

**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 / UNESPCampus de Jaboticabal

Profa. Dra. ELENI 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
 ELENI 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.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
<u> </u>2.1 Enzimas.....	2
<u> </u>2.2 Enzimas lipolíticas.....	4
<u> </u>2.2.1 Dobramento estrutural de lipases	5
<u> </u>2.2.2 Classificação das enzimas lipolíticas	6
<u> </u>2.3 Lipases microbianas e sua aplicação biotecnológica	8
<u> </u>2.4 Coleção de lipases do laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP).....	12
3 OBJETIVOS.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
<u> </u>4.1 Triagem primária para a produção de lipase por diferentes cepas bacterianas	14
<u> </u>4.2 Cultivo do organismo e “screening” para atividade lipolítica no sobrenadante.....	14
<u> </u>4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise filogenética....	15
<u> </u>4.4 Expressão e purificação de lipase	16
<u> </u>4.5 Zimogramas	17
<u> </u>4.5.1 Zimograma em placa com azeite de oliva.....	17
<u> </u>4.5.2 Zimograma para atividade lipolítica pelo método Fast Garnet/α-nafitilacetato	17

<u>4.5.2.1</u> Gel de poliacrilamida SDS Page corado com nitrato de prata	18
<u>4.6</u> Determinação da concentração da proteína.....	18
<u>4.7</u> Comparação da atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia</i> sp. D15 na presença e na ausência da cultura microbiana e caracterização bioquímica da lipase LipBK	19
<u>4.7.1.</u> Cromatografia gasosa de <i>Burkholderia</i> sp. D15.....	19
<u>4.7.2.</u> Caracterização Bioquímica da lipase secretada por <i>Burkholderia</i> sp. D15.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
<u>5.1</u> Teste de atividade lipolítica	22
<u>5.2</u> Cultivo dos microrganismos e “screening” para atividade lipolítica no sobrenadante	24
<u>5.3</u> Sequenciamento do gene 16S rRNA	26
<u>5.4</u> Expressão e purificação das lipases e zimograma	28
<u>5.5</u> Comparação da atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia</i> sp. D15 com e sem a presença da cultura microbiana, seguida da caracterização bioquímica da lipase LipBK	34
<u>5.5.1</u> Cromatografia gasosa (CG)	35
<u>5.5.1.1</u> Cromatografia gasosa do cultivo de <i>Burkholderia</i> sp. D15.....	35
<u>5.5.1.2</u> Cromatografia gasosa da enzima purificada e filtrada	38

<u>5.5.2</u> Caracterização bioquímica da lipase de <i>Burkholderia</i> sp. D15.....	41
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45

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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enzimas

As enzimas atuam como catalisadores biológicos, acelerando as reações bioquímicas nos organismos vivos. Sua notável eficiência é evidente mesmo em concentrações ínfimas, e não são consumidas no decorrer das reações. Durante esses processos, as moléculas dos substratos são convertidas em produtos. O fisiologista alemão Wilhelm Kühne, em 1878, cunhou o termo "enzimas" enquanto investigava a síntese de álcool a partir de açúcares. A exploração comercial das enzimas teve início no final do século XIX, marcado por avanços significativos na extração e caracterização desses componentes celulares (Robinson, 2015).

No ano de 1961 a Comissão de Enzimas, criada pela NC-IUBMB, publicou um relatório onde foram estabelecidas regras para a nomenclatura de enzimas, desse modo, as enzimas passaram a serem identificadas por um número de Comissão Enzimática (EC) que compreende quatro partes, separadas por um ponto (“.”). A mesma comissão publica anualmente suplementos contendo detalhes de mais de 5000 enzimas diferentes, que estão divididas em 7 grupos (McDonald e Tipton, 2022). Esta divisão depende da reação de catálise específica exercida pela enzima e, de

acordo com a NC-IUBMB (1992), esses grupos compreendem as oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases. A classificação numérica considera diferentes características, sendo que o primeiro número identifica qual tipo de reação que a enzima catalisa, indicando a qual grupo ela pertence (conforme Tabela 1), e os demais números da identificação dependem de particularidades da reação a qual cada enzima participa, podendo ter diferentes significados.

Tabela 1. Principais classes de enzimas no sistema “EC number”.

Primeiro dígito EC (Grupo)	Classe de enzima	Tipo de reação
1.	Oxirredutases	Redução de oxidação
2.	Transferases	Transferência de átomos/grupo
3.	Hidrolases	Hidrólise
4.	Liases	Remoção de grupo
5.	Isomerases	Isomerização
6.	Ligases	União de moléculas ligadas à quebra de uma ligação pirofosfato
7.	Translocases	Catalisam o movimento de íons ou moléculas através das membranas ou sua separação dentro das membranas

Fonte: Robinson, 2015; McDonald, 2022.

As enzimas são essenciais aos processos metabólicos das células, e estão presentes em animais, vegetais e nos microrganismos. De início, nos anos 70, a indústria alimentícia utilizava somente enzimas provenientes desses dois primeiros grupos no processamento de alimentos, devido às incertezas em torno do uso de enzimas microbianas, mas isso mudou em decorrência à alguns fatores como a demanda, a tecnologia desenvolvida ao longo dos anos e das vantagens

apresentadas pelas enzimas oriundas de microrganismos (Robinson, 2015). Atualmente, aproximadamente 90% das enzimas utilizadas em processos industriais são de origem microbiana, sendo as enzimas fúngicas a principal fonte, seguidas por bactérias. Por outro lado, apenas cerca de 10% das enzimas são provenientes de fontes animais ou vegetais (Fasim et al., 2021).

Graças a sua disponibilidade, baixo custo, alta produtividade, estabilidade química, plasticidade e ausência de impactos ao ambiente, as enzimas microbianas vêm sendo amplamente empregadas em diversos processos industriais. Dentre eles, destaca-se o uso em indústrias de celulose e papel, alimentos, bebidas, detergentes, roupas, combustível e fabricação de produtos farmacêuticos (Ken Ugo et al., 2017). O comércio de enzimas vem crescendo ao longo dos anos acompanhando a demanda global, e a previsão é que atinjam US\$ 7,0 bilhões em 2023, sendo as hidrolases as enzimas de maior interesse (Fasim et al., 2021).

Embora existam milhares de enzimas descritas, o mercado conta apenas com cerca de 200 enzimas de origem microbiana, a bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico tem sido realizada massivamente, tanto em ambientes terrestres de fácil acesso como ambientes extremos, inclusive o ambiente marinho também tem sido alvo de pesquisas para obtenção de novas enzimas. Essa busca, aliada a engenharia genética, que possibilitou a produção de enzimas de interesse a baixo custo e a manipulação das mesmas para exibirem características desejadas, nos traz uma ótima perspectiva para o futuro quanto ao uso industrial de enzimas com custos de produção reduzidos (Tatta et al., 2022).

2.2 Enzimas lipolíticas

A classe das hidrolases abrange as enzimas lipolíticas, as proteases, amilases, xilanases e esterases. As enzimas pertencentes a esta classe são capazes de hidrolisar peptídeos, haletos orgânicos, amidas, além de ésteres e triglicerídeos (Ramnath et al., 2017). As enzimas lipolíticas compreendem lipases “verdadeiras” (EC 3.1.1.1, triacilglicerol hidrolases) e esterases (EC 3.1.1.3, hidrolases de éster carboxílico) (Ramnath et al., 2017). As esterases geralmente hidrolisam ésteres

solúveis em água, portanto, agem preferencialmente em ácidos graxos de cadeia curta, como a tributirina, por estes serem mais solúveis que ácidos graxos de cadeia longa, como o azeite, onde preferencialmente agem as lipases verdadeiras (Kovacic et al., 2019).

Devido a sua versatilidade, as lipases estão entre as três enzimas mais amplamente utilizadas, juntamente com as proteases e amilases (Javed et al., 2018). Quando se trata de enzimas de interesse biotecnológico, as lipases apresentam uma expressiva significância no mercado internacional, com previsão de que a comercialização ultrapasse US\$ 797,7 milhões até 2025 (Fatima et al., 2021).

Atualmente, existem cerca de 250 tipos de lipases e nenhuma dessas enzimas conhecidas possuem sequência característica semelhante, contando com uma surpreendente diversidade (Xiao et al., 2017). Essas enzimas são caracterizadas por exibirem a capacidade de catalisar a liberação de ácidos graxos livres de triacilgliceróis de cadeia longa na interface óleo-água, encontrados tanto no óleo vegetal como em gordura animal (Hitch e Clavel, 2019). Devido à insolubilidade de seus substratos, os triacilgliceróis de cadeia longa devem primeiramente serem dissolvidos em solventes orgânicos e depois misturados ao tampão. As lipases são solúveis em água e, portanto, podem catalisar reações em meio aquoso e também em meio orgânico (Javed et al., 2018).

2.2.1 Dobramento estrutural de lipases

Quanto à sua estrutura tridimensional, as lipases exibem uma dobra α / β -hidrolase característica e uma ordem definida de hélices α e folhas β , um núcleo predominantemente formado por oito fitas β paralelas, formando uma folha β central rodeada por hélices α (Figura 1) (Sarmah et al., 2018).

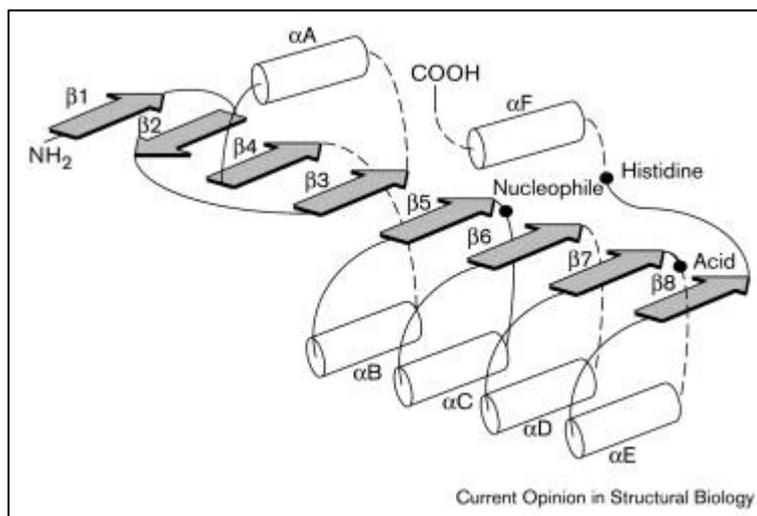


Figura 1. Estrutura secundária da dobra α / β -hidrolase, sendo as hélices α representadas pelos cilindros e as fitas β representadas pelas setas cinzas. Os pontos pretos indicam a tríade catalítica e as linhas tracejadas estão indicando os locais de possíveis inserções. Fonte: Nardini e Dijkstra (1999).

As enzimas com esse dobramento possuem um sítio ativo com uma estrutura estável, a tríade catalítica formada é composta por um nucleófilo, que pode ser uma serina, cisteína ou ácido aspártico, e fica localizado seguinte a fita $\beta 5$; além de um resíduo ácido localizado posteriormente à fita $\beta 7$; e um resíduo de histidina altamente conservado inserido posteriormente à última das fitas β (figura 1) (Nardini e Dijkstra, 1999). Para as lipases, as tríades catalíticas são compostas por serina nucleofílica, histidina e glutamato ou aspartato, o que lhes confere uma ótima competência como biocatalisador (Sarmah et al., 2018). A localização do nucleófilo facilita a aproximação com o substrato, essa região é chamada “cotovelo nucleofílico”, a qual também facilita a formação de um sítio de ligação chamado oxianion, necessário para estabilizar o estado transitório durante a hidrólise. A versatilidade das dobras α / β -hidrolase conferem às lipases uma tampa móvel que protege seus sítios ativos, isso explica sua ativação interfacial, pois o contato com a interface óleo-água ocasiona a abertura da tampa e então a ligação do substrato ao sítio ativo (Nardini e Dijkstra, 1999).

