

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Bioprospecção de microrganismos lipolíticos obtidos de efluentes
industriais**

Greice Hartwig Schwanke Peil

Pelotas, 2015

GREICE HARTWIG SCHWANKE PEIL

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS LIPOLÍTICOS OBTIDOS DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Anelise Vicentini Kuss

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P377b Peil, Greice Hartwig Schwanke

Bioprospecção de microrganismos lipolíticos obtidos de efluentes industriais / Greice Hartwig Schwanke Peil. - 54f. : il. - Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2015. - Orientadora Patrícia da Silva Nascente ; co-orientadora Anelise Vicentini Kuss.

1.Efluente. 2.Microrganismo lipolítico. 3.Produção de lipase extracelular. 4.Atividade enzimática. 5.Azeite de oliva. I.Nascente, Patrícia da Silva. II.Kuss, Anelise Vicentini. III.Título.

CDD: 664.362

Agradecimentos

Banca Examinadora:

Vanessa Sacramento Cerqueira

Prof^a. Dr^a Vanessa Sacramento Cerqueira

Robson Andreazza

Prof. Dr Robson Andreazza

Patrícia da Silva Nascente

Prof^a. Dr^a Patrícia da Silva Nascente

(orientadora)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e por estar sempre ao meu lado, concedendo sabedoria, força, renovação e perseverança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu esposo, Jerry, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos.

Aos meus pais Ivo e Marli, pelo incentivo, ajuda e amor de sempre.

À minha irmã, Muriel, pela ajuda e companheirismo.

À Prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente, pela credibilidade conferida a mim, amizade, dedicação e ensinamentos, durante esse período.

À Prof. Dra. Anelise Vicentini Kuss, a valiosa colaboração, apoio e parceria neste estudo como co-orientadora, auxiliando em todos momentos do trabalho.

À Prof. Dra. Daniela Brayer Pereira, a colaboração na identificação dos fungos.

Aos colegas de laboratório Andrés, Yohana e Angelita, pela amizade, companheirismo e grande ajuda no decorrer dessa jornada.

À Isabel pela colaboração na identificação bacteriana.

Ao laboratório de micologia veterinária da UFPel, pela disposição do local, material e equipamentos.

À UFPel e o Programa de Pós-Graduação de Bioquímica e Bioprospecção, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou essa pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

Resumo

PEIL, Greice Hartwig Schwanke. **Bioprospecção de microrganismos lipolíticos obtidos de efluentes industriais**. 2015. 54f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Efluentes ricos em óleos e gorduras são responsáveis por sérios problemas em sistemas de tratamento de efluentes, e por grandes impactos ambientais. Uma alternativa para o tratamento desse tipo de efluente consiste na utilização de processos biológicos, incluindo microrganismos produtores de enzimas lipases. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e apresentam capacidade de degradar óleos e gorduras contidos em efluentes, através da hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis. As lipases podem catalisar outras diversas reações, sendo aplicáveis em diversos setores industriais. Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar microrganismos produtores de lipases, provenientes de diferentes efluentes de indústrias alimentícias da região de Pelotas, RS. As bactérias foram identificadas quanto à coloração de Gram e provas bioquímicas (Sistema Vitek 2®), e os fungos, visualizados quanto à macromorfologia e micromorfologia. A produção de lipase extracelular foi avaliada pelo teste rodamina B e a atividade enzimática, por titulação. Foram isoladas 21 bactérias, identificadas como *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica* e *Raoultella planticola*. Os fungos filamentosos isolados foram caracterizados aos gêneros *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma* sp.. A produção de lipase extracelular foi observada em 71,43% das bactérias e 57,14% dos fungos. Quanto a atividade enzimática os microrganismos que apresentaram-se mais promissores foram *E. aerogenes* (1,53 U/mL), *S. marcescens* (0,87 U/mL) e *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (0,45 U/mL e 0,42 U/mL). O estudo revela que há microrganismos produtores de lipases presentes em efluentes industriais, que podem ser eficientes em sistemas de tratamento de efluentes.

Palavras-chave: efluente; microrganismo lipolítico; produção de lipase extracelular; atividade enzimática; azeite de oliva

Abstract

PEIL, Greice Hartwig Schwanke. **Bioprospecting of lipolytic microorganisms obtained from industrial effluents**. 2015. 54f. Dissertation (Master Degree em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Effluents rich in oils and fats are responsible for serious problems in sewage treatment systems, and major environmental impacts. An alternative for the treatment of such effluent is to use biological processes, including microorganisms that produce lipase enzymes. These enzymes are widely distributed in nature and have the capacity to degrade oils and fats contained in effluents, through hydrolysis of ester bonds of triacylglycerols. Lipases can catalyze other various reactions and are applicable in various industrial sectors. This study aimed to isolate and characterize microorganisms wich producers of lipases from different effluent food industries of Pelotas, Brazil. The bacteria were identified as the Gram's stain and biochemical tests (Vitek 2® system), and the fungi were viewed as the macromorphology and micromorphology. The production of extracellular lipase was evaluated by testing rhodamine B, and enzyme activity by titration. Twenti-one bacterias were isolated, they are identified as *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica* and *Raoultella planticola*. Filamentous fungi isolated were characterized to the genera *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Gliocladium sp.*, *Mucor sp.*, *Paecilomyces sp.* and *Trichoderma sp.*. The production of extracellular lipase was observed in 71.43 % of the bacteria and 57.14% of fungi. As the enzymatic activity microrganimos that were more promising were *E. aerogenes* (1.53 U / ml), *S. marcescens* (0.87 U / ml) and *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* (0.45 U / ml and 0.42 U / ml). The study reveals that there are microorganisms producing lipase present in industrial effluents, which can be effective in effluent treatment systems.

Kei-words: effluent; lipolytic microorganism; extracellular lipase production; enzyme activity; olive oil

Lista de Figuras

Figura 1	Reação de hidrólise do triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos, catalisada pela lipase.....	16
Figura 2	Reações catalisadas por lipases.....	17
Figura 3	Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas.....	18
Figura 4	Aplicações das lipases em diferentes setores industriais.....	25
ARTIGO		
Figure 1	Extracellular lipase enzymatic activity of bacteria obtained from the dairy products and slaughterhouse industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.....	40
Figure 2	Lipase enzymatic activity of filamentous fungi obtained from the dairy products and slaughterhouse industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Concentração média de óleos e graxas contidos em diferentes efluentes, consultada na literatura.....	12
Tabela 2	Microrganismos produtores de lipases reportados na literatura.....	21
ARTIGO		
Table 1	Origin, identification and extracellular lipase production from bacteria obtained from dairy products and slaughterhouses industry effluents in Pelotas/RS, Brazil..	32
Table 2	Lipase enzymatic activity of filamentous fungi obtained from the dairy products and slaughterhouses industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.	34

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Efluentes oleosos e processos de tratamento.....	12
3.1.1 Compostos lipídicos em efluentes e seu impacto ambiental	14
3.2. Enzimas lipases	15
3.2.1 Lipases de origem microbiana.....	19
3.2.2 Fatores que influenciam a produção de lipases	22
3.3 Aplicação de lipases no tratamento de efluentes	23
3.4 Outras aplicações das enzimas lipases	24
4 ARTIGO	27
5 CONCLUSÕES	42
6 PERSPECTIVAS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Atualmente diversas atividades antrópicas estão elevando os níveis de resíduos no mundo. A poluição dos ambientes aquáticos está em crescimento constante, gerando grande preocupação, visto que a água é fundamental para a existência e manutenção da vida e, para isso, deve estar presente no ambiente em quantidade e qualidade apropriadas.

O desenvolvimento de diversas atividades caracteriza fontes potenciais de contaminações ambientais e demandam de grandes quantidades de água. A geração de águas residuais está diretamente relacionada a demanda por produtos alimentícios pela população, e o seu aumento tem provocado uma grande preocupação, visto que parte delas não recebem o devido tratamento. Efluentes originados de residências, restaurantes e indústrias alimentícias, apresentam altas concentrações de óleos e gorduras. Os efluentes industriais provenientes de frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral apresentam elevada concentração de matéria orgânica, influenciada pelo teor de gorduras (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

Os óleos, graxas e gorduras residuais consistem em grandes fontes contaminantes do solo e dos recursos hídricos, quando dispostos sem o devido tratamento (DE OLIVEIRA et al., 2014). Os resíduos sólidos orgânicos originados da fermentação do material podem levar a formação de ácidos orgânicos, que podem gerar odores desagradáveis e diminuir o oxigênio nas águas superficiais, prejudicando os seres vivos dos mananciais (GRAMINHA et al., 2008). Os lipídeos podem formar filmes de óleo nas superfícies das águas, impedindo a difusão de oxigênio no meio aquático (MONGKOLTHANARUK; DHARMISTHITI, 2002). Além dos impactos ao ambiente, também geram problemas operacionais no tratamento dos efluentes. A agregação de sólidos ou partículas em suspensão, resulta no entupimento de tubulações, além de mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura (WILLEY, 2001; DE OLIVEIRA et al., 2014).

A partir do contexto acima, observa-se a necessidade de processos alternativos ou coadjuvantes para amenizar a poluição do meio ambiente e os problemas no tratamento de efluentes oleosos, sem a utilização de produtos de origem química. Uma alternativa eficiente é o tratamento biológico das águas residuárias a partir da utilização de enzimas lipases. Estas enzimas apresentam

grande importância, devido à sua capacidade biológica de hidrólise de óleos e gorduras, levando a um grande interesse de sua utilização em tratamento de efluentes gordurosos (MENDES et al., 2005). A produção de lipases pode ser observada em diferentes grupos (plantas, animais e microrganismos), contudo as de origem microbiana representam a classe mais utilizada de enzimas, em aplicações biotecnológicas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

A capacidade de produção lipolítica extracelular, pelos microrganismos, é outro fator importante, proporcionando maior facilidade de extração, minimizando custos para sua obtenção. Além disso, a ampla distribuição indica a importância de explorar diferentes ambientes naturais a fim de realizar o isolamento de microrganismos produtores de lipases termicamente estáveis (CHAROENPANICH; SUKTANARAG; TOOBBUCHA, 2011).

O metabolismo microbiano representa maior eficiência em processos de biodegradação em sistemas de biorremediação, visto que tem a capacidade de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera participando dos principais ciclos biogeoquímicos, sendo assim, o suporte de manutenção da vida na Terra (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Segundo Pereira e Freitas (2012), o emprego de microrganismos nativos ou introduzidos no ambiente, em processos que utilizam reatores biológicos, é eficiente em diferentes setores como, refinaria de petróleo, indústria têxtil, de celulose e farmacêutica, dentre outras.

