

Lipases de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 (579): caracterização do efeito de íons, surfactantes e solventes e determinação de parâmetros cinéticos

*Pedro Alves Martins*¹, *Thályta Fraga Pacheco*², *Brenda Rabello de Camargo*³,
*Janice Lisboa De Marco*⁴, *Thaís Fabiana Chan Salum*⁵

Resumo

Burkholderia gladioli CNPAE 99 (579) é uma linhagem bacteriana recém-isolada que demonstrou potencial para produção e secreção de uma lipase alcalina altamente ativa e estável em solventes orgânicos. O extrato enzimático obtido do cultivo da bactéria por fermentação em estado sólido foi incubado com diferentes compostos de modo que se pudesse observar o efeito de ativadores/inibidores nas lipases produzidas. Alguns cátions bivalentes, como Fe^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} se comportaram como ativadores da atividade da lipase, exibindo uma atividade relativa de 112,3%, 109,8% e 103,9%, respectivamente. No entanto, EDTA, Fe^{3+} , Zn^{2+} e SDS revelaram ser os principais inibidores da atividade lipolítica. As lipases do extrato enzimático permaneceram funcionais em um amplo espectro de solventes analisados, como acetonitrila, éter dietílico e *n*-hexano. O clorofórmio, entretanto, provocou uma perda de 14,2% de atividade lipolítica. Estudaram-se ainda os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m , obtendo-se valores de $1,65 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ e $7,44 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. O baixo valor de K_m indica uma alta afinidade da lipase de *B. gladioli* CNPAE 99 (579) por trioleína. Tais características demonstram, portanto, oportunidades para novos estudos e revelam uma lipase com potencial para aplicações tanto em reações de hidrólise quanto de síntese de ésteres.

Palavras-chave: lipase, *Burkholderia gladioli*, fermentação em estado sólido.

Introdução

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são carboxil-éster hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para produzir ácidos graxos livres e glicerol. A função de hidrólise representa o papel fisiológico dessas enzimas no metabolismo de lipídeos e ocorre em uma interface água/óleo (Kapoor; Gupta, 2012). Além da hidrólise, lipases também são capazes de catalisar reações de transesterificação, interesterificação e esterificação não só de triacilgliceróis, como também de outras variedades de ésteres, quando em ambientes com baixa quantidade de água. Além dessa diversidade catalítica, as lipases

¹ Biólogo, doutorando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, pedropam.bio@gmail.com

² Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

³ Bioquímica, doutora em Biologia Molecular, pós-doutoranda na Universidade de Brasília, brendarc@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora da Universidade de Brasília, janicedemarco@unb.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Ciências - Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

apresentam uma especificidade abrangente em relação aos seus substratos, podendo atuar sobre lipídios com diferentes graus de insaturação e comprimentos de cadeia. As lipases são, portanto, consideradas biocatalisadores ideais e com ampla aplicabilidade industrial em seus mais diversos setores.

Burkholderia gladioli é uma bactéria Gram-negativa que pode ser encontrada em vários nichos ecológicos. Foi originalmente classificada como *Pseudomonas marginata*, sendo conhecida por ser um patógeno vegetal que causa manchas foliares, enegrecimento de folhas e podridão de grãos em cultivares de cebola, arroz e gladiolo (Stoyanova et al., 2007). Assim como outras bactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, *B. gladioli* é uma boa produtora de lipases. Entretanto, poucos trabalhos tem sido conduzidos a fim de estudar o potencial destas enzimas, com poucos trabalhos descrevendo a produção de esterases (Ivancic et al., 2007; Chen et al., 2011) e apenas um estudando lipases verdadeiras (Zhu et al., 2019). Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou a linhagem *B. gladioli* CNPAE 99 (579) de frutos de dendê, que se destacou entre outras bactérias isoladas como a melhor produtora de lipase. Deste modo, neste trabalho foram investigados os efeitos da adição de íons, surfactantes e solventes sobre as lipases de *B. gladioli* CNPAE 99 (579). Concomitantemente, determinaram-se os parâmetros cinéticos destas lipases de modo que pudesse ser realizada uma comparação com outras enzimas previamente descritas na literatura.