2.2.2 Classificação das enzimas lipolíticas

Inicialmente as enzimas lipolíticas eram classificadas em 8 famílias por Ar Arpigny e Jaeger (1999), agrupadas de acordo com suas sequências de aminoácidos

e características fisiológicas, com a família I agrupando as lipases “verdadeiras”, subdividida ainda em 6 subfamílias.

Mais recentemente, Kovacic et. al. (2019) apresentaram uma classificação em continuidade aquela apresentada em 1999 por Arpigny e Jaeger, e em 2010 por Hausmann e Jaeger, onde incluíram novas lipases e esterases totalizando 19 famílias, e reclassificando a família I em 8 subfamílias de lipases verdadeiras. Complementando as classificações já propostas, pesquisadores propuseram 35 famílias de lipases, sendo a família I composta por 11 subfamílias (Hitch e Clavel, 2019) Um trabalho atual, apontou ainda que, a enzima carboxilesterase EstAG1 produzida por *Staphylococcus saprophyticus* AG1 pode ser incluída em uma nova família de lipases (Gricajeva e Kalédiené, 2023)

As lipases da família I, que hidrolisam ácidos graxos de cadeia longa, compartilham uma sequência consenso Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly, onde “Xaa” pode ser um aminoácido qualquer, nessa sequência estão inclusas lipases de bactéria Gram-negativas, como *Pseudomonas* e *Burkholderia*, e lipases de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus*, *Staphilococcus*, *Propionibacterium* e *Streptomyces* (Ramnath et al., 2017).

A família das lipases “verdadeiras” é atualmente dividida em 11 subfamílias (Hitch e Clavel, 2019); a subfamília I.1 é composta por uma sequência de aminoácidos bastante similar à sequência da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, com massa molecular que varia de 30 a 32 KDa; já a subfamília I.2 consiste em lipases significativamente semelhantes a lipase de *Burkholderia glumae*, com massa molecular maior quando comparada com a subfamília I.1 pois possuem dois filamentos antiparalelos β - adicionais na superfície da proteína, e assim como na subfamília I.1 as lipases são obtidas a partir de bactérias Gram-negativas e exportadas pela via de secreção do tipo II (Kovacic et al., 2019). Além disso, a expressão de lipases ativas pertencentes às subfamílias I.1 e I.2 depende da interação com chaperonas intramoleculares específicas: a foldase específica para lipase, ou proteínas “Lif” (Ramnath et al., 2017; kovacic et al., 2019).

A subfamília I.3 engloba lipases com massa molecular de 50 a 65 kDa, e difere das subfamílias I.1 e I.2 por ser exportada pela via de secreção I; a subfamília I.4

possui as menores lipases já identificadas, com cerca de 20 kDa, onde várias lipases de bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* são classificadas, diferentemente das subfamílias anteriores (Kovacic et al., 2019).

A subfamília I.5 compreende lipases originadas de diferentes gêneros de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus*, *Geobacillus* e *Clostridium*, sendo a massa molecular dessas enzimas de aproximadamente de 46 kDa. A família I.6 contém as lipases de *Staphylococcus* e possuem massa molecular de aproximadamente 75 kDa, enquanto que a subfamília I.7 é composta por três lipases, originadas de *Streptomyces cinnamoneus*, *Propionibacterium acnes* e *Janibacter* HTCC2649; e a subfamília I.8 recentemente proposta com base na identificação da lipase de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (KOVACIC et al., 2019).

A subfamília I.9 tem por proteína tipo a LipG, com o motivo GxSxG caracterizado pela sequência GHSLG, a enzima é de origem bacteriana e atinge atividade máxima contra os substratos C14 e C16; a subfamília I.10 é proposta pela identificação da enzima RlipE1, tem origem bacteriana, possui a sequência conservada GLSMG e atividade máxima contra o C16, o pH ótimo é entre 7 e 8 e a temperatura ótima é de 30 °C; a subfamília I.11 tem a proteína tipo MPlaG que possui a sequência consenso GHSLG, a enzima atinge atividade máxima em pH 8 e 25 °C e dados sugerem se tratar de uma família exclusivamente de ambiente marinho (Hitch e Clavel, 2019).

2.3 Lipases microbianas e sua aplicação biotecnológica

As lipases são encontradas em plantas, animais e em microrganismos, sendo que as lipases bacterianas apresentam mais versatilidade, são mais estáveis e reativas em meio orgânico (Ramnath et al., 2017). São muitos os microrganismos que produzem essa enzima quando na presença de substrato lipídico, as lipases bacterianas são produzidas por organismos Gram-positivos e Gram-negativos, dentre elas as mais reconhecidas comercialmente são as de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Staphylococcus* sp., encontradas principalmente em solos onde há a contaminação por óleos (Bharathi e Rajalakshmi, 2019).

As lipases bacterianas podem ser intracelulares, extracelulares ou estarem fixadas a membrana. Estas enzimas apresentam uma facilidade de manipulação genética e ambiental e isso permite a produção de enzimas modificadas e com alta diversidade catalítica (Javed et al., 2018). A produção de lipases por microrganismos é muito influenciada pela composição do meio, bem como por fatores físico-químicos como temperatura, pH e oxigênio dissolvido. A fonte de carbono é referida como fator principal para a expressão da atividade da lipase, já que estas são enzimas induzíveis, geralmente serão produzidas na presença de um lipídio ou outro indutor como triacilgliceróis, sais biliares e glicerol, assim, fonte de carbono lipídico é essencial para um alto rendimento de lipase (Thakur, 2012).

Geralmente, as lipases bacterianas são solúveis em água, insolúveis em etanol e apresentam uma alta taxa de hidrólise em pH de 4,0 a 11,0 (Xiao et al., 2017), como mostrado na tabela abaixo, que reúne alguma das lipases descritas na literatura (Tabela 2). Ademais, estas enzimas possuem grande valor na aplicação industrial, devido a sua tolerância a uma ampla faixa de pH e temperatura, alta especificidade, além de catalisar uma ampla gama de reações e não precisarem de cofatores (Xiao et al., 2017).

Tabela 2. Lipases bacterianas descritas na literatura indicando pH e temperatura ótimos.

Microrganismo	Substrato hidrolisado	pH e temperatura ótimos	Referências
<i>Halomonas</i> sp. BRI8	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (<i>p</i> NPP)	pH – 7,0 Temp – 10°C	(Jadhav et al., 2013)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KM110	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (<i>p</i> NPP)	pH – 7,0 Temp – 45°C	(Mobarak-Qamsari et al., 2011)

<i>Burkholderia gladioli</i> Bps-1	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (pNPP)	pH – 8,0 Temp – 50°C	(Zhu et al., 2019)
<i>Marinobacter litoralis</i> SW-45	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (pNPP)	pH – 8,0 Temp – 50°C	(Musa et al., 2019)
<i>Pseudomonas</i> sp. LM	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (pNPP)	pH – 8,0 Temp – 60°C	(Noormohamadi et al., 2013)
<i>Staphylococcus</i> sp. SDMLip	Emulsão de azite de oliva	pH – 6,0 Temp – 30°C	(Tipre et al., 2014)
<i>Burkholderia arboris</i> SL1B1	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (pNPP)	pH – 8,0 Temp – 60°C	(Matsuoka et al., 2009)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> PS3	Azeite de oliva	pH – 7,0 Temp – 55°C	(Sharma et al., 2017)
<i>Acidobacteria</i> sp. LP001	<i>p</i> -nitrofenil butirato	pH – 7,0 Temp – 50°C	(Faoro et al., 2012)
Metagenoma de sedimento de mangue	<i>p</i> -nitrofenil butirato	pH – 8,0 Temp – 35°C	(Couto et al., 2010)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> B1213	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (pNPP)	pH – 8,0 Temp – 50°C	(Li et al., 2018)
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25609	<i>p</i> -nitrofenil palmitato (pNPP)	pH – 9,0 Temp – 40°C	(Dalal et al., 2008)

O que é observado em diversos trabalhos (Matsuoka et al., 2009; Dalal et al., 2008; Sharma et al., 2017; Musa et al., 2019; Zhu et al., 2019) é que as enzimas

lipolíticas bacterianas apesar de possuírem um ponto ótimo de pH e temperatura para atingirem sua atividade máxima, são ainda ativas em uma ampla faixa de ambos.

As lipases microbianas são aplicadas em diversos setores industriais (Chandra et al., 2020). Na indústria alimentícia, elas são empregadas na fabricação de laticínios para aumentar o sabor de queijos e acelerar o tempo de maturação (Balcao e Malcata, 1998); no processamento de alimentos as lipases podem ser utilizadas para modificar óleos e gorduras, desse modo, lipídeos mais econômicos, mas menos apropriados podem ser melhorados para gorduras de maior valor (Chandra et al., 2020). As lipases também funcionam como biossensores na indústria alimentícia, sendo utilizadas na determinação quantitativa de triacilglicerol (Zehani et al., 2014); e também ajudam a melhorar as propriedades emulsificantes dos lipídios do ovo, assim menos gema de ovo é necessário em receitas de alimentos, como molhos e maionese (Chandra et al., 2020).

Na indústria de cosméticos as lipases também estão presentes, os ésteres de cera, utilizados em produtos de cuidado pessoal, estão sendo produzidos enzimaticamente; e as lipases ainda são utilizadas na limpeza, aroma e coloração de produtos do setor de cosméticos (Chandra et al., 2020). As lipases também podem ser empregadas nas indústrias farmacêutica e médica, na indústria têxtil e na fabricação de papel (Chandra et al., 2020).

As lipases também são amplamente utilizadas na limpeza de ambientes. No tratamento de águas residuais, as lipases podem hidrolisar até 90% gorduras (Chandra et al., 2020); na biorremediação as lipases são utilizadas para descontaminar locais onde ocorreram derramamento de óleo e despejo de resíduos industriais (Chandra et al., 2020). Estes problemas podem ser resolvidos com o uso de lipases de *C. rugosa*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, etc (Sarmah et al., 2018). Além disso, muitos microrganismos, como, *Bacterium aliphaticum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas maltiphilia*, *Fusarium verticaculloide*, *Botryodiphodia thiobroma* e *Aspergillus niger* produzem lipases capazes de degradar petróleo bruto (Chandra et al., 2020). Existem, ainda, relatos do uso de lipases na biodegradação de poliuretanos, utilizados na confecção de plástico (Chandra et al., 2020).

Outra aplicação de sucesso das lipases é na composição de detergentes, substituindo constituintes químicos nocivos ao meio ambiente (Chandra et al., 2020), nesse setor é importante enzimas estáveis a uma ampla faixa de temperatura, para se adaptarem a temperatura das máquinas de lavar. A lipase produzida por *Bacillus methylotrophicus* PS3 demonstrou potencial para uso na composição de detergentes, sendo que foi capaz de remover graxa, manteiga, azeite e óleo vegetal em tecidos manchados experimentalmente (Sharma et al. 2017).

As lipases também podem ser utilizadas na produção de biodiesel, via engenharia genética de lipases. Com a crescente preocupação acerca do aumento da poluição e das mudanças climáticas, juntamente com o aumento nos preços dos combustíveis fósseis, a busca por tecnologias alternativas na produção de biocombustível/biodiesel também aumentou (Chandra et al., 2020), o uso das enzimas lipolíticas pode ser uma via para substituir os combustíveis fósseis e ainda reduzir os resíduos lipídicos. A lipase de *Burkholderia cepacia*, por exemplo, é capaz de catalisar a transesterificação do óleo de rícino, um óleo não comestível (Sarmah et al., 2018).

Por fim, apesar de existir um grande número de enzimas lipolíticas bacterianas, aproximadamente 5000, menos de 10% destas foram estudadas experimentalmente (Kovacic et al., 2019). Cepas próximas taxonomicamente são capazes de produzir lipases de diferentes tipos, portanto, a busca por lipases com novas especificidades é essencial e temos um crescente potencial nesse sentido (Hasan et al., 2009).