Considerando a diversidade microbiana ambiental existente e os diversos microrganismos capazes de produzir enzimas lipases, salienta-se a importância destes em efluentes industriais, para a biodegradação de compostos lipídicos. Portanto o presente estudo teve como objetivo isolar e identificar microrganismos produtores dessas enzimas, além de avaliar a produção extracelular de lipase e a capacidade de hidrólise da enzima produzida pelos microrganismos.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Isolar e identificar microrganismos produtores de enzimas lipolíticas com potencial de degradação de compostos lipídicos, oriundos de efluentes industriais da região de Pelotas – RS.

Objetivos específicos

- Isolar microrganismos lipolíticos a partir de efluentes de indústria de laticínios e frigoríficos;
- Caracterizar morfológica e bioquimicamente os microrganismos obtidos destes locais;
- Avaliar os microrganismos quanto à capacidade de produção de lipases extracelulares;
- Quantificar a atividade enzimática das lipases.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Efluentes oleosos e processos de tratamento

A crescente demanda de produtos alimentícios provoca um aumento na produtividade e quantidade de indústrias, consequentemente, ocorre um aumento na produção de efluentes. Os óleos e as gorduras estão entre os componentes lipídicos da alimentação humana, gerando um aumento de efluentes gordurosos. Portanto residências, restaurantes e indústrias alimentícias produzem grande quantidade de água residual, composta por quantidades significativas de compostos oleosos (MONTEFRIO; XINWEN; OBBARD, 2010). Os óleos e gorduras podem ser originados da indústria de sorvetes, óleos comestíveis e enlatados, indústria de bebidas, abatedouros, laticínios, processamento de cosméticos, entre outros (VEIGA, 2003; MENDES et al., 2005).

Os efluentes industriais provenientes de frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral apresentam altos teores de demanda bioquímica e química de oxigênio, visto que o teor de gorduras eleva a concentração de matéria orgânica (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012). Os níveis de óleos e graxas nos efluentes são extremamente variáveis, sendo que a concentração de lipídeos em diversos setores industriais, ou mesmo no esgoto doméstico, está relacionada aos tipos de produção industrial e resíduos gerados pela população. A tabela 1 apresenta a quantidade de lipídeos em efluentes originados em diferentes locais.

Tabela 1. Concentração média de óleos e graxas contidos em diferentes efluentes, consultada na literatura

Tipo de efluente	Concentração de lipídeos (mg/L)	Referência
Restaurantes	98	Dharmsthiti; Kuhasuntisuk, 1998
Sorvete	845	Hawkes; Donnelly; Anderson, 1995
Lavagem automotiva	177	Dorigon; Tessaro, 2010
Processamento de coco	1.960	Crespilho; Santana; Rezende, 2004
Laticínios	4.680	Mendes; Pereira; Castro, 2006.

Diversos problemas são observados em tratamento de efluentes oleosos, resultando na falta de eficiência do processo de tratamento das águas residuais domésticas e industriais. Os lipídios presentes no efluente apresentam baixa solubilidade, provocando entupimentos de tubulações e problemas nos processos de tratamento biológicos anaeróbios e aeróbios (DE OLIVEIRA et al., 2014), problemas operacionais (CAMMAROTA; TEXEIRA; FREIRE, 2001; JUNG et al., 2002) e geração de odores desagradáveis (SUGIMORI; WATANABE; UTSUE, 2013).

Em caso de tratamento biológico com reatores de digestão anaeróbia, observou-se a formação de grande quantidade de espuma, colmatação de camadas lipídicas, formação de caminhos preferenciais no leito de lodo e arraste da biomassa, prejudicando o sistema de tratamento (LEAL et al., 2002). Segundo Omil et al. (2003), pode-se observar a formação de lodos com características físicas diferentes e uma redução da atividade de hidrólise, devido à flotação dessa biomassa. A elevada concentração de óleos e gorduras pode ainda comprometer a ação microbiana, a qual é responsável pela quebra dos lipídeos em moléculas menores, prejudicando o tratamento com perda de eficiência (MASSE; KENNEDY; CHOU, 2001).

De acordo com Willey (2001) efluentes oleosos apresentam outros problemas como, aumento no tempo de retenção hidráulica do efluente nas lagoas de estabilização, redução da capacidade de aeradores e alta demanda de produtos floclantes. No caso de tratamento de esgotos, pode-se observar a agregação de sólidos ou partículas em suspensão, resultando no entupimento de redes, dutos e reservatórios, e o transbordamento de fossas e caixas de gorduras.

Geralmente na remoção preliminar de gorduras são utilizadas caixas de gordura comuns que permitem sua separação por densidade, e retirada de forma manual ou grandes tanques providos de raspadores na superfície (MENDES et al., 2005). Porém, essa remoção não elimina os lipídeos dissolvidos no efluente, visto que apenas o material em suspensão é removido, necessitando de processos suplementares. Neste sentido, há uma série de processos para o tratamento de efluentes, de natureza física, química e biológica. O tratamento físico envolve métodos de separação de fases como, sedimentação, decantação, filtração, centrifugação ou flotação dos resíduos (CRESPILHO; SANTANA; REZENDE, 2004). Além de processos de adsorção, tecnologias de membranas (osmose reversa, microfiltração, nanofiltração e ultrafiltração) (KUNZ et al., 2002). Outros processos

envolvem oxidação química, com adição de agentes coagulantes e floculantes (CAMARENO; ESQUIVEL, 2006).

O tratamento biológico consiste na utilização de microrganismos, que apresentam potencial para degradar diversos poluentes, para obtenção de melhores condições operacionais e minimizar os impactos no ambiente. Esse tipo de tratamento pode ser aeróbio ou anaeróbio. Os processos aeróbios utilizam microrganismos aeróbios e facultativos, enquanto sistemas anaeróbios, os microrganismos são anaeróbios e também podem ser facultativos (MENDES et al., 2005). O processo metabólico dos microrganismos é responsável pela eliminação dos poluentes, redução da sua concentração no local, ou transformação dos poluentes em compostos de baixa toxicidade (COLLA; COSTA, 2003; MANDRI; LIN, 2007; YAKUBU, 2007). O tratamento biológico deve considerar fatores como, remoção da matéria orgânica, e consequente diminuição da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) do resíduo a ser tratado, degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação e a produção de efluente em condições adequadas, a fim de evitar impactos ao ambiente aquático (MENDES et al., 2005).

Compostos lipídicos em efluentes e seu impacto ambiental

Os poluentes orgânicos podem ser originados a partir de diversas atividades, porém processos industriais recebem destaque, porque muitas vezes, são os maiores causadores de impactos ambientais em ambientes aquáticos. Além da utilização de grandes volumes de água no setor industrial, se observa uma contribuição significativa para contaminação dos corpos d'água, principalmente devido a ausência de sistemas de tratamento para o elevado volume de efluente líquido produzido (FREIRE et al., 2000).

O ambiente aquático pode sofrer impactos provocados por resíduos sólidos orgânicos, originados da fermentação do material, que pode levar a formação de ácidos orgânicos, com geração de odores desagradáveis e diminuição do oxigênio na água, prejudicando os seres vivos (GRAMINHA et al., 2008). Os lipídeos podem formar filmes de óleo nas superfícies das águas, impedindo a oxigenação da água, devido a menor área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico, levando a morte de diversos seres vivos (MONGKOLTHANARUK; DHARMISTHITI, 2002; BERTI et al., 2009). As bactérias aeróbias que realizam a degradação de

resíduos gordurosos consomem o oxigênio dissolvido na água, também podem ser responsáveis pela morte da fauna aquática como peixes, crustáceos, moluscos, dentre outros (SOUZA, 2012).

.Além disso, os filmes oleosos impedem a passagem de luz solar, que é responsável pela fotossíntese dos produtores primários. A falta de luminosidade interrompe o desenvolvimento de algas, que servem de alimento para muitas espécies (COSTA et al., 2008). Os compostos lipídicos também afetam as plantas aquáticas, visto que, quando são absorvidos pelas folhas e raízes, apresentam efeitos tóxicos (PIEADDE et al., 2014). Pequenas quantidades de óleo podem causar danos ao meio ambiente, impedindo o processo de fotossíntese e a respiração de diversos seres vivos (ATLAS et al., 1991). Conforme a Sabesp, estima-se que 1L de óleos e gorduras residuais tem potencial para contaminar 25.000L de água.

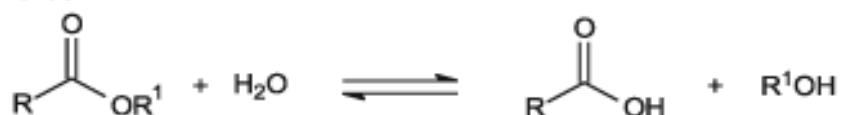
Devido aos impactos negativos observados, a legislação brasileira, a partir do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), regulamenta o lançamento de efluentes. A legislação vigente, no artigo 16 da resolução nº 410 de 2011, estabelece a concentração máxima de lançamento de óleos e graxas, de 20 mg/L para óleos minerais e até 50 mg/L para óleos vegetais e gorduras animais, em efluentes de qualquer origem (BRASIL, 2011). Portanto o sistema de tratamento deve ser eficiente a fim de reduzir os níveis de óleos e gorduras presentes nos efluentes.

Enzimas Lipases

As lipases são definidas como triacilglicerol acil hidrolases (E.C.3.1.1.3), que catalisam a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (Figura 1) (SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001). A reação ocorre em condições naturais, sem necessidade de co-fatores, na interface entre substrato insolúvel e a fase aquosa (GOPINATH et al., 2013). Os triacilglicerídeos podem ser degradados em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (ALMEIDA; TAUKE-TORNISIELO; CARMONA, 2013).

Além da hidrólise, podem catalisar reações de esterificação, interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), aminólise e lactonização (esterificação intramolecular) (CARVALHO et al., 2003; PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003;

Hidrólise



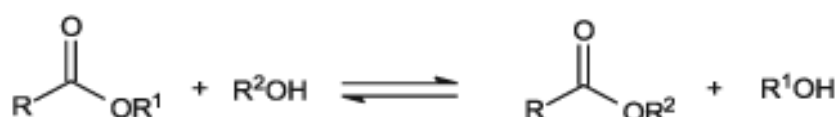
Esterificação



Interesterificação



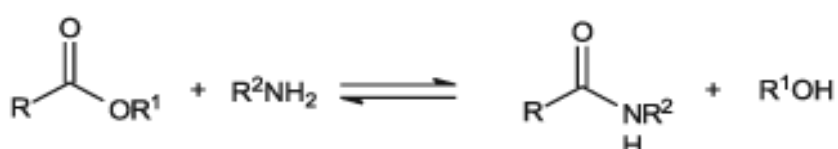
Alcóólise



Acidólise



Aminólise



Lactonização

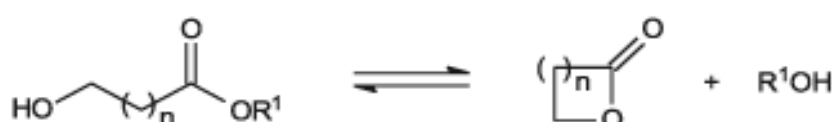


Figura 2. Reações catalisadas por lipases.