Material e Métodos

Produção das lipases

O cultivo da bactéria *Burkholderia gladioli* foi realizado por fermentação em estado sólido para a produção de lipases. Adicionaram-se 16 mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ pH 5,8 a 10 gramas de farelo de trigo (Bünge) para obter uma umidade de 65%. Como indutor foi utilizado óleo de soja refinado 1% (m/m). Após preparo e esterilização do meio de cultivo, este foi inoculado com uma suspensão de bactérias com densidade ótica a 600 nm de 0,904 e mantido a 32,5 °C por 5 dias. Após o cultivo, a extração das lipases foi realizada incubando 5 mL de solução extratora (tampão fosfato de sódio 67 mmol·L⁻¹ pH 6,8; goma arábica 0,1%; e triton X-100 0,66%) por grama de substrato seco e incubando por 1 h sob agitação de 150 rpm a 16,2 °C. Após etapa de extração e centrifugação, o extrato enzimático obtido foi utilizado nas análises de determinação de atividade lipolítica.

Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada com base na metodologia descrita por Winkler e Stuckmann (1979) com modificações. Para cada ensaio, 1 mL de solução A (3 mg de *p*-nitrofenil palmitato, *p*NPP, em 1 mL de 2-propanol) foi adicionado a 9 mL de solução B (50 mmol·L⁻¹ tampão fosfato pH 7; triton X-100 0,44%; goma arábica 0,11%, m/v), sob agitação. Uma alíquota de 0,9 mL desta mistura foi transferida para uma cubeta e 0,1 mL do extrato enzimático foi misturado. A absorvidade molar do *p*-nitrofenol (*p*NP) a pH 7,0 foi determinada experimentalmente como 4681,1 L·mol⁻¹·cm⁻¹ para as condições

de ensaio. As reações ocorreram a 37 °C e pH 7,0 por 1 min com leituras a cada 10 segundos, medindo o aumento na concentração de *p*NP em 410 nm.

Alternativamente, a atividade lipolítica também foi determinada por titulação (Diaz et al., 2006). O meio reacional foi composto de trioleína 66 mmol·L⁻¹ emulsificada em uma solução de tampão Tris-HCl 2,5 mmol·L⁻¹ pH 9,0 acrescido de NaCl 150 mmol·L⁻¹ e goma arábica (3%, m/v). Para cada reação, 20 mL de emulsão e 1 mL de extrato enzimático foram colocados em um recipiente termostatzado a 50 °C com agitação magnética e a liberação de ácidos graxos livres foi monitorada durante 5 min por titulação com NaOH 20 mmol·L⁻¹ em modo pH-Stat (Metrohm-Titrando Stat 902) definido para um valor de pH constante a 9,0.

Para ambos ensaios, uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto (*p*NP ou ácidos graxos livres) por minuto nas condições de ensaio. A atividade lipolítica foi expressa com base nas gramas originais de sólido seco (gss) a partir do qual o extrato foi preparado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Efeito de íons, solventes e surfactantes

O extrato enzimático teve sua atividade lipolítica avaliada após incubação com diferentes íons. Os íons avaliados foram derivados dos seguintes sais: BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, FeSO₄, KF, KI, LiCl, MgCl₂, MnSO₄, NaCl, NH₄Cl, NiSO₄ e ZnSO₄. A influência do EDTA na atividade lipolítica também foi avaliada. O extrato enzimático foi incubado por 5 min com cada composto na concentração final de 10 mmol·L⁻¹. Da mesma forma, o extrato enzimático teve sua atividade lipolítica avaliada frente a incubação com diferentes surfactantes (SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100 e PEG-6000) e solventes (acetona, acetonitrila, clorofórmio, éter dietílico, *n*-heptano, *n*-hexano, metanol, etanol e 2-propanol). O extrato enzimático foi incubado durante 5 min com cada surfactante a uma concentração final de 1% (m/v). Para os solventes, o extrato enzimático foi incubado durante 5 min a uma concentração final de 10% (v/v).

As atividades lipolíticas foram medidas com base na hidrólise do *p*NPP e sempre foram comparadas à condição controle incubada com água destilada. O teste t de Student ($\alpha = 5\%$) foi usado para comparação entre as atividades na presença e ausência de cada composto.

Parâmetros cinéticos

A influência da concentração de substrato nas velocidades de reação foi determinada com trioleína como substrato utilizando o método titulométrico de determinação da atividade lipolítica. O extrato enzimático foi incubado com trioleína emulsificada com concentração variando de 5 a 100 mmol·L⁻¹. Os parâmetros cinéticos *V*_{max} (velocidade máxima) e constante de Michaelis (*K*_m) foram estimados a partir da equação de Michaelis-Menten sem linearização. Um procedimento iterativo de estimativa de mínimos quadrados, baseado no algoritmo de Gauss-Newton, foi utilizado para obter os parâmetros que melhor ajustassem o modelo cinético aos dados experimentais. O critério de convergência adotado foi de 10⁻⁶ com número máximo de iterações de 100.