2.4 Coleção de lipases do laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP)

A coleção de isolados utilizada no presente estudo faz parte da "Coleção de Isolados Bacterianos de *Burkholderia sp.*", que é composta por aproximadamente 50 isolados e está registrada no Sisgen ("Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado") sob o número C178BA0. Essa coleção abrange bactérias isoladas de diversos ambientes, incluindo a rizosfera de hortaliças, arroz e mimosa. Esses isolados foram previamente identificados como potenciais membros do gênero *Burkholderia* por meio de estudos preliminares que

envolveram testes bioquímicos e sequenciamento parcial do gene 16S RNA. Neste estudo, os isolados que anteriormente apresentaram resultado positivo para a atividade de esterase (especificamente ácidos graxos de cadeia curta, como a tributirina) foram submetidos a uma nova triagem com o objetivo de identificar lipases verdadeiras utilizando como substrato enzimático o azeite, um ácido graxo de cadeia longa.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Obter e caracterizar uma ou mais lipases verdadeiras a partir da coleção de isolados bacterianos do LBMP.

Objetivos específicos

1. Realizar a seleção dos microrganismos a partir de testes de atividade lipolítica utilizando azeite de oliva como substrato;
2. Extrair o material genético e realizar o sequenciamento do gene 16S RNA para identificação dos microrganismos a nível de gênero;
3. Expressar e purificar as lipases obtidas em meio extracelular;
4. Escolher um dos microrganismos para observar o padrão de degradação do azeite de oliva através de cromatografia gasosa;
4. Realizar a caracterização físico-química parcial da lipase do isolado selecionado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Triagem primária para a produção de lipase por diferentes cepas bacterianas

Para a análise qualitativa da produção das lipases foram selecionadas dez cepas bacterianas de uma coleção *ex-situ* do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) como “C178BA0” para serem submetidas a teste em meio sólido contendo azeite de oliva como substrato (Freire, 1996). A partir do estoque foi retirada uma alçada de células de cada um dos isolados e posteriormente estriadas em placas de Petri contendo meio LB (Tryptona 10,0 (g/L); NaCl 10,0 (g/L); Extrato de levedura 5,0 (g/L); Ágar 10,0 (g/L)) para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C. Uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio líquido LB e mantida sob agitação a 150 rpm por aproximadamente 16 horas. A seguir, 30 µL do inóculo foi adicionado em placas contendo meio LB suplementado com azeite de oliva 1% (v/v). As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias para visualização do halo de hidrólise.

Todos os meios de cultivo suplementados com azeite de oliva foram emulsificados em Sonicador ultrassônico Branson Sonifier 250 (Branson, Connecticut, EUA) com razão cíclica de 20% durante 30 segundos.

4.2 Cultivo do organismo e “screening” para atividade lipolítica no sobrenadante

Os isolados positivos para atividade lipolítica foram estriados em placas a partir do estoque, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. A seguir, uma colônia isolada de cada microrganismo foi inoculada em 50 mL de meio LB e deixado sob agitação a 150 rpm durante 16 horas para obtenção do pré-inóculo. A seguir, 1% (v/v) do pré-inóculo foi adicionado a um novo meio LB líquido suplementado com 1% (v/v) de azeite de oliva, e deixado sob agitação a 150 rpm por 48 horas a 30 °C. O inóculo foi centrifugado a 11000 x g por 40 minutos a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante de

cada um dos microrganismos, filtrada em membrana PES de 0,22 µm para a retirada de células, foi adicionada em uma placa de meio sólido composto por Tris HCl 25mM pH 8 e ágar 1% (p/v) suplementado com azeite de oliva 1% (v/v) 1% de ágar bacteriológico para solidificação. As placas foram incubadas a 30°C por 7 dias.

Uma alíquota do sobrenadante foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-Page 7% para visualizar a presença de proteínas em cada fração.

4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise filogenética

Os três isolados positivos para atividade lipolítica no sobrenadante tiveram o gene 16S rRNA totalmente sequenciados pelo método de Sanger. Para isso, a partir do estoque foi retirada uma alçada de células de cada um dos isolados e posteriormente estriadas em placas de Petri contendo meio para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C. Uma alçada de microrganismo foi transferida para meio LB líquido e mantido sob agitação 150 rpm por 24 horas a 30 °C. A suspensão bacteriana foi centrifugada durante 30 minutos a 4 °C e 11000 x g, o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado para a extração do DNA genômico (Marmur, 1961). A extração do DNA total foi realizada por kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Crawley, UK) seguindo as recomendações do fabricante e, em seguida, o perfil eletroforético observado em gel de agarose 0,8% acrescido de brometo de etídio (0,5 mg/mL) sob luz UV e a imagem do gel fotodocumentada em Gel Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

O DNA extraído foi utilizado para amplificação do gene 16S rRNA, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), com os oligonucleotídeos iniciadores universais (primers) fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), bem como com os primers internos 8F, 362, 786, 907 e 1209 (WEISBURG et al., 1991).

Para a reação de PCR foram utilizados 20 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂; 5 pMol de cada primer; 1,25 U de Taq polimerase e 50 ng/µL de DNA, a reação foi conduzida em termociclador, onde o primeiro ciclo de desnaturação foi a 95 °C durante

1 minuto, seguido por mais 40 ciclos a 95 °C durante 2 minutos, 36 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto, seguido de uma extensão final por 5 minutos a 72 °C.

O gene 16S rRNA amplificado foi purificado utilizando o kit Zymoclean DNA Recovery gel (Zymo Research) de acordo com as especificações do fabricante e os “amplicons” utilizados para o sequenciamento, o qual foi realizado em sequenciador capilar modelo ABI 3130XL (Applied Biosystems) utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing conforme recomendações do fabricante. O pacote Phred/Phrap/Consed foi utilizado para montagem dos contigs e análise da qualidade das sequências. A seguir, para a identificação dos microrganismos, as sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de gene 16S rRNA de espécies de *Burkholderia* pré-selecionadas depositadas no *GenBank* do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) utilizando a ferramenta BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” e também com sequências depositadas no RPD Ribossomal Database Project (WANG et al., 2007). O alinhamento das sequências foi realizado através da ferramenta MAFFT e a construção da árvore filogenética pelo software IQtree, a mesma foi visualizada e editada através da ferramenta online iTOL.

4.4 Expressão e purificação de lipase

Os microrganismos foram cultivados conforme descrito no item 4.2, o sobrenadante de cada cultura foi inicialmente submetido à precipitação com sulfato de amônio (Wingfield,1998) a 15% para remoção de impurezas, onde o sal foi adicionado aos poucos na solução sob agitação em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, a solução foi centrifugada a 7500 x g, 4°C, durante 30 minutos e o sobrenadante obtido foi submetido a saturação com 70% de sulfato de amônio, mantido em agitação por 2 horas em banho de gelo, e novamente centrifugado. Os precipitados obtidos, 15% e 70% de saturação, foram ressuspensos em aproximadamente 1 mL e 6 mL de tampão Tris HCl 20 mM pH 8, respectivamente. A seguir, o precipitado 70% foi dialisado no mesmo tampão sem sulfato de amônio durante 24 horas a 4 °C. Alíquotas de todas as fases de purificação foram visualizadas em gel de poliacrilamida SDS-Page 12,5%. A massa molecular das proteínas foi

estimada em aparelho Gel Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, Califónia, Estados Unidos da América) pelo método Point to point (semi-log).

4.5 Zimogramas

4.5.1 Zimograma em placa com azeite de oliva

A detecção da atividade das lipases foi realizada através de zimograma com azeite de oliva como substrato (Oh et al., 1999). As amostras não desnaturadas por fervura foram aplicadas em gel nativo de poliacrilamida 12,5% e a eletroforese realizada à temperatura ambiente de 4°C, em seguida o gel foi lavado sob agitação suave durante 10 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo 1% (v/v) de Triton X-100 e depois mais duas vezes em tampão sem o detergente.

Finalizando o processo de lavagem, o gel foi posicionado sob uma emulsão de meio LB sólido contendo azeite de oliva 1% (v/v) e incubado a 30 °C até a observação da formação dos halos de hidrólise, a fim de detectar a atividade lipolítica. A metade do gel de eletroforese foi utilizada para o zimograma e a outra metade foi corada com Coomassie Brilliant Blue.

4.5.2 Zimograma para atividade lipolítica pelo método Fast Garnet/ α -naftilacetato

Um zimograma em gel de poliacrilamida 10% para identificação de lipase através de atividade de esterase foi preparado conforme o anterior. Após a eletroforese, o gel foi corado com Fast Garnet 5 mg/mL dissolvido em SDS 10% (p/v) e a revelação foi feita com uma solução de α -naftilacetato 0,12M, contendo o corante e incubando por aproximadamente 30 minutos no escuro até o aparecimento das bandas de proteína. O corante foi descartado e o gel fixado em solução aquosa de glicerol 10% (v/v) (Mastropaolo e Yourno, 1981; Vorderwülbecke et al., 1992). A metade do gel de eletroforese foi utilizada para o zimograma e a outra metade corada com Coomassie Brilliant Blue. O marcador foi utilizado apenas para comparação relativa da disposição das bandas entre géis, e não foi levado em consideração para

estimar a massa molecular, considerando que o mesmo já foi adquirido junto ao fabricante na forma desnaturada e pré-corada.

4.5.2.1 Gel de poliacrilamida SDS Page corado com nitrato de prata

Constatada a presença de duas bandas com atividade no zimograma pelo método do Fast Garnet/ α -naftilacetato, foi preparado um gel de poliacrilamida SDS Page 10% afim de verificar a pureza da enzima purificada de *Burkholderia* sp. D15. Desse modo, após a eletroforese, um gel foi corado com Comassie Brilliant Blue, e outro idêntico foi submetido a coloração com prata (Hempelman e Krafts, 2017). Para isso, o gel foi fixado por 1 hora utilizando 50 mL uma solução contendo 25 mL de metanol; 6 mL de ácido acético; o volume foi completado com água. Em seguida, foi realizada 3 lavagens de 20 minutos cada com etanol 50%; depois foi utilizado tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) onde o gel foi deixado por 1 minuto; e o gel foi lavado mais três vezes com 100 mL de água durante 20 segundos. Após as lavagens, o gel foi corado durante 20 minutos com uma solução de 0,2% (p/v) de nitrato de prata e 0,1% (v/v) de formaldeído 37%. O gel foi lavado duas vezes em 100 mL de água durante dois minutos, e em seguida foi adicionado o revelador contendo 48 mL de Na₂CO₃, 50 μ L de formaldeído 37% e 2 mL de tiosulfato de sódio 0,02%; o gel ficou em agitação até o aparecimento das bandas e a revelação foi interrompida com o fixador.

4.6 Determinação da concentração da proteína

A estimativa da concentração das lipases foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) em diferentes concentrações para elaboração de uma curva padrão de concentração proteica. Isto permitiu estimar a concentração da lipase através da leitura da absorbância à 595 nm em aparelho espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan GO).

4.7 Comparação da atividade enzimática da lipase de *Burkholderia* sp. D15 na presença e na ausência da cultura microbiana e caracterização bioquímica da lipase LipBK

Devido ao fato de que *Burkholderia* sp. D15 demonstrou um halo maior no ensaio de hidrólise de azeite em placa, o qual foi diretamente secretado pelo microrganismo, em comparação com os outros isolados e até mesmo com a enzima purificada da mesma cepa bacteriana, foi decidido investigar a atividade enzimática na presença e na ausência desse isolado. Para avaliar o perfil de digestão enzimática do azeite, foi empregada a técnica de cromatografia gasosa. Essa abordagem permitiu analisar as transformações químicas ocorridas no substrato em resposta à ação enzimática. Além disso, a variação na atividade enzimática pode estar relacionada à capacidade do microrganismo de modificar o meio reacional, favorecendo a atividade catalítica em condições ótimas da enzima.

A fim de aprimorar o desempenho da enzima purificada em relação aos ácidos graxos de cadeia longa, que atuam como substrato, foi realizada uma caracterização bioquímica da enzima secretada por *Burkholderia* sp. D15, denominada de LipBK, visando otimizar sua eficiência catalítica.

