fina, energia, biomateriais, papel, celulose e detergentes (Ken Ugo et al., 2017).

Apesar de existir um grande número de enzimas lipolíticas bacterianas, poucas foram estudadas experimentalmente, havendo muitas lacunas no conhecimento sobre essas enzimas, como as suas estruturas e mecanismos de ação. (Kovacic et al., 2019). Além disso, a busca por lipases com novas especificidades requer o desenvolvimento de métodos mais eficientes de triagem e seleção de enzimas, bem

como a identificação de novos microrganismos produtores de lipases (Hasan et al., 2009).

Com base nessas considerações, esta dissertação teve como objetivo identificar novas lipases bacterianas com especificidades ainda não exploradas e, para isso, foram empregadas técnicas de expressão homóloga, triagem enzimática, sequenciamento do gene 16S rRNA, caracterização bioquímica e observação do perfil de digestão de ácidos graxos de cadeia longa de novas 3 lipases verdadeiras, a fim de avaliar o seu potencial biotecnológico, expandir o conhecimento sobre as lipases bacterianas e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis e eficientes.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, é possível concluir que a metodologia utilizada foi eficiente para atingir o objetivo proposto. Três microrganismos, D15, MT2 e LP05, tiveram suas lipases parcialmente purificadas, com atividade lipolítica demonstrada por meio de zimograma. Os microrganismos tiveram o gene 16S rRNA sequenciado, e as análises filogenéticas indicaram que as cepas pertencem ao gênero *Burkholderia*, um dos gêneros de destaque quanto a produção de enzimas lipolíticas.

A cepa bacteriana *Burkholderia* sp. D15, escolhida para a continuação do estudo, apresentou características cinéticas interessantes, como preferência por pH ácido, o que não é comum para lipases de origem bacteriana, e estabilidade em uma ampla faixa de temperatura. Além disso, foi capaz de degradar ácidos graxos de cadeias média e longa presentes no azeite, mesmo fora das suas condições ideais de catalise, em resultado obtido por meio de análise de cromatográfica gasosa. Isso confere a esta enzima um grande potencial de aplicação, visto a facilidade em cultivar o microrganismo, e as especificidades apresentadas pela lipase, podendo ser utilizada em bioprocessos como na produção de alimentos, onde o pH ácido é frequentemente utilizado, na produção de detergentes devido a sua estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, e ainda na biorremediação, já que apresentou alta capacidade de degradação em ensaios iniciais.

Para tanto, mais estudos devem ser desenvolvidos, como a caracterização completa da lipase, para que as condições sejam otimizadas e haja um maior rendimento e desempenho enzimático. Bem como testes de aplicação devem ser explorados, avaliando a capacidade da enzima na degradação de outros compostos, como gorduras e óleo diesel, que possuem uma composição diferente do azeite utilizado nos ensaios aqui apresentados. No presente trabalho também foram obtidas

e purificadas outras duas lipases, que podem ser caracterizadas e exploradas em pesquisas futuras. Desse modo, será possível definir em quais áreas a LipBK e as outras lipases obtidas seriam melhor aproveitadas, e caminhar para uma possível comercialização e aplicação, contribuindo na construção de um futuro mais sustentável e com o desenvolvimento tecnológico.

REFERÊNCIAS

- Balcao VM, Malcata FX (1998) Lipase catalyzed modification of milk fat. **Biotechnol Adv** 16:309–41.
- Bharathi D, Rajalakshmi G (2019) Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 22. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>
- Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brito RR de (2012) **Isolamento de fungos produtores de lipases catalisadores de reações de transesterificação para produção de biodiesel**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Unesp, Rio Preto.
- Chahiniana H, Sarda L (2009) Distinction Between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases. **Protein & Peptide Letters** 16:1149–1161. <https://doi.org/10.2174/092986609789071333>
- Chan KC, Ho S, Law J, Yuen V (2002) The Effects of Various Divalent Cations on the Enzyme Activity of Bovine Intestinal Alkaline Phosphatase. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology** 2: 13–21.
- Chandra P, Enespa Singh R, Arora PK (2020) Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microb Cell Fact** 19: 169.
- Chandra P, Enespa, Singh DP (2020) Microplastic degradation by bacteria in aquatic ecosystem. In: Microorganisms for sustainable environment and health. **Elsevier** p. 490–515.
- Couto GH, Glogauer A, Faoro H, Chubatsu LS, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the

south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research** 9:514–523. <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr738>