Resultados e Discussão

Efeito de íons, solventes e surfactantes

O efeito dos aditivos no meio de reação foi avaliado a fim de encontrar possíveis ativadores ou inibidores da lipase (Tabela 1). Ao comparar as atividades lipolíticas, é possível observar que, embora próximos da atividade relativa do controle, muitos íons tiveram efeito estatisticamente significativo. Entre os inibidores, EDTA, ZnSO_4 e FeCl_3 promoveram uma perda de atividade de 91,9%, 48,5% e 37,0%, respectivamente. Por outro lado, FeSO_4 , MgCl_2 e BaCl_2 se comportaram como ativadores, exibindo uma atividade relativa de 112,3%, 109,8% e 103,9%, respectivamente. Embora o mesmo efeito não tenha sido observado para todos os cátions bivalentes avaliados, é interessante notar que todos os ativadores encontrados pertencem a esta categoria. Entre os íons de ferro, destaca-se também a diferença promovida entre o íon ferroso (cátion bivalente) e o íon férrico (cátion trivalente), onde o primeiro atua como ativador e o segundo como inibidor. Como encontrado para a lipase *B. gladioli* CNPAE 99 (579), outros autores também encontraram um efeito inibitório nas lipases na presença de Zn^{2+} (Sun et al., 2009; Esakkiraj et al., 2017; Ai et al., 2018). Da mesma forma, o efeito inibitório do Fe^{3+} também foi relatado (Sun et al., 2009; Esakkiraj et al., 2017; Malekabi et al., 2018). Porém, para outras lipases, os mesmos íons se comportaram como ativadores, como no caso da lipase BTS-3 de *Bacillus coagulans*, que foi ativada na presença de Fe^{3+} (Kumar et al., 2012). Em relação aos ativadores, o Mg^{2+} pode ser destacado por também ser relatado como ativador para outras lipases (Sun et al., 2009; Kumar et al., 2012; Ai et al., 2018). Boran et al. (2019) também relataram um aumento significativo na atividade da lipase de *Streptomyces violascens* na presença de Fe^{2+} . O efeito dos íons metálicos na atividade da lipase pode resultar não só de uma mudança na solubilidade e no comportamento dos ácidos graxos ionizados na interface onde a enzima realiza a catálise da reação, mas também de mudanças nas propriedades intrínsecas da própria enzima, como seu dobramento.

Em relação aos demais aditivos, o extrato enzimático manteve sua atividade lipolítica funcional quando incubado com um amplo espectro de solventes orgânicos e tensoativos estudados (Tabela 1). A resistência a solventes orgânicos é uma característica importante das lipases industriais, uma vez que tais solventes orgânicos podem contribuir para a solubilidade de substratos e produtos hidrofóbicos ou mesmo na acessibilidade do sítio de ligação de lipídios da enzima (Oskolkova; Hermetter, 2002). A atividade lipolítica foi mantida mesmo em incubação com solventes polares, como etanol e metanol. Em um estudo com *Pseudomonas* sp. S1, uma perda de 8,4% na atividade lipolítica foi relatada na presença de 15% de metanol (Sahoo et al., 2014). Desse modo, a tolerância ao álcool de cadeia curta representa uma vantagem da lipase de *B. gladioli* CNPAE 99 (579). Em relação ao efeito inibitório da adição de solventes, o clorofórmio e o 2-propanol tiveram o efeito mais deletério sobre a atividade da lipase, resultando em uma perda de 14,2% e 9,7% da atividade, respectivamente.

Tabela 1. Efeito de íons, solventes e surfactantes sobre a atividade lipolítica do extrato enzimático obtido do cultivo de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 (579). Método: hidrólise do pNPP.

Aditivos		Atividade Relativa (%)	Aditivos		Atividade Relativa (%)
Controle		100.0 ± 2.9			
Compostos (10 mmol·L⁻¹)			Solventes (10% v/v)		
*	BaCl ₂	103.9 ± 2.0	*	Acetona	95.3 ± 1.7
	CaCl ₂	100.7 ± 1.8		Acetonitrila	98.1 ± 2.6
*	CoCl ₂	96.4 ± 2.3	*	Clorofórmio	85.8 ± 3.4
	CuSO ₄	94.2 ± 10.1		Dietil Éter	99.6 ± 2.8
*	FeCl ₃	63.0 ± 2.4	*	<i>n</i> -Heptano	104.8 ± 2.2
*	FeSO ₄	112.3 ± 3.5		<i>n</i> -Hexano	101.3 ± 2.5
	KF	97.9 ± 2.0		Metanol	96.8 ± 2.3
*	KI	93.2 ± 1.5	*	Etanol	97.1 ± 0.4
*	LiCl	96.9 ± 1.0	*	2-Propanol	90.3 ± 3.1
*	MgCl ₂	109.8 ± 1.8	Surfactantes (1% m/v)		
	MnSO ₄	96.2 ± 2.1		PEG-6000	101.0 ± 4.5
	NaCl	98.6 ± 2.1		Triton X-100	96.5 ± 3.8
*	NH ₄ Cl	96.5 ± 1.1	*	Tween 20	94.6 ± 1.8
*	NiSO ₄	81.3 ± 0.9	*	Tween 80	92.4 ± 3.5
*	ZnSO ₄	51.5 ± 3.5	*	SDS	3.8 ± 0.5
*	EDTA	8.1 ± 2.0			