A seguir, são detalhados os materiais utilizados, os procedimentos experimentais e as análises realizadas, fornecendo uma base sólida para a compreensão dos resultados obtidos.

4.7.1. Cromatografia gasosa de *Burkholderia* sp. D15

O microrganismo foi cultivado como no item 4.2, e 5 mL do cultivo foi centrifugado a 11000 x g à 4 °C por 40 minutos e o sobrenadante separado para extração dos lipídeos. Ao sobrenadante foram adicionados 10 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio, a solução ficou sob agitação por 1 hora a 30 °C, a seguir foi adicionado 5 mL de sulfato de sódio 1,5% (p/v) e o tubo foi agitado manualmente por 5 minutos e centrifugado por 30 minutos a 4 °C e 1800 x g. A fase aquosa da solução foi descartada e a fase inferior foi transferida para um béquer previamente pesado e deixado “overnight” em temperatura ambiente (23 °C) em capela de exaustão para

evaporação dos solventes. No dia seguinte, os béqueres foram pesados novamente para calcular a quantidade de lipídeo extraído.

Após a extração dos lipídeos, foi realizado a metilação para obtenção dos ácidos graxos metilados, onde foi adicionado 800 μL de n-hexano e 800 μL de hidróxido de potássio 2N em solução metanólica (KOH 2N/MEOH) às amostras de 20 mg de lipídeo. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C a 11000 x g, a fase superior foi coletada e 1 μL da mesma foi injetada no cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo GC-14B) acoplado com detector FID ("Flame Ionization Detector"), sob as seguintes condições de análise: coluna de 100 m (supelco) SP-2560; injetor – 250 °C; detector de ionização – 280 °C; rampagem: 140 °C por 5 minutos, aumentando para 4 °C por minuto até 235 °C por 20 minutos.

Também foi realizada a cromatografia gasosa para a enzima purificada e filtrada do mesmo microrganismo, a LipBK. Para tanto, foram preparados tubos de 50 mL contendo 5 mL de tampão Tris HCl 20 mM pH 8 suplementado com azeite de oliva 1% (v/v), os quais foram autoclavados e a eles foram adicionados 100 μL (0,6 mg) e 500 μL (3 mg) da enzima filtrada e, foram deixados sob agitação a 150 rpm durante 24 horas e 48 horas a 30 °C. Após isso, foi realizada a extração dos ácidos graxos e metilação como descrito anteriormente, e 1 μL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo a gás sob as mesmas condições de análise anterior.

Tanto para o cultivo quanto para a enzima filtrada, foram preparados e injetados de mesmo modo os controles, nos quais não havia a presença do microrganismo e da enzima, respectivamente.

4.7.2. Caracterização bioquímica da lipase secretada por *Burkholderia sp.* D15

Inicialmente, LipBK foi submetida a mensuração de catálise de substrato específico para lipases verdadeiras, utilizando o *p*-nitrofenil miristato (C14), sob as mesmas condições de pH e temperatura (pH 8, 30°C) utilizadas no experimento de cromatografia gasosa para a enzima purificada. O volume total da mistura reacional padrão foi de 100 μL e consistiu em 90 μL da solução do substrato em tampão e detergente (20 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de substrato, 0,3% de Triton

X-100) e 10 µL (0,6 mg) da enzima purificada diluída no mesmo tampão sem detergente. A mistura reacional foi mantida a 30 °C em “loop” cinético durante 200 repetições de 20 segundos e o *p*-nitrofenol liberado foi medido a 348 nm de absorbância, que é o ponto isosbético do *p*-nitrofenol, onde a absorbância neste ponto é independente do pH (Hriscu et al., 2013). A medição foi feita em espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO). Uma unidade enzimática da enzima foi definida como 1 µmol de *p*-nitrofenol produzido por minuto. A atividade enzimática foi calculada pela seguinte equação (Brito, 2012; Chan et al., 2002):

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = v_0 * (10^3 / \epsilon * l) * (vt/ve)$$

Onde: v_0 = velocidade obtida na porção linear da curva para a variação da absorbância em função do tempo (Δ Absorbância/ Δ tempo); 10^3 = valor da correção da unidade de ϵ de litro por mol para mililitro por micromol; ϵ = coeficiente de extinção molar ($L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$); l : passo óptico corrigido para leitura vertical (*k-factor*) (Lampinen et al., 2012); vt = volume total da reação (mL); ve = volume da enzima (mL).

Em seguida, LipBK foi submetida a um estudo de caracterização bioquímica preliminar, visando determinar as condições ótimas de catálise. Para tanto, o pH ótimo para a atividade enzimática foi obtido a partir de testes com valores 3 a 10,5 com intervalos de 0,5, a temperatura foi mantida em 37 °C e o substrato utilizado foi o *p*-nitrofenil láurico (C12) 1 mM. O resultado foi expresso em atividade específica “U/mg” de proteína através da conversão dos valores de taxas de conversão do substrato ao longo do tempo, e em valor de absorbância 348 nm para o tempo fixo de 40 minutos. Após determinado a faixa ideal de pH, foram realizados testes de temperatura, variando de 10 a 70 °C, com intervalos de 10 °C, em tampão Acetato de sódio 50 mM (pH 4,5); o ensaio foi realizado utilizando 1 mM de C12, como substrato. O substrato *p*-nitrofenil láurico (C12) foi escolhido para esta etapa de otimização em detrimento do *p*-nitrofenil miristato (C14), considerando que as cadeias menores de carbono possuem maior tolerância a hidrólise espontânea por aquecimento e em condição de pH ácida, permitindo uma melhor acurácia dos resultados comparativos. Todos os

ensaios foram realizados em triplicata e cada leitura foi subtraída de seu respectivo controle (branco, sem enzima).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de atividade lipolítica

Estudos mostraram que, em detrimento a outros substratos, a atividade lipolítica é maior quando é utilizado o azeite de oliva. A atividade de lipase de *Halomonas sp.* foi observada em vários substratos, como tributirina, óleo de coco, óleo de rícino e de palma e os melhores resultados foram obtidos em meio suplementado com azeite (Jadhav et al., 2013); resultados similares foram obtidos para uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Mobarak-Qamsari et al., 2011). As enzimas lipolíticas microbianas são produzidas por indução pelo substrato de genes produtores de lipases, e o azeite age como um forte indutor da enzima, seguido por outras fontes de carbono, como óleo de semente de mostarda e Tween 20 (Bharathi e Rajalakshmi, 2019). Também foi observado que a melhor concentração do substrato indutor, azeite de oliva, foi de 1% em um estudo com *Marinobacter litoralis* (Musa et al., 2019). Sendo assim, o azeite de oliva foi escolhido como substrato e agente indutor para “screening” de microrganismos capazes de secretar de forma extracelular enzimas lipolíticas verdadeiras, considerando seu histórico de agente indutor de excelência, ao mesmo tempo que possui característica complexa, sendo constituído de diferentes ácidos graxos de cadeia longa com diferentes comprimentos e estados de saturação, como por exemplo Palmítico (C16:0); Palmitoleico (C16:1); Esteárico (C18:0); Oleico (C18:1n9c); Linoléico (C18:2n6c); Araquídico (C20:0); Linolênico (C18:3n6); α -Linolênico (C18:3n3); Behênico (C22:0) e Tricosanóico (C23:0).

Um total de 10 isolados previamente escolhidos em estudos preliminares por apresentarem atividade em tributirina (substrato inespecífico para lipases e esterases, dados não mostrados) foram submetidos ao teste de produção de lipase verdadeira através da hidrólise do azeite de oliva e foram avaliados quanto a formação de halo de degradação, indicando atividade lipolítica (Figura 2). Os isolados que apresentaram

halo de degradação foram o D15, MT2, LP05 e A6I5, sendo o D15 qual apresentou um maior halo de dispersão em comparação aos outros isolados, apresentando uma zona de degradação um pouco mais opaca que os demais. Na figura 3, com um fundo escuro, é possível visualizar melhor o halo do isolado D15. Os outros seis isolados não apresentaram halo de degradação, conforme exemplificado na Figura 4.

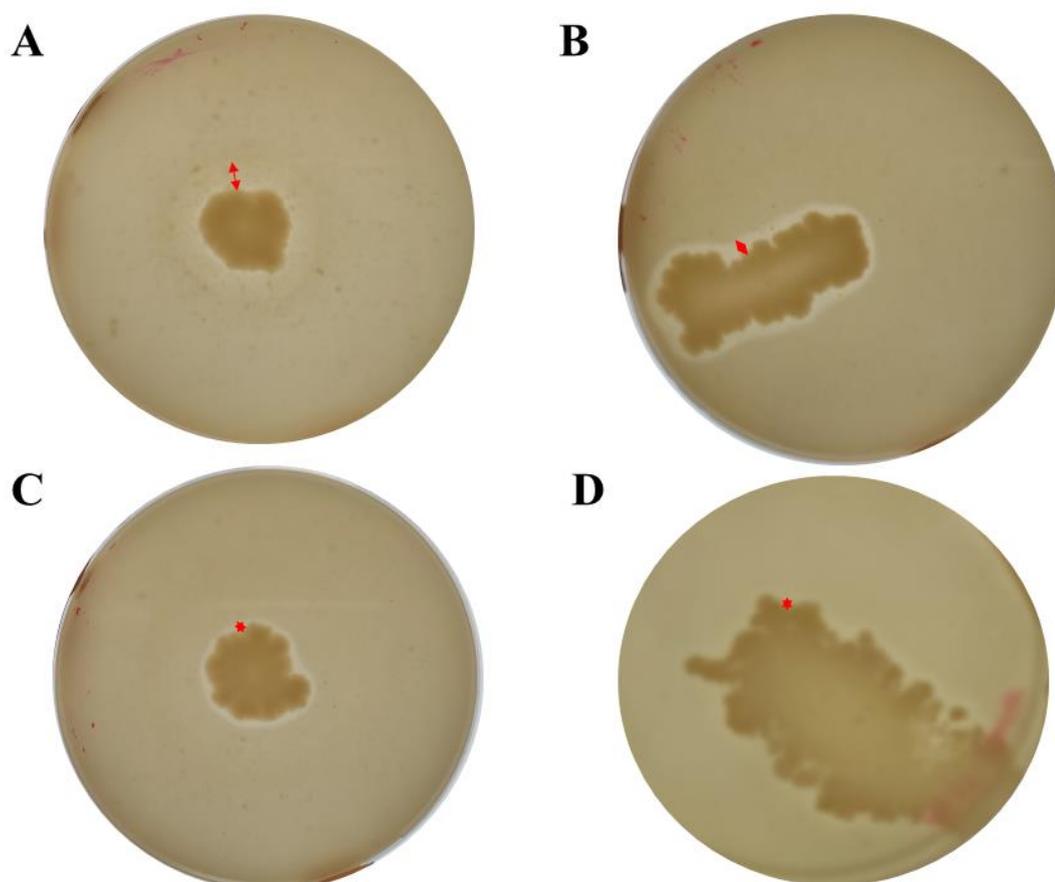


Figura 2. Teste de hidrólise do azeite de oliva. Halos de degradação do azeite de oliva 1% (v/v) por atividade lipolítica em placas de Petri com meio LB incubadas por 5 dias a 30 °C apresentados pelos isolados D15 (A), MT2(B), A6I5(C) e LP05 (D).

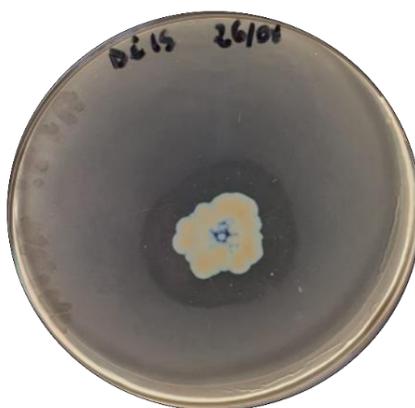


Figura 3. Teste de hidrólise do azeite de oliva para o isolado D15, nas mesmas condições descritas na figura anterior, imagem obtida com fundo escuro.