Fonte: Paques e Macedo, 2006, p.93.

A compreensão da ativação interfacial foi encontrada na estrutura tridimensional da lipase. O sítio ativo é coberto por uma tampa (cadeia peptídica) com característica hidrofóbica. Quando uma interface lipídeo-água se liga a tampa, ocorre uma interação, e a tampa sofre uma alteração conformacional (a tampa se move alterando a forma fechada para a forma aberta) expondo o sítio ativo ao

substrato. Ao mesmo tempo, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação à interface (Figura 3) (JAEGER; REETZ, 1998).

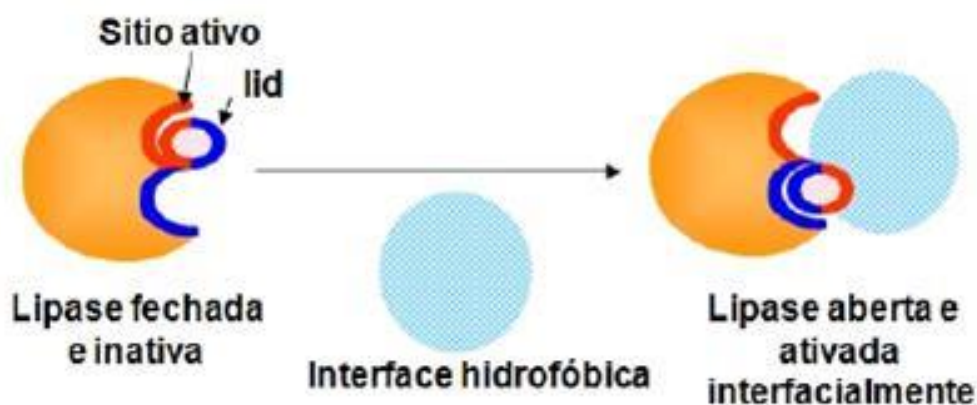


Figura 3. Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas.

Fonte: Rodrigues, 2009, p.8.

Porém essa ativação interfacial não é observada em todas as lipases, assim como o sistema de abertura da tampa, não está associado ao fenômeno de ativação interfacial em todas as lipases (JAEGER; REETZ, 1998; CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). Algumas lipases também não apresentam a tampa cobrindo o sítio ativo e não necessitam da interface para catalisar a atividade hidrolítica, como exemplo, enzimas cutinases, que são consideradas lipases “verdadeiras” (CYGLER; SCHRAG, 1997). Enzimas lipases originadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia glumae* não demonstraram ativação interfacial, no entanto, apresentaram sítio ativo coberto (NOBLE et al., 1993; JAEGER et al., 1994)

As lipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas pelas plantas, animais (origem pancreática, hepática e gástrica), e microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008). Nas plantas, as lipases estão presentes nos tecidos de reserva, e nos animais, participam do metabolismo de lipídeos (digestão, adsorção, reconstituição de gorduras) e lipoproteínas (SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001).

A enzima nos microrganismos pode apresentar atividade fosfolipídica, o que confere um mecanismo de defesa, visto que, quando secretadas, propiciam uma competição com a microflora. Além disso, facilitam a digestão dos lipídeos e os

ácidos graxos liberados, então auxiliam na adesão célula-célula e célula-hospedeiro (STEHR et al., 2003).

Lipases de origem microbiana

A exploração de recursos naturais biológicos da biodiversidade com finalidade econômica é conhecida como bioprospecção. O objetivo principal dessa tecnologia consiste em explorar microrganismos de determinado local, com a finalidade de pesquisar os seus recursos genéticos e bioquímicos, podendo envolver estudos com sistemática, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, com potencial econômico. Muitos microrganismos ainda não foram descobertos, apresentando potencial para exploração no campo da pesquisa para obtenção de microrganismos promissores em diversas aplicações biotecnológicas (PEIXOTO; ROSADO; TAKETANI, 2008).

As lipases produzidas por microrganismos, principalmente por bactérias e fungos, representam a classe mais utilizada de enzimas, em aplicações biotecnológicas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Segundo Veerapagu et al. (2013), as lipases comercializadas, em sua maioria, são de origem microbiana. Estas enzimas são de grande interesse devido à diversidade de atividades catalíticas, alto rendimento, facilidade de manipulação genética, o crescimento rápido, produção em em culturas de baixo custo, também devido a características de especificidade, temperatura e pH de atuação (JAEGER; EGGERT 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

No campo industrial, a sua maior empregabilidade, se deve a simplicidade do isolamento em caldo fermentativo, maior estabilidade, seletividade, ampla especificidade ao substrato, não requerem co-fatores, características mais diversificadas, se comparada a lipases oriundas de outros organismos (CARVALHO et al., 2003; CASTRO, MENDES, SANTOS, 2004; ANBU et al., 2011).

A produção de lipases microbianas pode ser desenvolvida por diferentes metodologias. A fermentação submersa está relacionada ao crescimento dos microrganismos, e as condições em que se encontram, como, composição e condições do cultivo (SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001). Na produção que se utiliza da fermentação em estado sólido, são utilizados substratos insolúveis com

baixo teor de água em sua composição. Estes substratos apresentam função nutritiva e fisiológica (PANDEY, 2003).

O potencial de degradação ou a atividade da lipase pode ser determinado por diferentes métodos. Existem técnicas que apenas determinam se o microrganismo produz a enzima lipase, muitas vezes utilizado como análise preliminar, e outras, que permitem a quantificação da enzima produzida, e a atividade de hidrólise da enzima. Essas técnicas permitem avaliar quais microrganismos são mais eficientes em termos de produtividade ou na degradação de substâncias. A biodegradação de compostos lipídicos pode ser avaliada pelo desaparecimento do substrato ou a formação dos produtos da reação (MESSIAS et al., 2011). Portanto a avaliação da hidrólise de lipídeos pode ser realizada através da quantificação de ácidos graxos liberados no meio.

Os microrganismos podem produzir enzimas lipolíticas extracelulares ou intracelulares. A maioria apresenta produção de lipases extracelulares, que consiste em um fator positivo, visto que proporciona maior facilidade de extração, isolamento e purificação, diminuindo os custos de produção (SAXENA et al., 2003; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008). A produção de exoenzimas favorece a sobrevivência dos microrganismos, atuando como mecanismo de adaptação às condições extremas do ambiente, e beneficia o aproveitamento do seu nicho trófico (GOPINATH; ANBU; HILDA, 2005).

Diversos microrganismos apresentam capacidade de produzir enzimas lipases, algumas espécies são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos produtores de lipases reportados na literatura

Microrganismos	Referências
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Li; Cheng; Chen, 2001
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Tebaldi et al., 2008
<i>A. faecalis</i>	Tebaldi et al., 2008
<i>Aspergillus niger</i>	Nagy et al., 2006
<i>A. terreus</i>	Nagy et al., 2006
<i>Bacillus megaterium</i>	Lima et al., 2004
<i>B. cereus</i>	Verma; Azmi; Kanwar, 2011
<i>Burkholderia glumae</i>	Noble et al., 1993
<i>B. cepacia</i>	Tebaldi et al., 2008
<i>Candida rugosa</i>	Lee et al., 2011
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Jaeger; Reetz, 1998
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Kumari; Mahapatra; Banerjee, 2009
<i>E. cloacae</i>	Tebaldi et al., 2008
<i>Fusarium oxysporum</i>	Nagy et al., 2006
<i>Geotrichum candidum</i>	Carvalho et al., 2005
<i>Mucor geophyllus</i>	Naqvi et al., 2011
<i>M. griseocyanus</i>	Armas et al., 2008
<i>Penicillium corylophilum</i>	Romero et al., 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jaeger et al., 1997
<i>P. mendocina</i>	Jaeger; Reetz, 1998
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Tebaldi et al., 2008
<i>R. planticola</i>	Sugimori; Watanabe; Utsue, 2013
<i>Rhizomucor miehei</i>	Rodrigues; Ayub, 2011
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lee et al., 2011
<i>Serratia liquefaciens</i>	Tebaldi et al., 2008
<i>S. marcescens</i>	Zaki; Saeed, 2012
<i>Staphylococcus aureus</i>	Winny et al., 2012
<i>S. epidermidis</i>	Winny et al., 2012
<i>Trichoderma harzianum</i>	Nagy et al., 2006
<i>Trichosporon asahii</i>	Kumari; Gupta, 2012

Fatores que influenciam a produção de lipases

O processo de obtenção de enzimas lipases envolve diversas variáveis, incluindo a composição do meio de cultivo e as condições ambientais em que se encontra. No caso da produção lipolítica extracelular por microrganismos, os fatores que podem influenciar são: composição do meio, principalmente a disponibilidade de fonte de carbono, fatores físico-químicos (temperatura, pH e oxigênio), agitação no processo de crescimento microbiano e o período de incubação (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; KUMAR et al., 2012; VEERAPAGU et al., 2013).

A fonte de carbono utilizada no meio de cultura é essencial na produção enzimática. A produção de enzimas pode ser aumentada de forma significativa pela adição de agentes indutores ao meio de cultivo. O indutor pode ser o substrato utilizado no meio de cultivo, ou os compostos resultantes da sua hidrólise (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010). Dentre os diversos indutores, os compostos de natureza lipídica consistem em óleos, triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, sais biliares, glicerol, entre outros (SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; TAVARES et al., 2011).

Entre a diversidade de fontes de carbono empregadas na produção de enzimas lipases estão a sacarose, xilose, frutose, manitol, amido, glicose (SAGAR et al., 2013), galactose, glicerina, sorbitol, Tween 80, entre outros (LIN; WANG; SUNG, 2006). Savitha et al. (2007), utilizou diferentes substratos (glicose, azeite de oliva, azeite de gergelim, azeite de palma, diversos óleos: coco, girassol, amendoim, soja e de farelo de arroz) para produção de lipases em fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor*. O óleo de girassol apresentou maior eficiência na indução da produção de lipase em *Mucor* sp.

Apesar da importância da fonte de carbono, as fontes de nitrogênio e micronutrientes também são importantes no crescimento e otimização da produção enzimática. Diferentes fontes de nitrogênio foram utilizados por Lin, Wang, Sung (2006) para produção lipolítica pelo fungo *Antrodia cinnamomea*. Entre eles, triptona, peptona, caseína, glicina, prolina, glutamina, asparagina, cloreto de amônio, sulfato de amônio, oxalato de amônio, acetato de amônio, nitratos de sódio e potássio, e nitrito de sódio. A maior produção foi observada pela adição dos aminoácidos (asparagina, glicina, glutamina) e triptona.