* Diferença estatisticamente significativa (nível de significância 5%)

Entre os surfactantes, a incubação com SDS resultou na condição que mais inibiu a lipase, com perda de 96,2% na atividade. É possível que a adição de SDS promova a ruptura das ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura nativa da enzima, causando perda de funcionalidade. Um comportamento semelhante também foi observado para as lipases de *Rhizopus chinensis* (Sun et al., 2009), *Penicillium chrysogenum* (Kumar et al., 2012), *Bacillus* sp. (Esakkiraj et al., 2017), e *Pseudomonas* spp. (Ali et al., 2019).

Parâmetros cinéticos

A velocidade máxima de reação (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) foram estimadas a partir da equação de Michaelis-Menten para a trioleína como substrato variando de 5 a 100 mmol·L⁻¹ (Figura 1). Embora não seja uma solução de lipase pura, o comportamento michaeliano foi observado para o extrato enzimático com parâmetros cinéticos comparáveis a lipases purificadas. Determinou-se que o V_{max} aparente era $1,65 \cdot 10^{-2}$ mol·L⁻¹·min⁻¹ e o valor de K_m aparente obtido foi $7,44 \cdot 10^{-2}$ mol·L⁻¹, com um $R^2 = 0,992$.

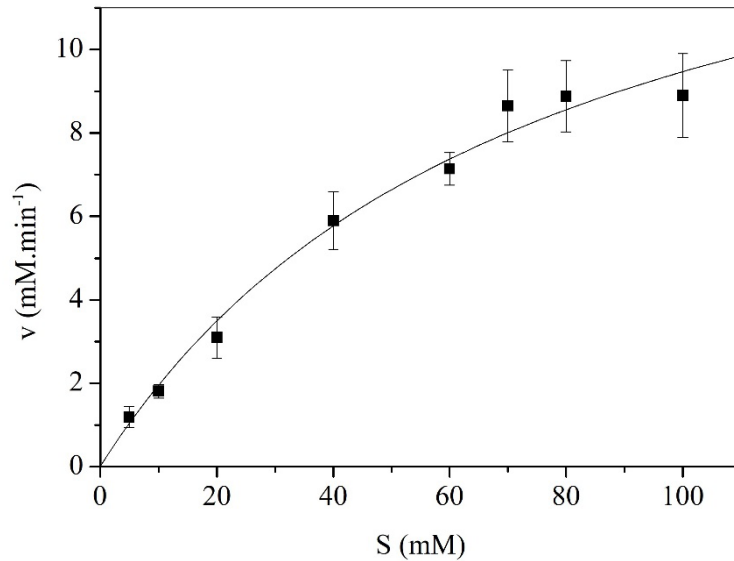


Figura 1. Velocidade de reação (v) em função da concentração de substrato (S). A linha indica a função ajustada de Michaelis-Menten. Método: titulométrico (trioleína).

O K_m aparente observado de *B. gladioli* CNPAE 99 (579) lipase é menor do que o relatado para outras lipases, indicando que esta possui uma alta afinidade para trioleína. Tran e Chang (2014), usando uma lipase de *Burkholderia* sp. (imobilizada em Celite) e azeite de oliva como substrato atingiram valores estimados de V_{max} e K_m de $0,61 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $7,93 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Borkar et al. (2009) avaliaram uma lipase extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* e encontraram um valor de K_m de $1,11\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com trioleína e $3,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com *p*NPP como substrato. Os valores de V_{max} foram calculados em 55 para trioleína e $0,189 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para *p*NPP. Uma lipase alcalina de *B. gladioli* avaliada em éster de ácido graxo *p*-nitrofenol C18 atingiu o valor K_m de $1,65\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zhu et al., 2019). Demera et al. (2019), trabalhando com um extrato lipolítico de *Guehomyces pullulans* e *p*NPP como substrato, encontraram um V_{max} e um K_m de $6,7\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $3,68 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente e considerou a cinética obtida parâmetros na faixa de lipases industriais ($10^{-1} - 10^{-5}$). É importante notar, no entanto, que as lipases geralmente apresentam maior afinidade para ésteres de *p*-nitrofenila do que triacilgliceróis e que não há substrato universal ou ensaio para quantificar a atividade da lipase, dificultando a comparação dos parâmetros cinéticos e afinidade do substrato.