Figura 4. Teste de hidrólise do azeite de oliva. Exemplo de isolado que não apresentou halo de degradação.

5.2 Cultivo dos microrganismos e “screening” para atividade lipolítica no sobrenadante

Os quatro isolados positivos para atividade lipolítica foram cultivados e tiveram o sobrenadante separado por centrifugação, seguido de filtração para verificar a presença de atividade lipolítica nessa fração extracelular livre de células microbianas. As placas contendo Tris HCl suplementado com azeite de oliva foram visualizadas após 7 dias (Figura 5).

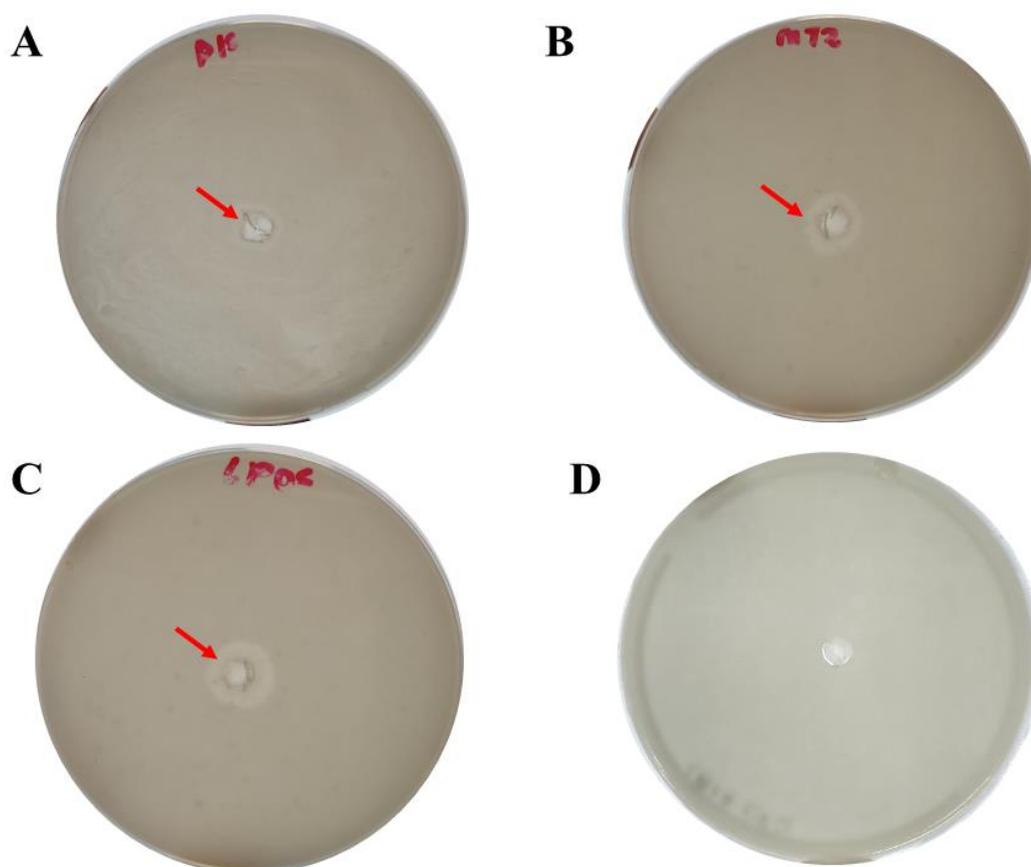


Figura 5. Halo de degradação formado pela presença de lipase no sobrenadante em placas contendo meio Tris HCl 25 mM pH 8 com azeite de oliva 1% (v/v) após 7 dias de incubação a 30 °C. **A:** isolado D15. **B:** isolado MT2. **C:** isolado LP05. **D:** isolado A615 sem a presença de halo de degradação.

Após 7 dias, a presença de halo de degradação do sobrenadante filtrado foi observada nas placas cultivadas com os microrganismos D15, MT2 E LP05, enquanto que para o microrganismo A615 não foi observada atividade enzimática. O que pode indicar que sua enzima lipolítica esteja de alguma forma associada a membrana e parede celular bacteriana, não estando presente de forma livre no sobrenadante filtrado. Uma das vantagens de se utilizar enzimas extracelulares na indústria é a maior facilidade para obtenção e purificação, reduzindo significativamente os custos no processo.

Outro resultado confirmando a presença de enzimas extracelulares no sobrenadante dos isolados D15, MT2 e LP05 foi observado em gel de poliacrilamida SDS-Page, sendo possível visualizar as bandas correspondentes às lipases destes

microrganismos (Figura 6), bem como é possível evidenciar a ausência de bandas de proteínas para o isolado A6I5.

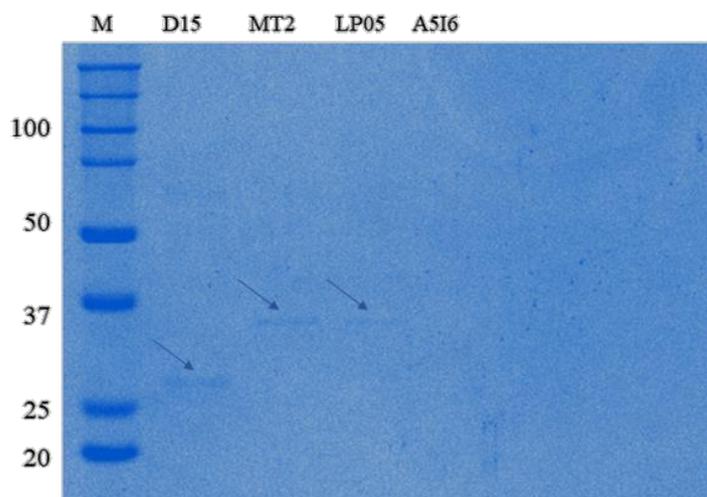


Figura 6. Gel de acrilamida 10% SDS – Page, bandas indicando presença de lipase no sobrenadante bruto. M: marcador de massa molecular (“Precision Plus Protein Dual Color Standards” – BioRad); as setas indicam as lipases dos isolados D15, com massa molecular de 28 kDa, MT2 e LP05, com massa molecular de 35 kDa (a massa molecular das proteínas foi estimada em aparelho Gel Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, Califónia, Estados Unidos da América) pelo método Point to point (semi-log)).

5.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

As cepas bacterianas MT2, D15 e LP05, isoladas de raízes de arroz (*Oryza sativa*), nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea*), e raízes de mimosa (*Mimosa pudica*), respectivamente, tiveram o DNA extraído e o gene 16S rRNA amplificado e sequenciado. Diante dos resultados obtidos a partir da análise filogenética constatou-se que os isolados MT2, D15 e LP05, pertencem ao gênero *Burkholderia* (Figura 7).

ambientes onde a temperatura é muito baixa e produzem lipases tolerantes ao frio (Hasan et al., 2009).

As lipases produzidas por cepas do gênero *Burkholderia* apresentam algumas características vantajosas em processos industriais, entre elas uma estabilidade em ampla faixa de temperatura, tolerância a solventes orgânicos e enantiosseletividade estrita (Zhu et al., 2019).

5.4 Expressão e purificação das lipases e zimograma

As enzimas secretadas no sobrenadante foram purificadas de impurezas do meio LB (como aminoácidos do extrato de levedura ou da triptona) e concentradas, utilizando respectivamente a precipitação com sulfato de amônio nas saturações de 15% e 70%. Alíquotas de sobrenadante bruto, das frações coletadas durante a precipitação com sulfato de amônio e da enzima dialisada para cada um dos três isolados que apresentaram atividade para lipase extracelular foram aplicadas em gel de poliacrilamida (Figura 8). Conforme pode ser observado nesta figura para os resultados da canaleta 6 dos respectivos tratamentos, foi possível evidenciar uma banda mais concentrada para *Burkholderia* sp. D15 (massa molecular estimada de 28 KDa) e duas bandas (massa molecular estimadas de 35 e 18 KDa, respectivamente) tanto para *Burkholderia* sp. MT2 quanto para *Burkholderia* sp. LP05 após a purificação da enzima.

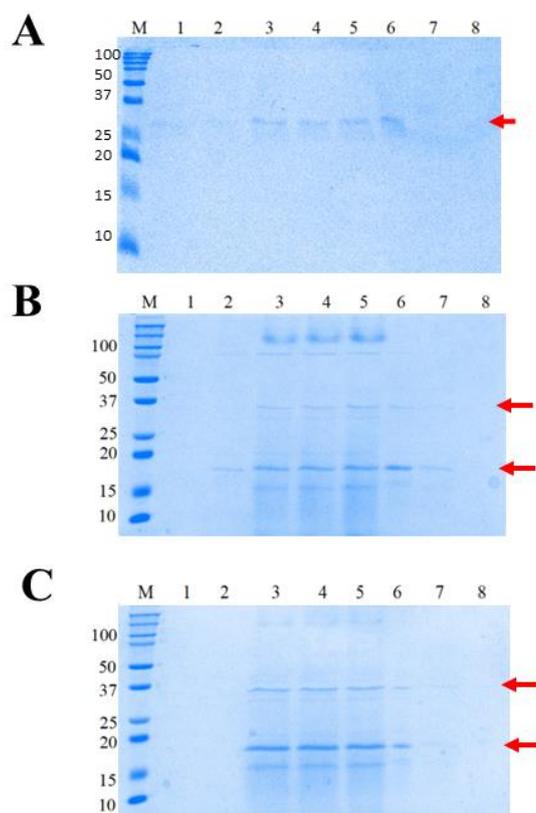


Figura 8. Gel SDS-Page 12,5% contendo as amostras provenientes da precipitação de proteínas dos isolados utilizando sulfato de amônio. (A) precipitação de proteínas de *Burkholderia* sp. D15; (B) precipitação de proteínas de *Burkholderia* sp. MT2; (C) precipitação de proteínas de *Burkholderia* sp. LP05. As linhas 1 representam o sobrenadante bruto do cultivo com azeite de oliva 1% (v/v) após 48h; as linhas 2 representam o precipitado após precipitação com 15% de sulfato de amônio; as linhas 3 a 5 representam o precipitado após precipitação com 70% de sulfato de amônio; as linhas 6 representam a lipase após a diálise; e as linhas 7 e 8 representam o sobrenadante após precipitação com 15% e 70% de sulfato de amônio, respectivamente. M: marcador de massa molecular (“Precision Plus Protein Dual Color Standards” – BioRad). As setas indicam as lipases purificadas.

A técnica para a purificação de enzimas lipolíticas microbianas vai depender se a mesma se encontra intracelular ou extracelular. Neste último caso, geralmente a técnica utilizada é a precipitação proteica com sulfato de amônio direto do meio de cultura após a retirada das células microbianas (centrifugação e filtração), seguida por diálise e cromatografia da fração purificada para retirada de sais e polimento, respectivamente (Bharathi e Rajalakshmi, 2019). O primeiro método (proteína

extracelular) representa maior praticidade para a indústria, uma vez que é muito mais simples e não envolve etapas de rompimento de células e separação de “debris” celulares das proteínas de interesse, sendo que muitos processos de aplicação dispensam até mesmo a fase de polimento cromatográfico, reduzindo o custo.

A maioria das lipases microbianas possuem massa molecular na faixa de 20 a 60 kDa (Mala e Takeuchi, 2008) podendo chegar a 75 kDa (Kovacic et al., 2019). O tamanho estimado em aparelho Gel Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, Califônia, Estados Unidos da América) pelo método Point to point (semi-log) para as cadeias polipeptídicas em eletroforese desnaturante foi de 28 kDa para *Burkholderia* sp. D15 e para *Burkholderia* sp. MT2 e *Burkholderia* sp. LP05 é possível observar duas bandas de proteína, uma com 35 kDa e outra com 18 kDa, aproximadamente. Adiante, no zimograma, é possível observar que a banda ativa é a de menor tamanho.