A produção de lipases também pode ser influenciada por íons metálicos que podem apresentar função estimuladora ou inibitória. Portanto exercem um papel importante na estrutura e na função das enzimas. Em alguns casos, íons de sal como, Ca^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , elevaram a atividade, enquanto os íons Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Na^{+} , apresentaram leve efeito inibitório (KUMAR; KANWAR, 2011). No estudo de Lin, Wang, Sung (2006) a adição de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Na^{+} e K^{+} , apresentou efeito positivo na produção de lipase fúngica, porém Cu^{2+} , Zn^{2+} e Li^{+} , revelaram-se inibidores.

As condições ambientais no processo de produção enzimático envolvem o pH do meio de cultivo, onde ocorre o crescimento dos microrganismos, e a temperatura condicionada. As lipases podem catalisar reações em ampla faixa de pH, podendo atuar em meios ácidos e básicos, porém em sua maioria, as melhores atividades são reportadas entre pH de 5,0 a 8,0. A temperatura ótima para as lipases varia entre 30°C e 40°C, contudo algumas lipases têm se mostrado estáveis em temperaturas extremas, como 5°C e 60°C (KAMINI; MALA; PUVANAKRISHNAN, 1998; BENJAMIM; PANDEY, 2001; PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003; SAGAR et al., 2013).

Aplicação de lipases no tratamento de efluentes

A capacidade de realizar a hidrólise especificamente de óleos e gorduras, torna as lipases em biocatalizadores eficientes no tratamento de ambientes com alto teor lipídico. A utilização de lipases favorece a redução do teor de sólidos suspensos e lipídeos, resultando em melhores condições operacionais e realiza a degradação de filmes oleosos em tubulações, prolongando a vida útil dos equipamentos (MENDES et al., 2005).

O uso de lipases pode servir como tratamento alternativo ou como um complemento aos tratamentos convencionais de efluentes. A aplicação dessas enzimas pode ser na forma bruta, como caldo fermentado, que consiste no uso dos microrganismos lipolíticos, ou de forma isolada, utilizando somente as lipases produzidas (SEMIONATO, 2006). Neste sentido, a biorremediação de locais poluídos ou contaminados, ainda apresenta outras formas de tratamento: utilização de microrganismos autóctones; inoculação de consórcios microbianos enriquecidos; adição de agentes estimulantes como, nutrientes, oxigênio e biossurfactantes; ou

mesmo a adição de enzimas isoladas (BENTO et al., 2003; ALCALDE et al., 2006). De acordo com DORS (2006), o seu emprego em tratamento de efluentes confere vantagens como, facilidade de controle do processo, isenção de aclimação de biomassa, aplicação em locais com baixo ou alto teor de poluentes, além de realizar a biodegradação em diferentes faixas de pH, temperatura e salinidade.

Segundo Gopinath et al. (2013), os resíduos domésticos e industriais podem apresentar fungos com maior potencial na degradação de gorduras e óleos, que além da eliminação de resíduos, podem produzir substâncias benéficas através de sua atividade. Outros estudos relatam a utilização de preparados enzimáticos obtidos por fermentação em estado sólido, caracterizando uma alternativa de baixo custo para o tratamento de efluentes com elevados teores de gordura gerados na indústria de alimentos (CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001; JUNG et al., 2002; LEAL et al., 2006; VALLADAO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007).

O tratamento de efluentes oleosos através de processos biológicos, tem mostrado resultados significativos. Mendes, Pereira, Castro (2006), observaram uma elevada porcentagem de remoção de matéria orgânica (80,9%), através da incorporação de compostos resultantes da hidrólise de lipídeos, pelos microrganismos anaeróbios. Conforme Odeyemi et al. (2013), o tratamento biológico de efluentes oleosos, tem sido o mais eficiente, com degradação dos compostos lipídicos em moléculas miscíveis. Segundo Semionato (2006), a degradação acelerada das gorduras por microrganismos resulta na máxima relação custo/benefício em sistemas e estações de tratamento de esgoto e, principalmente, em caixas de gordura residenciais e comerciais, tornando-os mais eficientes, reduzindo custos de manutenção e impactos ambientais.

Outras aplicações das enzimas lipases

A ampla capacidade catalítica das lipases leva a sua utilização nas mais diversas áreas. As lipases vêm sendo empregadas em indústrias de alimentos e laticínios, detergentes, têxtil, cosméticos, processamento de couro e pele, na obtenção de produtos farmacêuticos, fabricação de papel, na síntese de biossurfactantes, biopolímeros e biodiesel, bem como no tratamento de águas residuárias (SHARMA; CHISTIB; BANERJEE, 2001; JAEGER; EGGERT, 2002; MENDES et al., 2005; VERMA; THAKUR; BHATT, 2012). Algumas aplicações das

lipases em diferentes indústrias e a reação catalisada ou a sua função são apresentadas na figura 4.

A indústria de detergentes representa um dos campos de maior aplicação das enzimas lipases. Para desempenhar sua função, as lipases devem ser termoestáveis e capazes de atuar em meios alcalinos, dependendo das condições de lavagem (pH 10 a 11 e temperatura 30°C a 60°C) que se encontram. Além disso, devem apresentar baixa especificidade pelo substrato, podendo catalisar a hidrólise de diferentes gorduras (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Indústria	Ação	Produto ou aplicação
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Derivados de laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga
Panificação	Melhorador de sabores	Prolongar a vida de prateleira
Bebidas	Aromas	Bebidas
Carnes e peixes	Desenvolvimento de sabores	Remoção de gordura, produtos de carnes e peixes
“Health foods”	Transesterificação	Produção de alimentos com apelo nutricional
Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídeos
Química	Enantiosseletividade, síntese	Construção de blocos quirais
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídios específicos, digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Papel	Hidrólise	Melhoria da qualidade de papel
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras
Couro	Hidrólise	Produtos de couro

Figura 4. Aplicações das lipases em diferentes setores industriais.

Fonte: Adaptado de Sharma; Chisti; Banerjee, 2001, p.630.

Na indústria de alimentos as lipases são aplicadas na obtenção de ácidos graxos livres, a partir da hidrólise de óleos e gorduras presentes nos alimentos, visto que esses ácidos podem conferir especial sabor e aroma aos alimentos (JAEGER; REETZ, 1998). Óleos vegetais modificados, apresentando triacilgliceróis estruturados, apresentam importância nutricional, e as propriedades físico-químicas alteradas são potencialmente atrativas para o mercado. Óleos de baixo valor podem ser convertidos em triacilgliceróis pouco calórico e óleos enriquecidos em ácido oleico, produtos mais valorizados economicamente (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Segundo Sharma, Chisti, Banerjee (2001), a partir da modificação de óleos vegetais pode-se obter gorduras semelhantes as gorduras contidas no leite humano, para utilização em amamentação, além da formação de ésteres lipídicos aplicados em cosméticos e monoglicerídeos, utilizados como emulsificantes em alimentos e aplicações farmacêuticas. Esta última, se utiliza de ácidos graxos poli-insaturados livres e as formas mono e diglicerídeos para produção de diversos produtos incluindo, anti-inflamatórios. Além disso, as lipases também podem ser utilizadas como ferramenta para diagnósticos de infecções ou doenças (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A produção de biodiesel envolve a transesterificação de triacilgliceróis com alcoóis de cadeia curta. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser utilizados como combustível, sem a produção de óxido de enxofre e diminuição de partículas, minimizando os impactos ambientais (ISO et al., 2001). Lipase imobilizada de *Pseudomonas cepacia* foi utilizada para a transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005), e lipases comerciais foram utilizadas como catalizadoras na obtenção de ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de rícino (DE OLIVEIRA et al., 2004).

4 ARTIGO

O artigo intitulado “**Bioprospecção de microrganismos lipolíticos obtidos de efluentes industriais**” é apresentado conforme as normas da Revista International Biodeterioration & Biodegradation, Ciências Biológicas II – B2 e fator de impacto de 2,235.

BIOPROSPECTION OF LIPOLYTIC MICROORGANISMS OBTAINED FROM INDUSTRIAL EFFLUENTS

Greice Hartwig Schwanke Peil, Andrés Felipe Gil Rave, Anelise Vicentini Kuss, José Pablo Villarreal Villarreal, Yohana Melania Lopez Hernandez, Patrícia da Silva Nascente

Abstract

The lipases are enzymes widely distributed in nature, having the ability to catalyze diverse reactions, they are important in different biotechnological applications. The aim of this study was to isolate and characterize microorganisms that produce lipases, from different food industry effluents localized in Pelotas, RS. Brazil. The bacteria used were identified using Gram stain and biochemical tests (Vitek 2®) and the fungi, were identify according to the macromorphology and micromorphology characteristics. The extracellular lipase production was evaluated using the Rhodamine B test and the enzymatic activity using titration. 21 bacteria were isolated, and identified as: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica* and *Raoultella planticola*. The isolated filamentous fungi were characterized by the following genera as: *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp. and *Trichoderma* sp. The extracellular lipase production was observed in 71, 43% of the bacteria population and 57, 14% of the fungi population. Meanwhile the microorganisms that presented promising enzymatic activity were: *E. aerogenes* (1, 53 U/ml), *S. marcescens* (0, 87 U/ml) and *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (0, 45 U/ml e 0,42 U/ml). This study reveals the presence of microorganisms producer of lipases in industry effluents, and the enzymes biodegradation potential in lipid compounds, where the use of this enzymes can be efficient in the effluents treatment systems.

Key words: effluent, lipolytic microorganism, lipase enzyme, extracellular lipase production, enzyme activity, olive oil.

Introduction

The lipase enzymes are classified as hydrolases (triacylglycerol hydrolases) that catalyze the hydrolysis of triglycerides into diglycerides, monoglycerides, free fatty acids and glycerol (Almeida et al., 2013). Besides the hydrolysis, they can also catalyze esterification and interesterification reactions (acidolysis, alcoholysis and transesterification) and aminolysis (Carvalho et al., 2003; Patil et al., 2011). A wide catalytic ability leads to their use in different biotechnological applications. These enzymes have industrial applications such as: in food products, dairy products, detergents, textile, cosmetics, pharmaceutical field, papermaking, biosurfactants and in the biopolymers synthesis, as well in the wastewater treatment (Sharma et al., 2001; Jaeger and Eggert, 2002; Mendes et al., 2005; Verma et al., 2012).