Cygler M, Schrag JD (1999) Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids** 1441: 205-214. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00152-3)

Dalal S, Singh PK, Raghava S, Rawat S, Gupta, MN (2008) Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 51: 23. <https://doi.org/10.1042/BA20070186>

Faoro H, Glogauer A, Couto GH, Souza EM, Rigo LU, Cruz LM, Monteiro RA, Oliveira Pedrosa F (2012) Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS Microbiology Ecology** 81:386–394. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01361.x>

Fasim A, More VS, More SS (2021) Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology** 69:68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>

Fatima S, Faryad A, Ataa A, Joyia FA, Parvaiz A (2021) Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 68:445–458. <https://doi.org/10.1002/bab.2019>

Freire DMG (1996) **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 174 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – UFRJ, Rio de Janeiro.

Gricajeva A, Kalédiené L (2023) Investigation of amino acids related to *Staphylococcus saprophyticus* AG1 EstAG1 carboxylesterase catalytic function revealed a new family of bacterial lipolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules** 235: 123791. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123791>

Hasan F, Shah AA, Hameed A (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances** 27:782–798. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001>

Hassan SWM, Abd El Latif HH, Ali SM (2018) Production of Cold-Active Lipase by Free and Immobilized Marine *Bacillus cereus* HSS: Application in Wastewater Treatment. **Frontiers in Microbiology** 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02377>

Hempelmann E, Krafts K (2017) The mechanism of silver staining of proteins separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Biotech Histochem** 92(2):79-85. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1265149>

Hitch TCA, Clavel T (2019) A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. **PeerJ** 7:7249. <https://doi.org/10.7717/peerj.7249>

Hriscu M, Chiş L, Toşa M, Irimie FD (2013) pH-Profiling of thermoactive lipases and esterases: Caveats and further notes. **European Journal of Lipid Science and Technology** 115:571–575. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200305>

Jadhav VV, Suresh Pote S, Yadav A, Shouche YS, Kaustubh Bhadekar R (2013) Extracellular cold active lipase from the psychrotrophic *Halomonas* sp. BRI 8 isolated from the Antarctic sea water. **Songklanakarin J. Sci. Technol** 35. <http://www.sjst.psu.ac.th>

Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique MH, Riaz M, Afzal M, Kouser A, Nadeem H (2018) Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 132:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>

Ken Ugo A, Vivian Amara A, CN I, Kenechuwku U (2017) Microbial Lipases: A Prospect for Biotechnological Industrial Catalysis for Green Products: A Review. **Fermentation Technology** 06. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000144>

Kovacic F, Babic N, Krauss U, Jaeger KE (2019) Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: Rojo F (Eds.) **Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer: Cham, 1-35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_39-1

Lampinen J, Raitio M, Perälä A, Oranen H, Harinen RR (2012) **Microplate based pathlength correction method for photometric DNA quantification assay**. Vaanta: Finland: SP&A Application Laboratory, Thermo Fisher Scientific, 3p. (Thermo Fisher Scientific – technical notes).