No zimograma em placa com substrato (Figura 9), foi possível observar a presença de halo de degradação para a enzima purificada de *Burkholderia* sp. D15 após aproximadamente 19 horas (Figura 9A). Para as enzimas purificadas de *Burkholderia* sp. MT2 e *Burkholderia* sp. LP05 a formação do halo de degradação não foi observada neste zimograma (Figura 9B e 9C, respectivamente), contudo, a ausência de halo não necessariamente indica ausência de lipase na fração purificada, pode ser um artefato da técnica, como danos sobre a enzima durante a purificação ou mesmo falta de sensibilidade do método utilizado para determinadas concentrações proteicas.

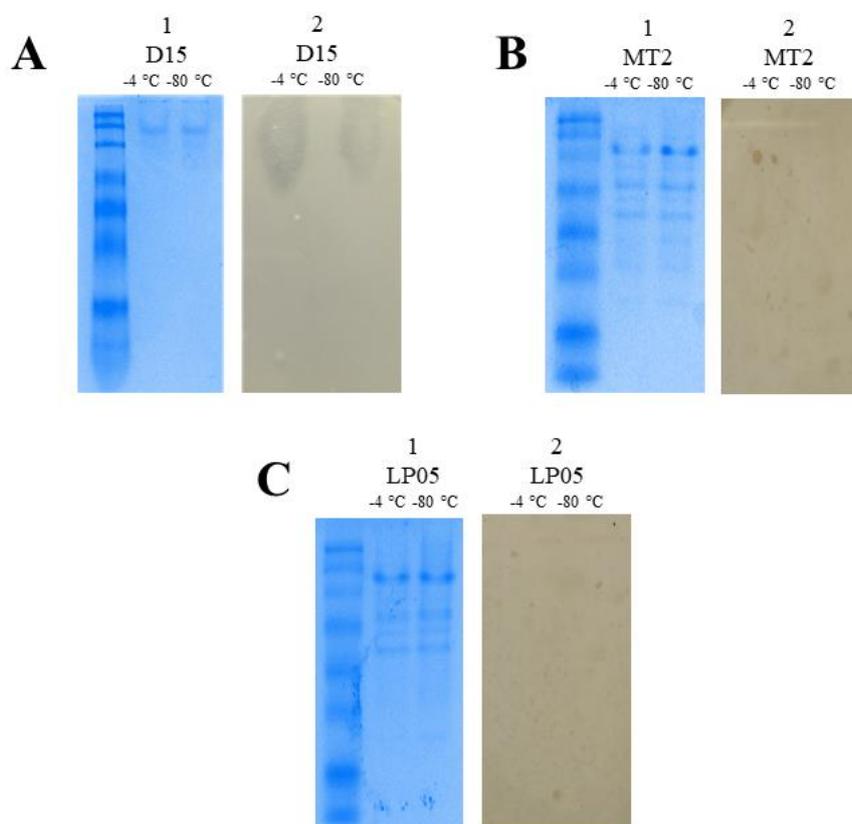


Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) das proteínas purificadas e o zimograma. Foram aplicadas amostras armazenadas em geladeira à 4°C durante 15 dias e amostras armazenadas em freezer -80°C com 10% (v/v) de glicerol. A presença/ausência de halo de degradação foi verificada e documentada após 19 horas. Lipase purificada de *Burkholderia* sp. D15 (A), com zimograma apresentando halo de degradação, e lipases extraídas de *Burkholderia* sp. MT2 (B) e *Burkholderia* sp. LP05(C), sem a presença de halo. 1 – Gel corado com Coomassie Brilliant Blue; 2 – Zimograma após incubação do gel sob meio de cultivo contendo 1% (v/v) de azeite de oliva.

O uso do tampão Tris-HCl, frequentemente utilizado na lavagem de gel de poliacrilamida para o equilíbrio dos mesmos pode reduzir a sensibilidade de detecção, de modo que pesquisadores utilizaram uma solução salina neutra para o equilíbrio dos géis e obtiveram melhores resultados quanto a sensibilidade de detecção de enzimas lipolíticas (Ng et al., 2021).

O mesmo estudo (Ng et al., 2021) também destaca que enzimas sensíveis ao calor são inativadas quando expostas a altas temperaturas durante o preparo do

sanduíche entre o gel de poliacrilamida e o substrato emulsificado, porque o ágar derretido quente é convencionalmente utilizado para formação de placa de ágar + substrato sobre a enzima. Os autores (Ng et al., 2021) conseguiram contornar o problema utilizando placa de ágar cromogênico pré-fabricada para a sobreposição do gel de proteínas. Neste trabalho foi tomado especial cuidado ao verter a emulsão de azeite em ágar, aguardando resfriamento a temperatura próxima a 40 °C, entretanto, apenas a lipase de *Burkholderia* sp. D15 apresentou resultado positivo. Estudos de análise bioquímica para os outros isolados ainda precisam ser feitos, mas como pode ser visto a frente na Figura 16, a lipase de *Burkholderia* sp. D15 (LipBK) apresentou atividade ótima entre 40-60°C, o que pode possivelmente explicar sua tolerância a temperatura utilizada no ensaio.

Diante disto, as frações purificadas foram avaliadas através de outro método de zimograma, o método cromatogênico Fast Garnet/ α -naftilacetato. Este método foi capaz de detectar a atividade de todas as enzimas purificadas, onde foi possível observar uma banda de atividade marrom para os três isolados testados (Figura 10). Isso acontece quando uma enzima com atividade lipolítica age na clivagem hidrolítica do α -naftilacetato, formando α -naftol e ácido acético, que se acopla ao sal Fast Garnet e forma um corante vermelho-marrom (Uddin et al., 2021). A partir dos dois zimogramas realizados foi possível confirmar a presença de lipases secretadas pelas três cepas de *Burkholderia* testadas. A atividade lipásica específica da enzima de *Burkholderia* sp. D15 pode ser inferida a partir da análise do zimograma de azeite, no qual essa enzima exibiu uma atividade significativamente maior em comparação com o método cromatogênico Fast Garnet/ α -naftilacetato, que é não específico para lipases e esterases. Essa discrepância sugere uma preferência da enzima de *Burkholderia* sp. D15 por substratos com cadeias longas. Em contrapartida, as outras duas cepas demonstraram uma atividade esterásica maior quando comparados a *Burkholderia* sp. D15. A partir da análise do zimograma apresentado na figura 10, pode-se observar que *Burkholderia* sp. LP05 e *Burkholderia* sp. MT2 exibiram uma maior atividade esterásica nas bandas de menor massa molecular, enquanto uma zona clara discreta foi notada apenas na região correspondente à banda de maior massa molecular para ambos os isolados. De forma interessante, o ensaio de Fast

Garnet/ α -naftilacetato revelou uma segunda banda de massa molecular semelhante àquelas observadas nas bandas de menor massa dos outros isolados, para *Burkholderia* sp. D15, não detectada na outra metade do gel corada com Comassie Brilliant Blue.

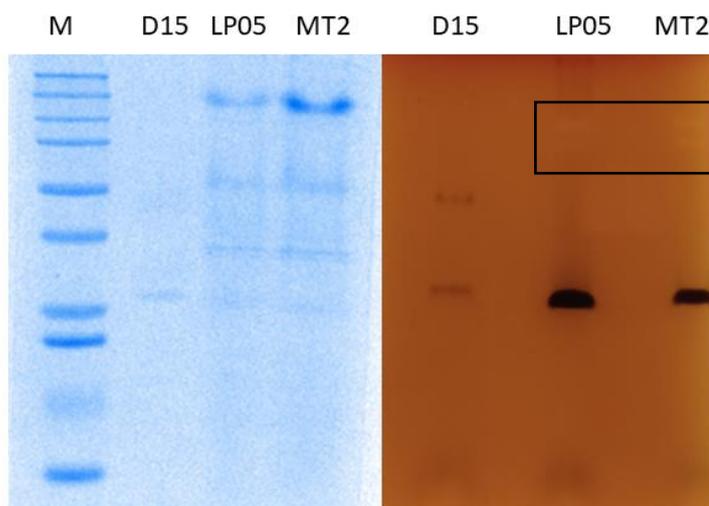


Figura 10. Identificação da atividade da lipase em gel de poliacrilamida corado com Fast Garnet e revelado com α -naftilacetato, a outra metade do gel, a direita, foi corada com Comassie Brilliant Blue. O gel foi incubado sob agitação por 30 minutos no escuro até o aparecimento das bandas. A imagem foi registrada em aparelho fotodocumentador Gel Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América) através do software Image Lab R (Bio-Rad). (A) lipase extraída de *Burkholderia* sp. D15 em gel 7%; (B) lipase extraída de *Burkholderia* sp. MT2 em gel 10%; (C) enzima extraída de *Burkholderia* sp. LP05 em gel 10%. As linhas 1 correspondem a enzima dialisada e armazenada com 10% de glicerol em freezer -80°C e as linhas 2 correspondem a enzima armazenada com 10% de glicerol em geladeira a 4°C durante 15 dias. Retângulo: zona clara indicando discreta atuação esterásica das bandas superiores presentes em *Burkholderia* sp. MT2 e *Burkholderia* sp. LP05.

Ao ser observada a presença de duas bandas com atividade lipolítica no zimograma pelo método de Fast Garnet/ α -naftilacetato, uma amostra da enzima purificada de *Burkholderia* sp. D15 foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-Page e, após a eletroforese, o gel foi submetido a uma coloração com prata para confirmar a pureza da enzima, onde comprovou-se tratar de uma banda única (Figura 11).

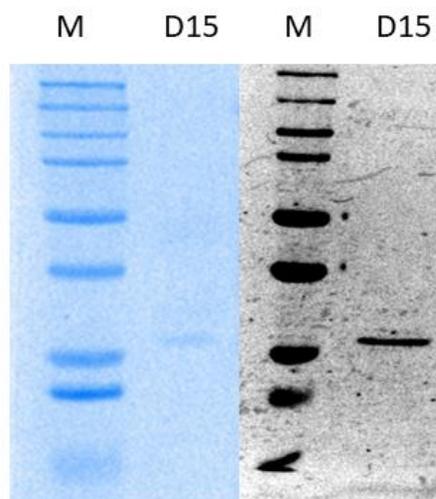


Figura 11. Gel de poliacrilamida SDS Page 10% corado com Comassie Brilliant Blue (à direita) e com nitrato de prata (à esquerda) apresentando apenas uma banda correspondente a lipase purificada de *Burkholderia* sp. D15.

A presença de duas bandas no zimograma pelo método do Fast Garnet/ α -naftilacetato pode tratar-se de duas conformações diferentes da mesma enzima, na condição não desnaturante, por isso ambas apresentam atividade. Muitas lipases apresentam mais de uma conformação, essa variação pode ser devido às condições externas e a presença ou ausência de inibidores que levam a um rearranjo conformacional (Cygler e Schrag, 1999).

5.5 Comparação da atividade enzimática da lipase de *Burkholderia* sp. D15 com e sem a presença da cultura microbiana, seguida da caracterização bioquímica da lipase LipBK

Considerando que *Burkholderia* sp. D15 apresentou um halo maior no ensaio de hidrólise de azeite em placa, diretamente secretado pelo microrganismo, quando comparado com as outras cepas e até mesmo com a enzima purificada de *Burkholderia* sp. D15, foi decidido caracterizar a atividade enzimática na presença e ausência do microrganismo. Isso significa comparar a produção secretada diretamente pela cultura com a enzima purificada. Para isso, foi utilizado o perfil de

digestão enzimática do azeite em ambos os tratamentos, por meio de cromatografia gasosa.

Uma vez que a variação na atividade pode ser atribuída à capacidade do microrganismo de modificar o ambiente reacional para favorecer a atividade catalítica nas condições ótimas da enzima, uma caracterização bioquímica da enzima purificada foi realizada com o objetivo de melhorar seu desempenho frente a ácidos graxos de cadeia longa, que atuam como substrato.