The microbial lipases are very important due to their potential use in industrial applications (Anbu et al., 2011). The wide applicability in this area is due to certain properties such as: stability, selectivity, wide substrate specificity and because they don't required cofactors (Castro et al., 2004), beyond the different catalytic activities, genetic manipulation facility and the faster growth of microorganisms in low cost culture media (Hasan et al., 2006). Diverse microorganisms are lipase producer; as well the main part of commercial lipases is from microbial origin (Veerapagu et al., 2013). In this context the lack of knowledge of this diversity in effluents, leads to the microorganisms bioprospection interest, because they may show biotechnological application potential in different areas. In the environmental area, they can be promising in technologies used in biological systems for the environment treatment, with the purpose of eliminating pollutants (Peixoto et al., 2008).

The oily effluents cause environmental pollution, if not treated appropriately and can be different operational problems in wastewater treatment systems, resulting in inefficient processes (Leal et al., 2002; Sugimori et al., 2002; De Oliveira, 2014). The biological treatment, which goal is the removal of fat, oils and greases has been efficient, in addition to improve the operational conditions (Mendes et al., 2005; Gopinath et al., 2013; Odeyemi et al., 2013).

Considering the existence of microbial environmental diversity and different microorganisms able to produce lipases enzymes, the importance of these in industrial effluents, for the biodegradation of lipid compounds is highlight. Therefore the aim of the present study was to isolate and identify microorganisms that produce these enzymes, beyond the evaluation of extracellular lipase production and the enzyme's hydrolase capacity produce by the microorganisms.

Material and Methods

Samples origin and prosecution

The effluent samples were collected in three slaughterhouses and in one dairy products industry, localized in Pelotas/RS, Brazil. The treatment of the effluents in the dairy products industry is realized through the reactor like UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) and the Biologic Aerate Reactor (RBA). The treatment in the slaughterhouse is done through: (1) the settling tank and by the anaerobic and facultative lagoons and (2) through the same as number one (3) the settling lagoon, and by the aerobic and facultative lagoons. The collection was performed using sterile glass bottles and they were carried to the Environmental Microbiology Laboratory in the Biology Institute at the Federal University of Pelotas (UFPEL).

The samples were submitted to the enrichment process, using 10ml from the sample to 50mL of the liquid minimal media (g.l⁻¹: 1g NaCl, 5g (NH₄)₂SO₄, 6,2g Na₂HPO₄, 0,9g KH₂PO₄, 0,2 MgSO₄.7H₂O (adapted from Sugimori et al., 2002) 1ml of micronutrients solution was added (Chernicharo, 1997) and also 5ml of olive oil, and then they were incubated at 30°C for 120 hours on a rotary shaker (120rpm) (Burkert et al., 2004). From the enrichment medium 100µl were taken to inoculate the plates containing solid minimum media with an addition of 0,1% of Nistatina fungicide (EMS – 100.000 U.I ml⁻¹) and one emulsion addition (5% of olive oil and 1% of Tween 80). The plates for the fungi growth not received the addition of the fungicide. The inoculated material was spread in the plates and they were incubated at 30°C for 72 to 96 hours (adapted from Sugimori et al., 2002). Posteriorly the appearance of growth of different morphologic types of bacterial and fungal colonies was observed and the colonies were replicated in new plates to obtain purified colonies.

Microorganism's identification

The obtained bacteria were characterized using the Gram stain (Silva Filho and Oliveira, 2007) and then identified with biochemical tests using the automatic Vitek 2® System. The isolated filamentous fungi was identified as the macro morphology characteristics, such as: texture, topography, color and for the micromorphology characteristics, lactophenol cotton blue satin was used, after incubating them for seven days at 30°C in microcutive PDA agar between blade and cover slip.

Rhodamine B Test

The isolated microorganisms were evaluated according to the extracellular lipolytic enzymes production, using the Rhodamine B Test (adapted from Lima et al., 2004 and Moura et al., 2013). The extracellular lipases production is observed when released fatty acids and glycerol have a fluorescent complex with the Rhodamine B, when is visualized under UV light.

The microorganisms were inoculated in solid minimal media, growth in 1% of Rhodamine B solution (0,1% m/v), at a 7.0 pH final. The bacteria inoculation was made by streaking, and the plates were incubated at 30°C for 48 hours, meanwhile the filamentous fungi were seeded in the center of the plates and incubated at 30°C for 168 hours. After that, for the microbial growth the plates were observed in a dark ultraviolet light chamber (UV) 365nm, and the samples that shown fluorescent orange colored halos around the microbial colonies were positives.

Microbial lipase hydrolytic activity

The lipase enzyme produced by the isolated microorganisms was evaluated by the ability to hydrolyze the substrate (olive oil) through the released fatty acids from the degradation of triacylglycerol seen through titration (adapted de Burkert et al., 2004).

In the inoculum preparation, the bacteria were enriched in 30mL of BHI medium and the cells were recovered by centrifugation using a refrigerated micro centrifuge (washed: 9000rpm at 4°C for 15min). The cells were standardized in sterile saline solution (0,85%) with an optic density of 1.0 (10⁸ UFC/ml), meanwhile the fungi were adjust from 0,15 to 0,17 (0,4 x 10⁴ a 5 x 10⁴ UFC/ml) and collocated in

the spectrophotometer (540nm). After the inoculum preparation, 500µL of the content were inoculated in 30ml of liquid minimum liquid medium (plus olive oil) and incubated at 30°C on a rotary shaker (120rpm). The bacteria were incubated for 24 hours and the fungi for 72 hours. The microorganism's enzymatic extract was obtained from the centrifugation of 10ml of the incubated material.

For the lipolytic enzymes activity evaluation an emulsion of olive oil with gum arabic at 7% (25% of olive oil and 75% of gum arabic) was used. For each isolate, a mixture having 5ml of emulsion and 2ml of phosphate buffer (10mM – pH 7,0) was prepared. For this mixture 1ml of enzymatic extract of each microorganism was added, and then incubated at 37°C on a rotary shaker (120rpm), for 30 minutes.

The hydrolyze reaction was stopped by the addition of 10ml of acetone and ethanol (1:1 v/v), and for the fatty acids titrated a NaOH 0,05M solution was used and the phenolphthalein was used as an indicator. The targets received the enzymatic extract after incubation and then the acetone: ethanol was added, and titrated with the NaOH solution.

The enzymatic activity (U/ml) was calculated according to the following equation:

$$\text{Activity} = \frac{V_a - V_b \times M \times 1000}{t \times V_c}$$

Where: V_a corresponds to the volume (ml) of NaOH used in the sample titrate; V_b corresponding to the volume (ml) of NaOH used in the sample target; V_c corresponding to the volume (ml) of the sample used in the reaction; M corresponding to the NaOH molar concentration; t corresponding to the reaction time in minutes and 1000 being the constant dilution rate.

One activity unit is defined as the enzyme quantity that releases 1 µmol of fatty acid per minute of the reaction. The activities were expressed in U/ml, being 1U/ml=1µmoles/ml.min. The samples were evaluated in four repetitions and an average was made for each isolate.

Results and discussion

Twenty one bacteria and seven filamentous fungi were selected, and then isolated from five industrial effluent samples from Pelotas/RS. Brazil. The bacteria identified through the automated Vitek 2® System, belong to five different species, meanwhile the filamentous fungi, evaluated through the macro and micromorphology characteristics, and were characterized in seven genera.

Among the twenty one bacteria, 13 (61,90%) were identified as the following: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*. The other bacteria were characterized as the following: *Serratia marcescens* (two isolates), *Enterobacter aerogenes* (two isolates), *Raoultella ornithinolytica* (two isolates) and *Raoultella planticola* (two isolates). The identification of the isolated bacteria from the effluents and the extracellular lipases enzymes production were evaluated by the Rhodamine B test and are presented in table 1.

The isolation of the different species from the effluents indicates that diverse microorganisms with potential enzyme lipase production can survive in the physical-chemical and environmental effluent conditions. Studies have been done, in the way to improve the production of this enzyme by microorganisms growth in the most diverse culture media and in different environment conditions, in addition to the isolation of this microorganisms from diverse places.

Odeyemi et al. (2013) identified 32 lipolytic bacteria, among them *Klebsiella* sp. and *Serratia* sp., isolated from wastewater of a restaurant. According to several authors, the isolate bacteria from effluents enriched with foodborne oil, distinguished a new environmental enzyme with a possibility of a commercial and environmental application in domestic environment. Lin et al. (2012) also identified, between diverse species, many *Klebsiella* spp., strains and four *Enterobacter* spp., strains from a total of 54 lipase producer bacteria. These bacteria were isolated from 198 samples obtained from different places (ground, wastewater and polluted water).

Table 1. Origin, identification and extracellular lipase production from bacteria obtained from dairy products and slaughterhouses industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.

ID	Origin	Bacterial specie	Extracellular Lipase
11	DP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	+
13	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>Pneumoniae</i>	+
14	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	-
15	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	-
16	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	+
17	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	-
18	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	+
19	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>Pneumoniae</i>	-
20	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	+
25	SH1	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	-
27	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	-
29	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	+
30	DP	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	+
10	DP	<i>Serratia marcescens</i>	+
12	DP	<i>S. marcescens</i>	+
21	DP	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+
23	DP	<i>E. aerogenes</i>	+
22	DP	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+
24	SH1	<i>R. ornithinolytica</i>	+
26	SH1	<i>Raoultella planticola</i>	+
28	DP	<i>R. planticola</i>	+

DP: dairy products, SH: slaughterhouse, +: positive reaction, -: negative reaction

The specie *R. planticola* isolated from the effluent in our study, was also isolated from the ground, by Sugimori et al. (2013), showing potential lipase production, the bacteria was efficient in the effluent treatment at the restaurant, consuming 70% of the lipids, in 48 hours. Many bacterial species with lipases enzyme production ability were characterized, including the ones that were isolated in our study (Sharma et al., 2001; Tebaldi et al., 2008; Messias et al., 2011; Ivanova et al., 2013).

The isolation of new microorganisms with enzyme potential production is of great importance, because they exhibit a widely applicability and efficiently in bioremediation process of contaminated places. Also due to its efficient treatment in effluent with a high content of oils and fats (Gopinath, et al., 2013).

Table 1, show that 71,43% of the isolated bacteria have extracellular lipase production, seen by the fluorescent orange halo formation around the colonies,

revealing promising results for further applications. The extracellular enzyme production is a positive factor, when there is an intention to explore microorganism in a biotechnological way. In this sense, the importance of the lipolytic production in an extracellular form is due to the facility to obtain the enzyme and the low cost in the isolation (Saxena et al., 2003; Martins et al., 2008).