Li J, Shen W, Fan G, Li X (2018) Screening, purification and characterization of lipase from *Burkholderia pyrrocinia* B1213. **3 Biotech** 8:387. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1414-9>

Lim CR, Lee H young, Uhm KN, Kim HK (2022) Production of 4-Ethyl Malate through Position-Specific Hydrolysis of *Photobacterium lipolyticum* M37 Lipase. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 32:672–679. <https://doi.org/10.4014/jmb.2112.12055>

Mala JGS, Takeuchi S (2008) Understanding Structural Features of Microbial Lipases–An Overview. **Analytical Chemistry Insights** 3. <https://doi.org/10.4137/ACI.S551>

Marchut-Mikolajczyk O, Drożdżyński P, Struszczyk-Świta K (2020) Biodegradation of slop oil by endophytic *Bacillus cereus* EN18 coupled with lipase from *Rhizomucor miehei* (Palatase®). **Chemosphere** 250:126203. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126203>

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology** 3:208-IN1. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)

Mastropaolo W, Yourno J (1981) An ultraviolet spectrophotometric assay for α -naphthyl acetate and α -naphthyl butyrate esterases. **Analytical Biochemistry** 115:188–193. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90544-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90544-3)

Matsuoka H, Miura A, Hori K (2009) Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 107:401–408. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.001>

McDonald AG, Tipton KF (2022) Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. **The FEBS Journal**. <https://doi.org/10.1111/febs.16274>

Mobarak-Qamsari E, Kasra-Kermanshahi R, Moosavi-Nejad Z (2011) Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. **Iranian journal of microbiology** 3:92–98.

Musa H, Hafiz Kasim F, Nagoor Gunny AA, Gopinath SCB, Azmier AM (2019) Enhanced halophilic lipase secretion by *Marinobacter litoralis* SW-45 and its potential fatty acid esters release. **Journal of Basic Microbiology** 59:87–100. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800382>

Nardini M, Dijkstra BW (1999) α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology** 9:732–737. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00037-8)

Ng AMJ, Zhang H, Nguyen GKT (2021) Zymography for Picogram Detection of Lipase and Esterase Activities. **Molecules (Basel, Switzerland)** 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26061542>

Noormohamadi R, Tabandeh F, Shariati P, Otadi M (2013) Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp. **Iranian journal of microbiology** 5:422–427.

Oh BC, Kim HK, Lee JK, Kang SC, Oh TK (1999) Staphylococcus haemolyticus lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters** 179:385–392. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08753.x>

Ramnath L, Sithole B, Govinden R (2017) Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. **Canadian Journal of Microbiology** 63:179–192. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0447>

Robinson PK (2015) Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry** 59:1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>

Sarmah N, Revathi D, Sheelu G, Yamuna RK, Sridhar S, Mehtab V, Sumana C (2018) Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology progress** 34:5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>

Sharma P, Sharma N, Pathania S, Handa S (2017) Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 15:369–377. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.007>

Tatta ER, Imchen M, Moopantakath J, Kumavath R (2022) Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare. **Applied Microbiology and Biotechnology** 106:1813–1835. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11859-5>

Thakur S (2012) Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. **International Journal of Scientific & Engineering Research** 3. <http://www.ijser.org>

Tipre DR, Purohit M, Dave S (2014) Production and characterization of lipase from *Staphylococcus* sp. SDMlip. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science** 3:423–436.

Uddin MR, Roy P, Mandal S (2021) Production of extracellular lipase from psychrotrophic bacterium *Oceanisphaera* sp. RSAP17 isolated from arctic soil. **Antonie van Leeuwenhoek** 114:2175–2188. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01671-y>

Vorderwülbecke T, Kieslich K, Erdmann H (1992) Comparison of lipases by different assays. **Enzyme and Microbial Technology** 14:631–639. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90038-P](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90038-P)

Zehani N, Dzyadevych SV, Kherrat R, Jaffrezic-Renault NJ (2014) Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases. **Front Chem.** 2:44.

Xiao F, Li Z, Pan L (2017) Application of Microbial Lipase and Its Research Progress. **Progress in Applied Microbiology**.

Zhu J, Liu Y, Qin Y, Pan L, Li Y, Liang G, Wang Q (2019) Isolation and Characterization of a Novel Bacterium *Burkholderia gladioli* Bsp-1 Producing Alkaline Lipase. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 29:1043–1052. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03045>

Wingfield P (1998) Protein precipitation using ammonium sulfate. In: John Wiley & Sons (Eds.) **Current protocols in protein science**. New Jersey, A.3F.1-A.3F