5.5.1 Cromatografia gasosa (CG)

Apesar de apresentar o maior halo em meio de cultura, o halo da enzima filtrada secretada por *Burkholderia* sp. D15 mostrou-se menor em comparação com os halos formados pelas enzimas filtradas de *Burkholderia* sp. MT2 e *Burkholderia* sp. LP05. Isso pode ser explicado pela diferença de capacidade catalítica entre a enzima em meio de cultura livre de células e a atividade hidrolítica na presença do microrganismo. Na última condição, o equilíbrio reacional pode ser deslocado favorecendo a formação dos produtos, os quais são consumidos pelo microrganismo, reduzindo o efeito inibitório alostérico causado pelo acúmulo do produto. Outra possível explicação é a interação sinérgica entre enzimas secretadas e intracelulares, favorecendo *Burkholderia* sp. D15 em condições de cultura e hidrólise simultânea. Assim, buscamos aqui compreender um pouco mais sobre a dinâmica de atuação da enzima em co-cultivo em comparação com a enzima purificada, avaliando os resultados obtidos para MAGs (perfil de ácidos graxos metilados) em ambos os tratamentos por CG.

5.5.1.1 Cromatografia gasosa do cultivo de *Burkholderia* sp. D15

A partir da análise de cromatografia gasosa, foi possível observar que, quando comparados os picos dos ácidos graxos entre a amostra de azeite e a amostra emulsão de azeite em LB na ausência dos microrganismos, foram obtidas as mesmas concentrações de ácidos graxos e a mesma altura dos picos em ambos, indicando assim que, mesmo emulsificando o azeite de oliva, este manteve as mesmas características exibida pelos ácidos graxos.

Entretanto, quando foi adicionada *Burkholderia* sp. D15, esta cepa bacteriana foi capaz de reduzir drasticamente os picos de ácidos graxos de cadeias maiores (Figura 12), sendo eles: o pico 12, correspondente ao Palmítico (C16:0); o pico 13, correspondente ao Palmitoléico (C16:1); o pico 16, correspondente ao Estearíco (C18:0); o pico 18, correspondente ao Oleico (C18:1n9c); o pico 20, correspondente ao Linoléico (C18:2n6c); o pico 21, correspondente ao Araquídico (C20:0); o pico 22 correspondente ao Linolênico (C18:3n6); o pico 24 correspondente ao α -Linolênico (C18:3n3) e o pico 27 correspondente ao Behênico (C22:0). Somente o ácido graxo de maior comprimento de cadeia carbônica (pico 32, Tricosanoico C23:0), aparentemente não foi metabolizado pelo microrganismo. Contudo, os picos de 2 a 5, que representam os ácidos graxos de cadeia carbônica mais curta (C6:0-C11:0), e também não sofreram grandes alterações, indicando uma preferência do microrganismo por ácidos graxos de cadeias maiores (picos 12-27, de C16:0-C22:0), os quais foram visivelmente consumidos. Estes resultados indicam que *Burkholderia* sp. D15 é potente na degradação de lipídios com ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia média e longa, devido a capacidade de secretar lipases verdadeiras com alta atividade hidrolítica.

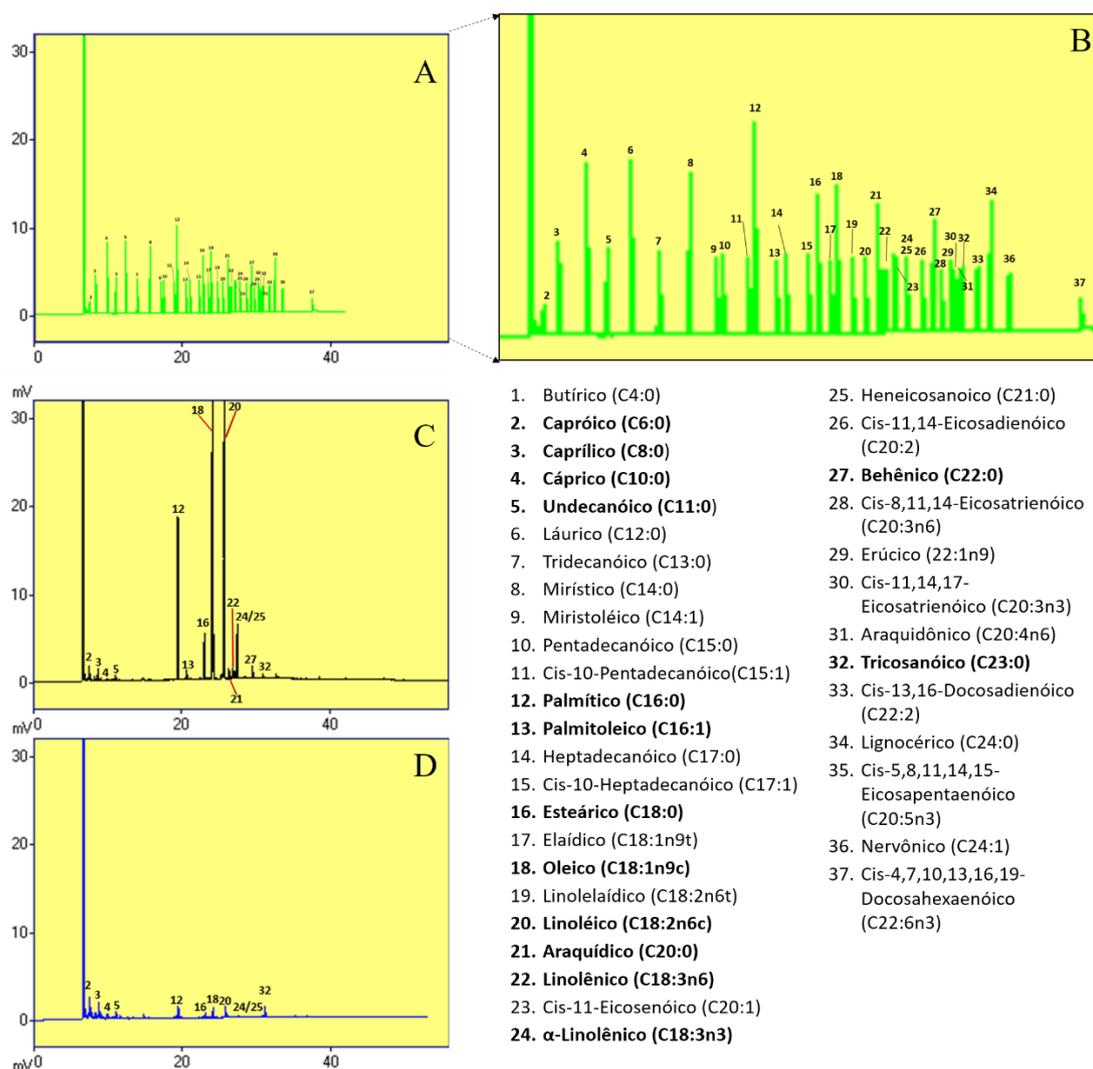


Figura 12. Ensaio de cromatografia gasosa mostrando o perfil de degradação de ácidos graxos em meio LB suplementado com azeite de oliva 1% (v/v) pela cepa bacteriana produtora de lipase extracelular *Burkholderia* sp. D15. (A) e (B) Padrão comercial de mistura de ácidos graxos metil-esterificados “Sulpeco 37 FAME Mix”; (C) meio de cultura suplementado com azeite de oliva sem a presença do organismo; (D) meio de cultura suplementado com azeite de oliva com a presença do organismo.

A ação conjunta de microrganismo e enzima na degradação dos ácidos graxos foi demonstrada em estudo (Marchut-Mikolajczyk et al., 2020) que avaliou a ação combinada da biodegradação de hidrocarbonetos por *Bacillus cereus* EN18 e da biotransformação por um preparado enzimático de lipase, e foi observado que o preparado de enzimas aumentou a atividade emulsificante do microrganismo e, conseqüentemente, aumentou a biodegradação.

O estudo citado (Marchut-Mikolajczyk et al., 2020) correlacionou o aumento da biodegradação ao aumento da concentração de ácidos graxos livres ocasionado pela presença da enzima, que passa a diminuir ao final do experimento, indicando também que os microrganismos podem ter assimilado os ácidos graxos livres como fonte de carbono, em uma análise de cromatografia gasosa foi evidenciado uma diminuição significativa na concentração de hidrocarbonetos por biodegradação no tratamento com a adição do preparado enzimático em comparação ao tratamento onde havia somente a presença do microrganismo, o aumento na biodegradação chegou a 40%.

Também foi possível verificar por meio de cromatografia gasosa que o isolado produtor de lipase *Bacillus cereus* HSS foi capaz de degradar resíduos oleosos, o perfil cromatográfico indicou uma diminuição na concentração dos ácidos graxos C12 e C23, e a degradação total de C25 e C32, após 72 horas (Hassan et al., 2018), diferentemente de *Burkholderia* sp. D15 que não foi capaz de degradar o C32, porém após 48 horas. A completa degradação de óleo de canola também foi relatada após 40 horas em uma cultura mista de uma bactéria produtora de lipase, *Burkholderia arboris* SL1B1 e uma levedura assimiladora de glicerol (Matsuoka et al., 2009).

5.5.1.2 Cromatografia gasosa da enzima purificada e filtrada

Quando utilizado a enzima filtrada em tampão com emulsão de azeite, observamos que os picos de ácidos graxos diminuem em comparação com o tampão com emulsão de azeite sem a presença da enzima, indicando a degradação dos ácidos graxos pela enzima (Figura 13). A degradação de ácidos graxos pela enzima aumenta em relação ao tempo de incubação, sendo maior após 48 horas em comparação a 24 horas (Figura 13, B e C).

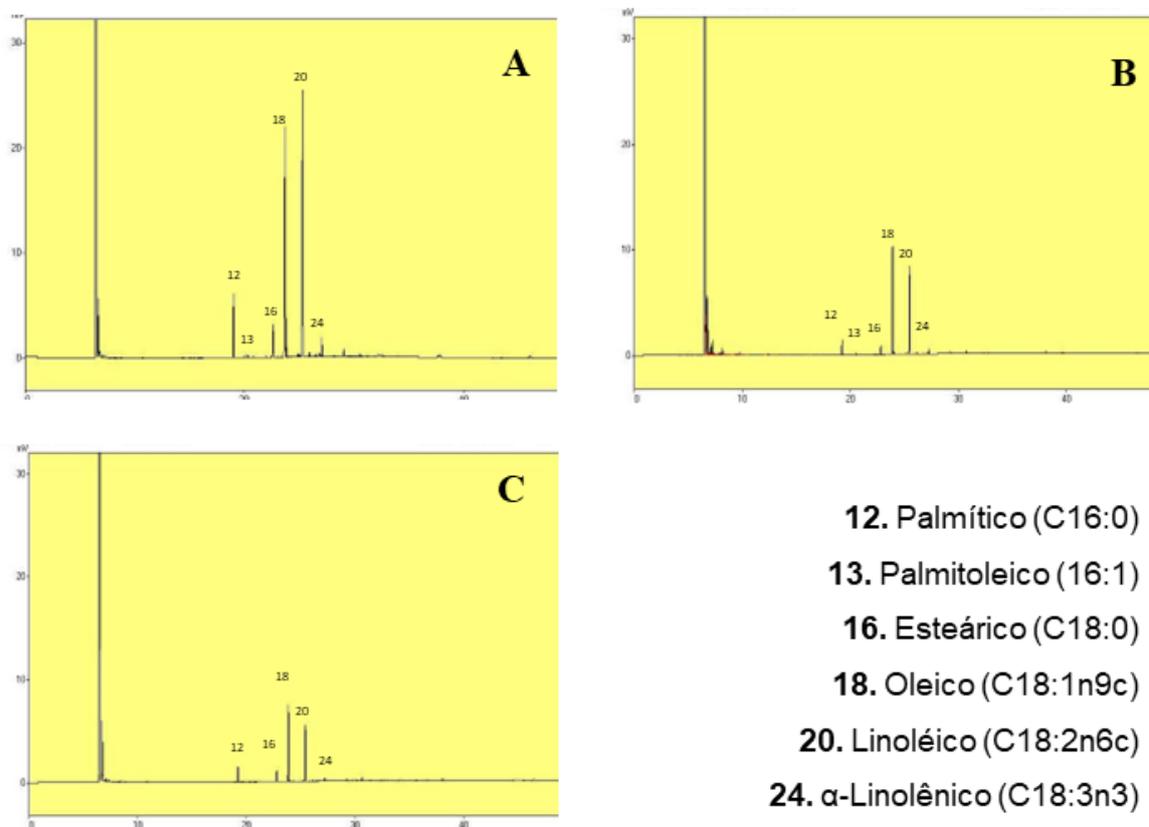


Figura 13. Ensaio de cromatografia gasosa mostrando o perfil de degradação de ácidos graxos em tampão Tris HCl 20 mM pH8 suplementado com azeite de oliva 1% (v/v) pela lipase extracelular extraída de *Burkholderia* sp. D15. (A) tampão suplementado com azeite de oliva sem a presença da lipase; (B) tampão suplementado com azeite de oliva e inoculado com 100 μ L (0,6mg) de lipase, após 24 horas; (C) tampão suplementado com azeite de oliva e incubado com 100 μ L (0,6 mg) de lipase, após 48 horas.