Diverse factors can influence the extracellular microbial production, mainly because of the carbon source availability, such factors are: physical-chemical factors (Temperature, pH and oxygen), agitation of the microbial culture medium during the growth process and the incubation period (Colla et al., 2012; Kumar et al., 2012; Veerapagu et al., 2013). The extracellular enzyme production consists in an adaptation mechanism against extreme environmental conditions, in addition of taking advantage of his trophic niche. This is why microorganism's ability to produce extracellular enzymes is of great importance for his survival (Gopinath et al., 2005).

Meanwhile the enzymatic activity quantification showed significant variations between the bacterial species (Figure 1). Analyzing figure 1, we observed that the isolates twelve and twenty three presented more hydrolytic activity with the olive oil, in 24hours of culture. The enzymatic extract of *S. marcescens* (isolate 12) presented activity of 0,87 U/mL and *E. aerogenes* (isolate 23), 1,53 U/ml. Higher values were observed in the other bacteria such as in *K. pneumoniae* ssp. *Pneumoniae* (isolates 11 and 30), 0,45 U/ml and 0,42 U/ml, respectively. The bacteria with negative results in the extracellular lipase production enzymatic activity (Rhodamine B test), was not evaluated.

From the results obtained in the triacylglycerol's hydrolysis ability evaluation, confirm that between the 15 evaluated bacteria, *E. aerogenes* and *S. marcescens* reveal higher efficiency. The two presented the higher values in the enzymatic activity, pointing a higher quantity of free fatty acids in the medium. However the enzymatic extract from the isolates 18, 20, 26 and 29 not presented a significant result according to the oil hydrolysis, showing negatives values for the lipase activity. This result indicates that during the incubation period the olive oil hydrolysis reaction not occur or not was efficient.

There are diverse substances with enzymatic inhibition potential that can bind to the active target site or another site of the enzyme, resulting in a speed decrease or paralyzing the reaction. The temperature can influence the enzymatic reaction's speed, because the high temperature can result in enzyme denaturalization (Champe et al., 2006). In this experiment, the temperature was not inadequate, because other microorganisms presented positive and satisfactory values. Lipases enzymes also can catalyze diverse reactions, such as the esterification, being an inverse reaction of the hydrolysis. Therefore during the incubation period, another reaction could be catalyzed; resulting in the diminution of the free fatty acids in the reaction.

Zaki e Saeed (2012) evaluated the enzymatic activity of 12 strains of *Serratia marcescens*. The lipase originated by the strain that revealed a better enzymatic activity was evaluated by the degradation of triacylglycerol in different vegetable fats (soy, coconut, sesame, olive and sunflower). The spectrophotometer results showed an enzymatic activity of 112 U/ml, when the olive oil was used as a substrate. Nevertheless, a higher activity was observed when sesame oil was used (122 U/ml). In the present study, we observed an inferior activity in both *S. marcescens* strains, that can be correlated to different variables. The enzyme used by Zaki e Saeed was extract and purified, and the evaluation of the enzymatic activity was realized by spectrophotometry. Meanwhile in our study, we used the enzymatic extract produced

by *S. marcescens* and the activity determination was realized through the free fatty acids titration in the reaction medium.

Kumari et al. (2009) observed lipolytic activity in *Enterobacter aerogenes* (27,25 U/ml), in culture medium containing 3% of coconut oil, and incubated for 60 hours. The major enzymatic activity, if compared to our study, can be related to the type of carbon source, as we used with olive oil. The incubation time may be able to increase the lipase production, which in our study was of 24 hours. In addition another factor whether be intrinsic or environmental, is important in the enzymatic production.

According to Immanuel et al. (2008), the higher activity is related with the triglycerides, which are important substrates in the lipase enzyme production, which may present inducing or inhibiting function. Studies show that substrates like the olive oil, made a higher lipase production, presenting inducing function in the enzymatic production (Rajendran et al., 2007; Tavares et al., 2011). Others interfering factors in the enzymatic production are known as medium conditions depending by the temperature, pH and agitation (Willerding et al., 2011; Thakur et al., 2014). In the present study, as the bacteria were isolated from industrial effluents, we chose to define typical conditions of environmental microorganisms, therefore the incubation temperature for the enzyme isolation and production was of 30°C.

The isolate filamentous fungi from the effluent were identify as the following genera: *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., and *Trichoderma* sp.. The extracellular lipase production was observed in 57,14% of the isolated fungi, being positive using the Rhodamine B test the following fungi: *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp, *Gliocladium* sp and *Mucor* sp. Table 2 shows the extracellular lipolytic production originated by the filamentous fungi.

Table 2. Lipase enzymatic activity of filamentous fungi obtained from the dairy product and slaughterhouses industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.

Origin	Fungal Specie	Extracellular Lipase
SH3	<i>Alternaria</i> sp.	-
SH2	<i>Fusarium</i> sp.	+
SH3	<i>Geotrichum</i> sp.	+
DP	<i>Gliocladium</i> sp.	+
SH3	<i>Mucor</i> sp.	+
SH3	<i>Paecilomyces</i> sp.	-
SH3	<i>Trichoderma</i> sp.	-

DP: dairy products, SH: slaughterhouse, +: positive reaction, - : negative reaction

The lipases enzymes production by fungal microorganisms is reported in the literature, including the isolated fungi in this study (Gunasekaran e Das, 2005; Nagy et al., 2006; Fernandes et al., 2012; Gopinath et al., 2013).

Mukunda et al. (2012) isolated more than 200 funguses from the ground and evaluated the ability production of certain hydrolytic enzymes, including lipases. The following genera not reveal extracellular lipase production: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Gliocladium*, *Alternaria* and *Mucor* sp. because did not present the transparent halo around the colonies, using Tween as the substrate. In our study, the following species: *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp. and *Mucor* sp. did produce

extracellular lipase, as an important factor for further studies and applications for treatment systems.

Meanwhile in relation with the lipase enzyme activity in the olive oil degradation, the most promising results were from the following: *Mucor* sp. (0,33 U/ml) and *Gliocladium* sp. (0,17 U/ml). The figure 2 shows the fungal positive enzymatic activity to the Rhodamine B test.

Nwuche e Ogbonna (2011), isolated 12 funguses from the originated industry effluent of palm oil, including those from the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Mucor*. Using similar methodology in our study, *Mucor* sp. presented enzymatic activity of 5,72 U/ml, in culture medium containing olive oil. This high activity can be due to the high incubation time (72 hours) or being in different species, when compared to our study. Through the spectrophotometry, the *Mucor griseocyanus* lipolytic activity varied between 0,04 to 0,1 U/ml, using different substrates such as olive oil, coconut oil, sunflower oil, among others (Armas et al., 2008), meanwhile another specie, *Mucor geophyllus* reveal maximum activity of 44,56 U/ml by the titration method, having as substrate the olive oil (Naqvi et al., 2011), both with the same incubation period (72 hours).

Burkert et al. (2004), with the specie *Geotrichum* sp., obtained enzymatic activity of 17 U/ml, after 50 hours of incubation, meanwhile Carvalho et al. (2005), observed 12,8 U/ml, with the specie *Geotrichum candidum*, after 72 hours. Both studies used olive oil as a carbon source and quantified the fatty acids by titration. The superior enzymatic activity of the studies species, in relation to our study, is due to the species distinction, in which we isolate, or well with the incubation time, that in the present study was of just 48 hours.

According to Odeyemi et al. (2013), the biologic oily effluents treatment, had been more efficient, with the lipids compounds degradation in miscible molecules. According to Gopinath et al. (2013), the domestic and industrial residuals can have fungi with high potential degradation in the fatty and oils, eliminating wastes and through they activity, can produce beneficent substances.

The microorganism's metabolism shows the ability of waste elimination and the production of useful substances. Therefore the biodegradation consists in an important process to minimize the environment oil pollution, reducing the environmental impacts (Gopinath et al., 2013). In this sense, diverse microorganisms can be efficient in the treatment of contaminated places through their biotechnological applications.

Conclusions

The study reveals that there are microorganisms that produce lipases enzymes in industrial effluents, with the ability of extracellular lipase production, positive factor in obtaining from enzymes and for further applications. The produced lipases revealed the lipid compound biodegradation, being effective in effluents from treatment systems in different sectors.

References

- Almeida, A.F., Tauk-Tornisielo, S.M., Carmona, E.C., 2013. Acid lipase from *Candida viswanathii*: Production, biochemical properties, and potential application. *BioMed Research International* 2013, 1-10.
- Anbu, P., Noh, M., Kim, D., Seo, J., Hur, B., Min, K.H., 2011. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. *African Journal of Biotechnology* 10, 4147-4156.
- Armas, J.C., Mendoza, J.C.D., Hernandez, J.L.M., 2008. *Mucor griseocyanus* lipase production, characterization and study of some catalytic properties of the immobilised enzyme. *Food Technology Biotechnology* 46, 195-201.
- Burkert, F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology* 91, 77-84.
- Carvalho, P.O., Calafatti, S.A., Marassi, M., Da Silva, D.M., Contesini, F.J., Bizaco, R., 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova* 28, 614-621.
- Carvalho, P.O., Campos, P.R.B., Noffs, M.D., Oliveira, J.G., Shimizu, M.T., Da Silva, D.M., 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova* 26, 75-80.
- Castro, H.F., Mendes, A.A., Santos, J.C., 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova* 27, 146-156.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2006. *Bioquímica ilustrada*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 544p.
- Chernicharo, C.A.L. 1997. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Vol. 5, Belo Horizonte: DESA/UFMG, 379p.
- Colla, L.M., Reinehr, C.O., Costa, J.A.V., 2012. Aplicações e produção de lipases microbianas. *Revista CIATEC - UPF* 4, 1-14.
- De Oliveira, J.P., Antunes, P.W.P., Pinotti, L.M., Cassini, S.T.A., 2014. Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. *Química Nova* 37, 597-602.
- Fernandes, E.G., Valério, H.M., Feltrin, T., Van Der Sand, S.T., 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 827-833.
- Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Hilda, A., 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* 46, 119-126.

Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Hilda, A., 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International* 2013, 1-10.

Gunasekaran, V., Das, D., 2005. Lipase fermentation: progress and prospects. *Indian Journal of Biotechnology* 4, 437-445.

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

Immanuel, G., Esakkiraj, P., Jebadhas, A., Iyapparaj, P., Palavesam, A., 2008. Investigation of lipase production by milk isolate *Serratia rubidaea*. *Food Technology & Biotechnology* 46, 60-65.

Ivanova, I.A., Nikolova, S., Yemendzhiev, H., Koniarska, A., Alexieva, Z., 2013. Microflora of Bulgarian oil contaminated environments. *Journal of Cell & Plant Sciences* 4, 12-17.

Jaeger, K.E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 390-397.

Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., Gupta, V.K., 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research* 4, 1763-1770.

Kumari, A., Mahapatra, P., Banerjee, R., 2009. Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 1349-1356.

Leal, M.C.M.R., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., Sant'Anna Jr., G.L., 2002. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19, 175-180.

Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., Filippis, I., Fontana, J., 2004. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 31, 53-61.

Lin, J.F., Lin, Q., Li, J.; Fei, Z.A., Li, X.R., Xu, H., Qiao, D.R., Cao, Y., 2012. Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in southwest of China and characteristics of lipase. *African Journal of Microbiology Research* 6, 3797-3806.

Martins, V.G., Kalil, S.J., Costa, J.A.V., 2008. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova* 31, 1942-1947.

Mendes, A.A., Castro, H.F., Pereira, E.B., Furigo Jr., A., 2005. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova* 28, 296-305.

Messias, J.M., Costa, B.Z., Lima, V.M.G., Giese, E.C., Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M., 2011. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas* 32, 213-234.

Moura, L.F.W.G., Oliveira, M.V., Lô, M.M., Mota, J.G.S.M., Magalhães, E.A., Lima, M.C.L., Magalhães, F.E.A., 2013. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 15, 157-165.

Mukunda, S., Onkarappa, R., Kekuda, P.T.R., 2012. Isolation and screening of industrially important fungi from the soils of western ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research Journal* 1, 27-32.

Nagy, V., Tőke, E.R., Keong, L.C., Szatzker, G., Ibrahim, D., Omar, I.C.; Szakács, G., Poppe, L., 2006. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39, 141-148.

Naqvi, S.H., Dahot, M.U., Ali, A., Khan, M.Y., Rafiq, M., 2011. Production and characterization of extracellular lipase secreted by *Mucor geophyllus*. *African Journal of Biotechnology* 10, 19598-19606.

Nwuche, C.O., Ogbonna, J.C., 2011. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 4, 113-116.

Odeyemi, A.T., Aderiye, B.I., Bamidele, O.S., 2013. Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* spp. from restaurant wastewater and receiving stream. *Journal of Microbiology Research* 3, 43-52.

Patil, K.J., Chopda, M.Z., Mahajan, R.T., 2011. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology* 4, 971-982.

Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Taketani, R.G., 2008. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. In: De Melo, Itamar S., De Azevedo, João L. 2ed. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.83-106.

Rajendran, A., Thirugnanam, M., Thangavelu, V., 2007. Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian Journal Biotechnology* 6, 469-478.

Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S., 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52, 1-18.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19, 627-662.

Silva Filho, G. N., Oliveira, V.L., 2007. *Microbiologia: manual de aulas práticas*. 2.ed. Florianópolis: UFSC, 157p.

Sugimori, D., Nakamura, M., Mihara, Y., 2002. Microbial degradation by *Acinetobacter* sp. Strain SOD-1. *Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66, 1579-1582.

Sugimori, D., Watanabe, M., Utsue, T., 2013. Isolation and lipid degradation profile of *Raoultella planticola* strain 232-2 capable of efficiently catabolizing edible oils under acidic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 871-880.

Tavares, L.L.P., Nascimento, A.E., Okada, K., Silva, C.A.A., 2011. Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014). *Exacta* 9, 309-316.

Tebaldi, V.M.R., Oliveira, T.L.C., Boari, C.A., Piccoli, R.H., 2008. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 753-760.

Thakur, V., Tewari, R., Sharma, R., 2014. Evaluation of production parameters for maximum lipase production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and scale-up in bioreactor. *Chinese Journal of Biology* 2014, 1-14.

Veerapagu, M., Narayanan, A.S., Ponmurugan, K., Jeya, K.R., 2013. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6, 62-67.

Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A.K., 2012. Microbial lipases: Industrial applications and properties: A review. *International Research Journal of Biological Sciences* 1, 88-92.

Willerding, A.L., Oliveira, L.A., Moreira, F.W., Germano, M.G., Chagas Jr., A.F., 2011. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils. *Enzyme Research* 2011, 1-5.

Zaki, N.H., Saeed, S.E., 2012. Production, purification and characterization of extra cellular lipase from *Serratia marcescens* and its potential activity for hydrolysis of edible oils. *Journal of Al-Nahrain University* 15, 94-102.

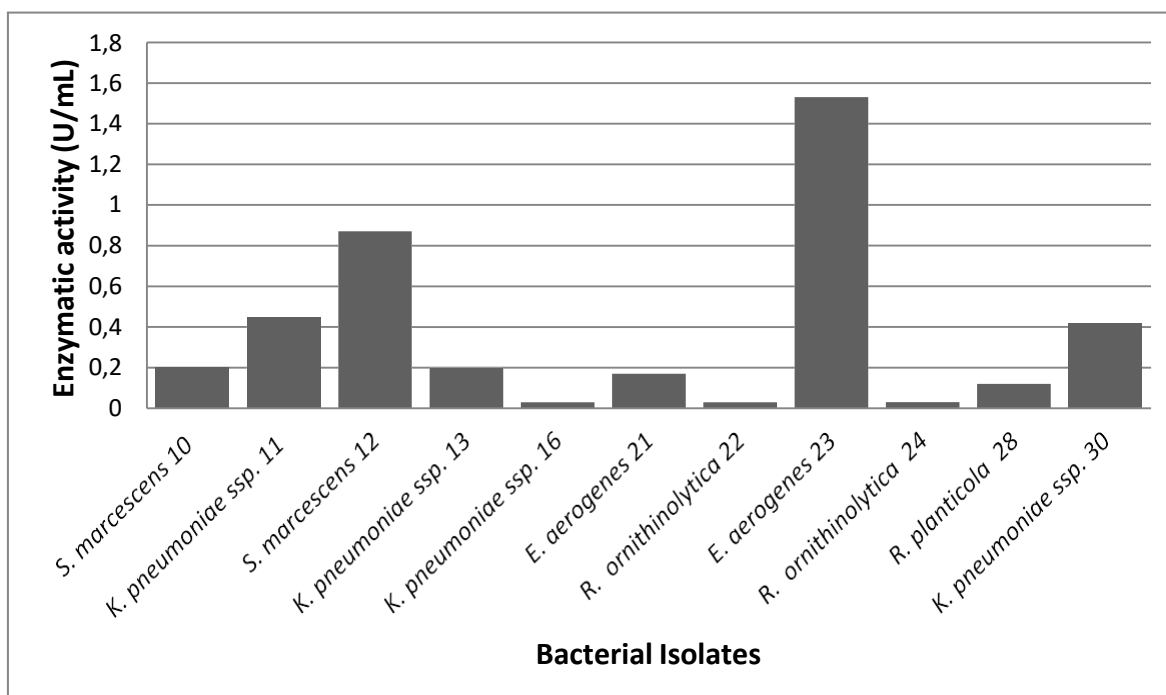


Figure 1. Extracellular lipase enzymatic activity of bacteria obtained from the dairy products and slaughterhouse industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.

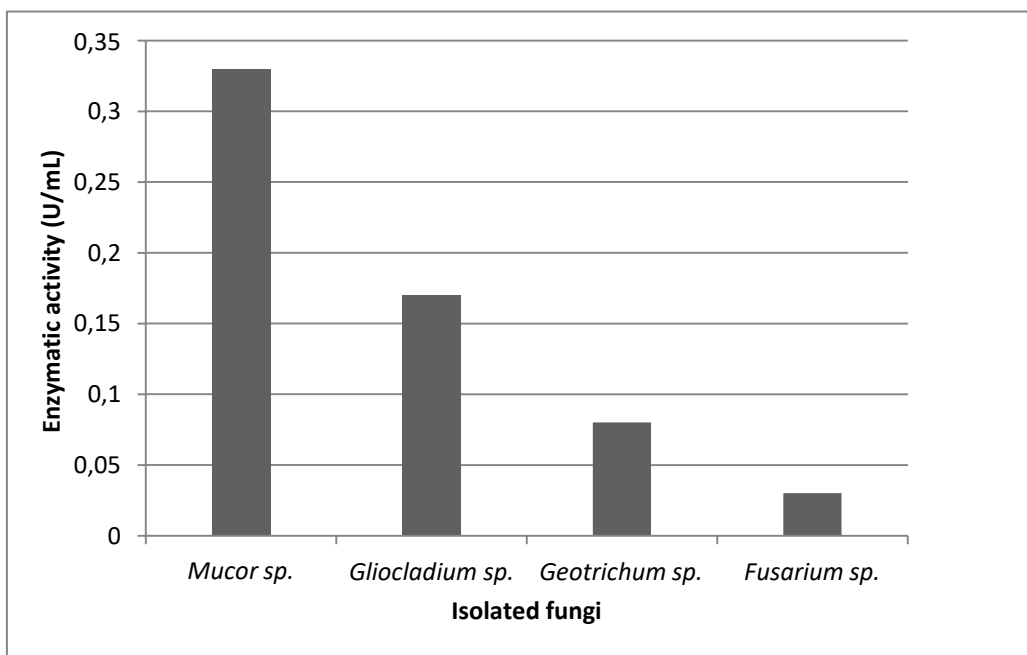


Figure 2. Lipase enzymatic activity of filamentous fungi obtained from the dairy products and slaughterhouse industry effluents in Pelotas/RS, Brazil.

5 CONCLUSÕES

A partir das coletas de efluentes industriais foram identificados 28 microrganismos, destes 19 revelaram a produção de lipase extracelular, fator positivo para obtenção da enzima e aplicações futuras.

As lipases produzidas pelos microrganismos *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* revelaram maior atividade enzimática na degradação do azeite de oliva.

O estudo revela que há microrganismos produtores de enzimas lipases presentes em efluentes industriais, que podem ser eficientes em sistemas de tratamento de efluentes.

6 PERSPECTIVAS

- São necessários novos estudos sobre as condições ambientais e nutricionais ideais para eficiente produção de enzimas lipases.
- Formulação de produtos biotecnológicos contendo células microbianas para degradação de compostos lipídicos.
- Purificação das enzimas lipases produzidas pelos microrganismos que se apresentaram mais eficientes.

REFERÊNCIAS

- ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.6, p.281-287, 2006.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: Production, biochemical properties and potential application. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-10, 2013.
- ANBU, P.; NOH, M.; KIM, D.; SEO, J.; HUR, B.; MIN, K. H. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.20, p.4147-4156, 2011.
- ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNANDEZ, J. L. M. *Mucor griseocyanus* lipase production, characterization and study of some catalytic properties of the immobilised enzyme. **Food Technology Biotechnology**, v.46, n.2, p.195-201, 2008.
- ATLAS, R. M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M.; BEJ, A. K. Response of microbial populations to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, v.22, n.1, p.249-256, 1991.
- BENJAMIM, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipase from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.2, p.213-221, 2001.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER JR., W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.65-68, 2003.
- BERTI, A. P.; DÜSMAN, E.; SOARES, L. C.; GRASSI, L. E. A. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. **Revista de Saúde e Biologia**, v.4, n.1, p.45-51, 2009.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução n.430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n.357, de 17 de março de 2005.
- BURKERT, F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, n.1, p.77-84, 2004.
- CAMARENO, M. V.; ESQUIVEL, L. G. R. Aprovechamiento de algunos materiales en el desarrollo de coagulantes y floculantes para el tratamiento de aguas en Costa Rica. **Tecnología en Marcha**, v.19, n.4, p.37-41, 2006.
- CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, v.23, n.19, p.1591-1595, 2001.