Conclusões

Quando cultivada por fermentação em estado sólido, a linhagem de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 (579) produz um extrato enzimático com alta atividade lipolítica. Esta atividade pode ser modulada na presença de ativadores como Fe^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} ou de inibidores como EDTA, Fe^{3+} , Zn^{2+} e SDS. A atividade lipolítica obtida frente a incubação com solventes como éter dietílico, *n*-heptano e *n*-hexano também ressaltam o potencial destas lipases para processos de catálise em ambientes não convencionais. Assim, novos

estudos devem ser conduzidos a fim de determinar a aplicabilidade tanto em reações de hidrólise quanto de síntese de ésteres.

Agradecimentos

Os recursos para esta pesquisa foram concedidos pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) por meio da Agência Brasileira de Inovação (FINEP) via Projeto DendePalm (13.01.0315.02). Agradecemos também a bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- AI, L.; HUANG, Y.; WANG, C. Purification and characterization of halophilic lipase of *Chromohalobacter* sp. from ancient salt well. **Journal of Basic Microbiology**. v. 58, p. 647-657. 2018.
- ALI, Y.; AHMAD, B.; ALGHAMDI, K.M.; KAMAL, T.; ALI, H.S.H.M.; ANWAR, Y.; HUSSAIN, A.; YOGEZAL, N.U. Characterization of recombinant cold active lipase from a novel *Pseudomonas* spp. MG687270. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 22, p. 855-865. 2019.
- BORAN, R.; UGUR, A.; SARAC, N.; CEYLAN, O. Characterization of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. **3 Biotechnololy**. v. 9, p. 5. 2019.
- BORKAR, P.S.; BODADE, R.G.; RAO, S.R.; KHOBRAGADE, C.N. Purification and characterization of extracelular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 140, p. 358-366. 2009.
- CHEN, L.; KONG, X.; LIANG, Z.; YE, F.; YU, K.; DAI, W.; WU, D.; LUO, C.; JIANG, H. Theoretical study of the mechanism of proton transfer in the esterase EstB from *Burkholderia gladioli*. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 115, p. 131019-131025. 2011.
- DEMERA, L.L.; BARAHONA, P.P.; BARRIGA, E.J.C. Production, extraction and characterization of lipases from the Antarctic Yeast *Guehomyces pullulans*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 15, p. 75-82. 2019.
- DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid-state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 1042-1050. 2006.
- ESAKKIRAJ, P.; ANTONYRAJ, C.B.; MELEPPAT, B.; ANKAIAH, D.; AYYANNA, R.; AHAMED, S.I.B.; ARUL, V. Molecular characterization and application of lipase from *Bacillus* sp. PU1 and investigation of structural changes based on pH and temperature using MD simulation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 103, p. 47-56. 2017.
- IVANCIC, M.; VALINGER, G.; GRUBER, K.; SCHWAB, H. Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. **Journal of Biotechnology**. v. 129, p. 109-122. 2007.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 555-569. 2012.
- KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S.K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**. v. 120, p. 300-304. 2012.
- MALEKABADI, S.; BADOEI-DALFARD, A.; KARAMI, Z. Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 109, p. 389-398. 2018.
- OSKOLKOVA, O.V.; HERMETTER, A. Fluorescent inhibitors reveal solvent-dependent micropolarity in the lipid binding sites of lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1597, p. 60-66. 2002.
- SAHOO, R.K.; SUBUDHI, E.; KUMAR, M. Quantitative approach to track lipase producing *Pseudomonas* sp. S1 in nonsterilized solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**. v. 58, p. 610-616. 2014.
- STOYANOVA, M.; PAVLINA, I.; MONCHEVA, P.; BOGATZEVSKA, N. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**. v. 21, p. 306-310. 2017.

SUN, S.Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 2607-2612. 2009.

TRAN, D.T.; CHANG, J.S. Kinetics of enzymatic transesterification and thermal deactivation using immobilized *Burkholderia* lipase as catalyst. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37, p. 481-491. 2014.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**. v. 138, p. 663-670. 1979.

ZHU, J.; LIU, Y.; QIN, Y.; PAN, L.; LI, Y.; LIANG, G.; WANG, Q. Isolation and characterization of a novel bacterium *Burkholderia gladioli* Bsp-1 producing alkaline lipase. **Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 29, p. 1043-1052. 2019.