Quando se aumentou a concentração de enzima de 100 μ L (0,6 mg) para 500 μ L (3,0 mg), foi observada uma maior degradação dos ácidos graxos pela enzima (Figura 14).

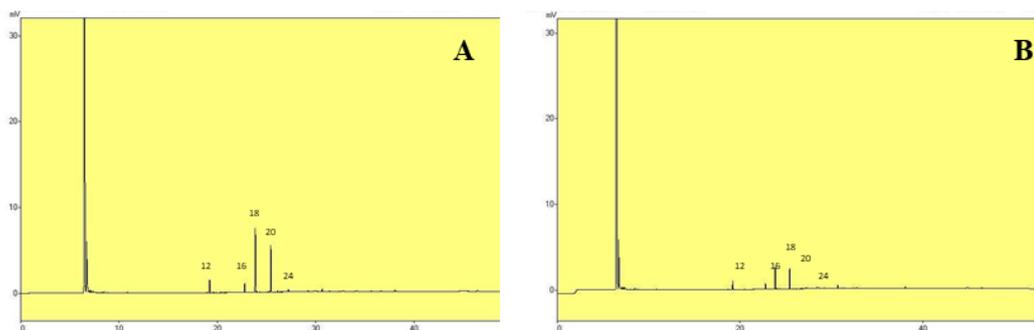


Figura 14. Ensaio de cromatografia gasosa mostrando o perfil de degradação de ácidos graxos em tampão Tris HCl 20 mM pH8 suplementado com azeite de oliva 1% (v/v) pela lipase extracelular extraída de *Burkholderia* sp. D15 em diferentes concentrações, após 48 horas de incubação. (A) 100 µL (0,3 mg) da enzima lipase; (B) 500 µL (3,0 mg) da enzima lipase.

Os ácidos, palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), não sofreram alterações quanto ao tempo de incubação, tendo a hidrólise enzimática dos mesmos se mantido. Já quando aumentada a concentração da enzima de 100 µL (0,3 mg) para 500 µL (3,0 mg) a hidrólise é quase completa, ficando acima de 90%, exceto para os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), onde a hidrólise chegou a 86 e 83% respectivamente, porém foram os que mais sofreram degradação nas primeiras 24 horas com 100 µL (0,3 mg) da enzima apenas (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de degradação de ácidos graxos pela lipase de *Burkholderia* sp. D15, comparando diferentes tempos e concentração da enzima.

Nº pico	Ácido Graxo	Tratamento			
		Controle	100 µL (0,3 mg) 24 h	100 µL (0,3 mg) 48 h	500 µL (3,0 mg) 48 h
12	Palmítico (C16:0)	0%	79%	79%	86%
13	Palmitoleico (C16:1)	0%	64%	80%	93%
16	Esteárico (C18:0)	0%	78%	78%	83%
18	Oleico (C18:1n9c)	0%	67%	78%	93%

20	Linoléico (C18:2n6c)	0%	77%	86%	94%
24	α -Linolênico (C18:3n3)	0%	77%	85%	94%

Ao comparar o ensaio em que foi avaliado o efeito da enzima junto ao organismo, foi possível observar que os picos de ácidos graxos presentes no azeite são menores na presença do organismo. Isso sugere que o microrganismo está assimilando os ácidos graxos como fonte de carbono, o que é facilitado pela presença da enzima. No entanto, é importante destacar que os resultados obtidos no ensaio sem a presença do microrganismo são igualmente relevantes, alcançando uma taxa de degradação de até 94%.

5.5.2 Caracterização bioquímica da lipase de *Burkholderia* sp. D15

Visando a padronização dos ensaios com relação as condições físico-químicas do “screening” inicial, os resultados do perfil de MAGs para a enzima por CG foram obtidos nas mesmas condições dos ensaios em placa com os microrganismos. Sendo assim, os ensaios de perfil de degradação de ácidos graxos foram conduzidos anteriormente a caracterização físico-química da enzima, desse modo, esse fator pode ter influenciado nos resultados obtidos, já que a enzima não possuía condições ótimas de temperatura e pH para alcançar sua atividade máxima contra os ácidos graxos presentes no azeite de oliva. Visado mensurar a atividade inicial dos ensaios, LipBK foi inicialmente avaliada quanto à sua capacidade de catalisar um substrato específico para lipases verdadeiras, utilizando o *p*-nitrofenil miristato (C14). Essa análise foi realizada nas mesmas condições de pH (8) e temperatura (30°C) utilizadas no experimento de cromatografia gasosa para a enzima purificada.

LipBK apresentou uma atividade sobre o *p*-nitrofenil miristato (C14) de 0,136 U/mL e atividade específica de 0,297 U/mg nestas condições iniciais. As lipases e as esterases são diferenciadas com base na preferência por substrato, as esterases agem em ésteres acil de cadeia curta e não agem em triacilgliceróis de cadeia longa, que são preferencialmente hidrolisados pelas lipases (Chahiniana e Sarda, 2009), por

essa característica a lipase extraída de *Burkholderia* sp. D15 pode ser considerada uma lipase verdadeira, capaz de hidrolisar substratos de cadeia carbônica longa.

O efeito do pH na atividade da enzima foi determinado utilizando o substrato C12 e a 37 °C, a lipase mostrou preferência por pH ácido, com maior atividade em pH 4,5 (Figura 15). À medida que o pH fica mais alcalino a tendência apresentada pela enzima é que a atividade diminua. O que pode ser correlacionado a atividade apresentada pela enzima nas condições iniciais de reação em que foi utilizado pH 8,0, onde esta foi relativamente baixa. A otimização do pH e da temperatura confere às lipases microbianas tempos de reação mais curtos (Li et al., 2018)

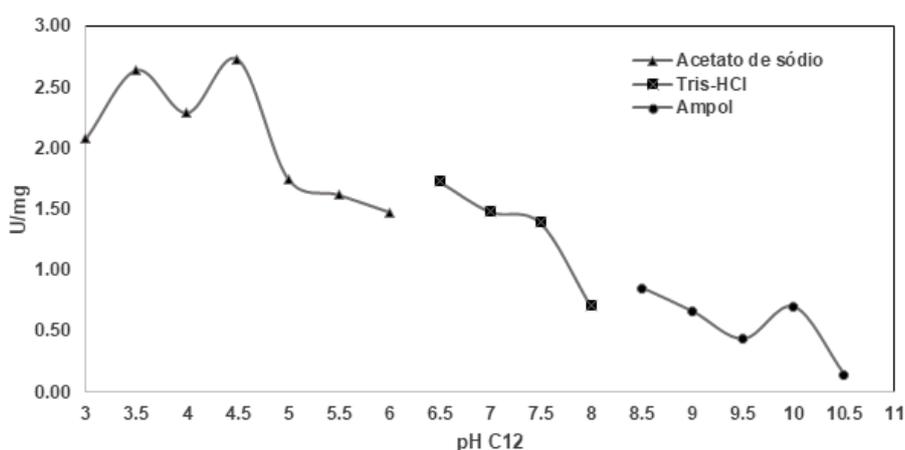


Figura 15. Efeitos do pH e da temperatura na atividade da lipase de *Burkholderia* sp. D15. (A) Efeito do pH apresentado em atividade específica (U/mg), as reações ocorreram a 37 °C e pH variando de 3,0 a 10,5, usando 1 mM do substrato *p*NP-Palmitato (C16).

Interessantemente, a maioria das lipases microbianas exibem uma alta atividade e estabilidade quando em pH neutro, as lipases com atividade em pH ácido provêm principalmente de organismos fúngicos (Lim et al., 2022). As lipases ácidas são mais vantajosas para a indústria alimentícia e química, já que estas podem realizar as reações em condições ácidas, evitando contaminação por microrganismos e sem danos à enzima, bem como reações indesejadas que podem ocorrer pela presença de enzimas contaminantes (Lim et al., 2022).

A temperatura ótima foi obtida por análises estocásticas ao invés de loop cinético, e os resultados foram expressos em porcentagem de atividade relativa. A enzima apresentou uma maior atividade entre 40 e 60 °C (Figura 16) e ampla tolerância a diferentes temperaturas, entre 20 – 70 °C a atividade relativa se manteve acima de 50%.

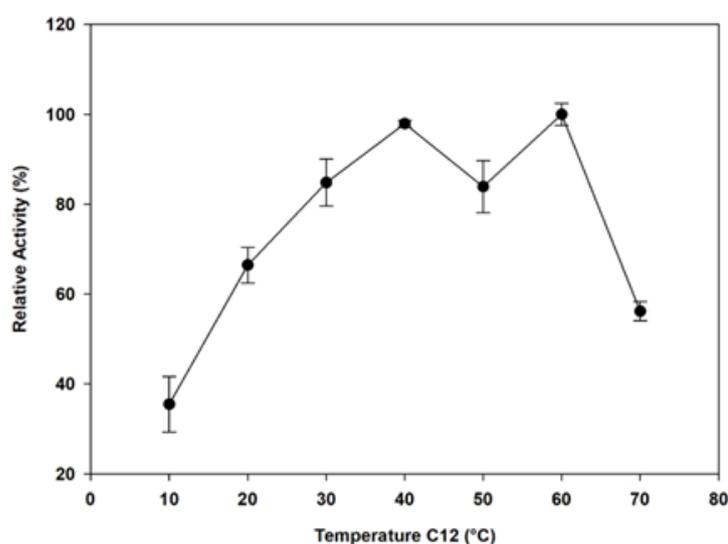


Figura 16. Efeito da temperatura, com atividade relativa obtida frente a várias temperaturas em tampão Acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), utilizando 1 mM do substrato pNP-Laurico (C12).

As lipases de *Burkholderia* sp. possuem tolerância a uma ampla faixa de temperatura, como por exemplo a lipase produzida por *Burkholderia gladioli* Bps-1 que se mostrou ativa em uma faixa de temperatura, de 25 a 70 °C (ZHU et al., 2019). A cepa *Burkholderia pyrrocinia* B1213, por sua vez, produz uma lipase estável entre 30 e 80 °C (Li et al., 2018) e a lipase de *Burkholderia arboris* SL1B1 obteve uma atividade acima de 40 U/mL em temperatura de 50 a 70 °C, sendo que a 80 °C a enzima ainda podia manter 60% da condição inicial após 1 hora (Matsuoka et al., 2009). Essa característica confere vantagem a essas enzimas, de modo que podem ser utilizadas em bioprocessos em diferentes temperaturas, suportando temperaturas maiores que 60 °C. Desse modo, a lipase extraída de *Burkholderia* sp. D15 apresenta um grande

potencial de aplicação em processos industriais, visto que possui características desejadas como a tolerância a altas temperaturas e preferência por pH ácido.

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>

Cyglar 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. **Songklanakarinn 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 microorganisms. **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