- CARVALHO, L. C. T. **Produção de lipases e biossurfactantes por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual**. 2012. 137f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; DA SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, 614-621, 2005.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; DA SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, 75-80, 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Enzimas. In:_____. **Bioquímica ilustrada**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 53-68.
- CHAROENPANICH, J.; SUKTANARAG, S.; TOOBBUCHA, N. Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp. EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. **Science Asia**, v.37, n.2, p.105-114, 2011.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**, v.5, Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1997. 379p.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v.13, p.85-103, 2003.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n.2, p.1-14, 2012.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.
- CRESPILHO, F. N.; SANTANA, C. G.; REZENDE, M. O. O. Tratamento de efluente da indústria de processamento de coco utilizando eletroflotação. **Química Nova**, v.27, n.3, p.387-392, 2004.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology Lipases, Part A: Biotechnology**, v.284, p.3-27, 1997.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

DE OLIVEIRA, J. P.; ANTUNES, P. W. P.; PINOTTI, L. M.; CASSINI, S. T. A. Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. **Química Nova**, v.37, n.4, p.597-602, 2014.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, n.1-2, p.75-80, 1998.

DORIGON, E. B.; TESSARO, P. Caracterização dos efluentes da lavagem automotiva em postos de atividade exclusiva na região AMAI - Oeste catarinense. **Unoesc & Ciência - ACBS**, v.1, n.1, p.13-22, 2010.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERNANDES, E. G.; VALÉRIO, H. M.; FELTRIN, T.; VAN DER SAND, S. T. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.2, p.827-833, 2012.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v.23, n.4, p.504-511, 2000.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.8, n.34, p.36-43, 2005.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v.46, n.2, p.119-126, 2005.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-10, 2013.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; GOMES, E. R. S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, n.1-2, p.1-22, 2008.

GUNASEKARAN, V.; DAS, D. Lipase fermentation: progress and prospects. *Indian Journal of Biotechnology*, v.4, n.4, p.437-445, 2005.

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

HAWKES, F. R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K. Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. **Water Research**, v.29, n.2, p.525-533, 1995.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

IMMANUEL, G.; ESAKKIRAJ, P.; JEBADHAS, A.; IYAPPARAJ, P.; PALAVESAM, A. Investigation of lipase production by milk isolate *Serratia rubidaea*. **Food Technology & Biotechnology**, v.46, n.1, p.60-65, 2008.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, n.1, p.53-58, 2001.

IVANOVA, I. A.; NIKOLOVA, S.; YEMENDZHIEV, H.; KONIARSKA, A.; ALEXIEVA, Z. Microflora of Bulgarian oil contaminated environments. **Journal of Cell & Plant Sciences**, v.4, n.1, p.12-17, 2013.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.4, p.390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. V.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p.29-63, 1994.

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

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEK, K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, n.1, p.3-12, 1997.

JUNG, W. H.; KIM, H. K.; LEE, C. Y.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, n.1, p.25-30, 2002.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v.33, n.5, p.505-511, 1998.

KUMARI, A.; GUPTA, R. Purification and biochemical characterization of a novel magnesium dependent lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54 and its application in biodiesel production. **Asian Journal of Biotechnology**, v.4, n.2, p.70-82, 2012.

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

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, p.1349-1356, 2009.

KUMAR, D.; KUMAR, L.; NAGAR, S.; RAINA, C.; PARSHAD, R.; GUPTA, V. K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n.4, p.1763-1770, 2012.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n.1, p.78-82, 2002.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA Jr., G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n.2, p.175-180, 2002.

LEAL, M. C. C. R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA Jr., G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v.41, n.5, p.1173-1178, 2006.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; KANG, S. W.; SONG, Y. S.; PARK, C.; HAN, S. O.; KIM, S. W. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. **Bioresource Technology**, v.102, n.2, p.2105-2108, 2011.

LI, C.; CHENG, C.; CHEN, T. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and microbial technology**, v.29, n.4, p.258-263, 2001.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.31, n.1, p.53-61, 2004.

LIN, E.; WANG, C.; SUNG, S. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.1, p.98-102, 2006.

LIN, J. F.; LIN, Q.; LI, J.; FEI, Z. A.; LI, X. R.; XU, H.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in southwest of China and characteristics of lipase. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.16, p.3797-3806, 2012.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.23-27, 2007.

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

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.76, n.6, p.629-635, 2001.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n.2, p.296-305, 2005.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, E. F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p.143-149, 2006.

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

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S. Biodegradation of lipidich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, n.2, p.101-105, 2002.

MONTEFRIO, M. J.; XINWEN, T.; OBBARD, J. P. Recovery and pre-treatment of fats, oil and grease from grease interceptors for biodiesel production. **Applied Energy**, v.87, n.10, p.3155-3161, 2010.

MOURA, L. F. W. G.; OLIVEIRA, M. V.; LÔ, M. M.; MOTA, J. G. S. M.; MAGALHÃES, E. A.; LIMA, M. C. L.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.2, p.157-165, 2013.

MUKUNDA, S.; ONKARAPPA, R.; KEKUDA, P. T.R. Isolation and screening of industrially important fungi from the soils of western ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v.1, n.4, p.27-32, 2012.

NAGY, V.; TÖKE, E. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZAKÁCS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.39, n.1, p.141-148, 2006.

NAQVI, S. H.; DAHOT, M. U.; ALI, A.; KHAN, M. Y.; RAFIQ, M. Production and characterization of extracellular lipase secreted by *Mucor geophyllus*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.84, p.19598-19606, 2011.

- NOBLE, M. E. M.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L. N.; EGMOND, M. R.; FRENKEN, L. G. J. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS Letters**, v.331, n.1,2, p.123-128, 1993.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v.96, n.7, p.769-77, 2005.
- NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.1, p.113-116, 2011.
- ODEYEMI, A. T.; ADERIYE, B. I.; BAMIDELE O. S. Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* spp. from restaurant wastewater and receiving stream. **Journal of Microbiology Research**, v.3, n.1, p.43-52, 2013.
- OMIL, F.; GARRIDO, J. M.; ARROJO, B.; MÉNDEZ, R. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. **Water Research**, v.37, n.17, p.4099-4108, 2003.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2, p.81-84, 2003.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n1, p.93-99, 2006.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp.. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.135-140, 2003.
- PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v.4, n.8, p.971-982, 2011.
- PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; TAKETANI, R. G. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. In: DE MELO, Itamar S.; DE AZEVEDO, João L. 2ed. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p.83-106.
- PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.6, n.6, p.975-1006, 2012.
- PIEDEDE, M. T. F.; VAL, V. M. F. A.; LOPES, A.; HENRIQUE, H. S.; FÉ, L. M. L.; WITTMANN, F. Organismos aquáticos e de áreas úmidas em uma Amazônia em transição. **Ciência e Cultura**, v.66, n.3, p.34-40, 2014.

RAJENDRAN, A.; THIRUGNANAM, M.; THANGAVELU, V. Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. **Indian Journal Biotechnology**, v.6, n.4, p.469-478, 2007.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v.46, n.3, p.682-688, 2011.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROMERO, C. M.; BAIGORÍ, M. D.; BARON, A. M.; KRIEGER, N.; PERA, L. M. Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilum*: Potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering & Technology**, v.37, n.11, p.1987-1992, 2014.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.126-131, 2010.

SABESP. **Programa de Reciclagem de óleo de fritura da Sabesp**. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_completo.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2015.

SAGAR, K.; BASHIR, Y.; PHUKAN, M. M.; KONWAR, B. K. Isolation of lipolytic bacteria from waste contaminated soil: a study with regard to process optimization for lipase. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v.2, n.10, p.214-218, 2013.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W.; ROSHINI, K. T.; SHANTALA, Y. M. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.5, p.564-568, 2007.

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

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE-UFES**. 2006. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

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

SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia: manual de aulas práticas**. 2.ed. Florianópolis: UFSC, 2007. 157p.

SOUZA, P. R. M. **Biodiesel de óleos e gorduras residuais: uma alternativa para a redução da poluição dos esgotos e águas**. 2012. 55f. Monografia (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, n.5, p.347-355, 2003.

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

SUGIMORI, D.; WATANABE, M.; UTSUE, T. Isolation and lipid degradation profile of *Raoultella planticola* strain 232-2 capable of efficiently catabolizing edible oils under acidic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.2, p.871-880, 2013.

TAVARES, L. L. P.; DO NASCIMENTO, A. E.; OKADA, K.; DA SILVA, C. A. A. Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014). **Exacta**, v.9, n.3, p.309-316, 2011.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.753-760, 2008.

THAKUR, V.; TEWARI, R.; SHARMA, R. Evaluation of production parameters for maximum lipase production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and scale-up in bioreactor. **Chinese Journal of Biology**, v.2014, p.1-14, 2014.

VALLADAO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.60, n.4, p.219-225, 2007.

VEERAPAGU, M.; NARAYANAN, A. S.; PONMURUGAN, K.; JEYA, K. R. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.6, n.3, p.62-67, 2013.

VEIGA, A. A. **Biodegradação de gordura em efluente através da adição controlada de enzimas e microrganismos em reatores aeróbios em série**. 2003. 134f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VERMA, M. L.; AZMI, W.; KANWAR, S. S. Enzymatic synthesis of isopropyl acetate by immobilized *Bacillus cereus* lipase in organic medium. **Enzyme research**, v.2011, p.1-7, 2011.

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial lipases: Industrial applications and properties: A review. **International Research Journal of Biological Sciences**, v.1, n.8, p.88-92, 2012.

WILLERDING, A. L.; OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F. W.; GERMANO, M. G.; CHAGAS JR., A. F. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils. **Enzyme Research**, v.2011, p.1-5, 2011.

WILLEY, R. Fats, oils, and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, n.2, p.127-133, 2001.

WINNY, X.; KHOSASIH, V.; SUWANTO, A.; KIM, H. K. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. **Journal of microbiology and biotechnology**, v.22, n.1, p.84-91, 2012.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.24, p. 2735-2739, 2007.

ZAKI, N. H.; SAEED, S. E. Production, purification and characterization of extra cellular lipase from *Serratia marcescens* and its potential activity for hydrolysis of edible oils. **Journal of Al-Nahrain University**, v.15, n.1, p.94-102, 2012.