



ARTÍCULO ORIGINAL

Producción de lipasas por bacterias aisladas de efluente de productos lácteos

Lipases productions by bacterial isolate from dairy products effluents

María E. Carballo¹, Dina N. Chicapa², Armando Martínez¹, Irina Salgado¹, Lizandra Pérez¹, Mario Cruz¹, Carlos Guillen³, Alma L. Soria⁴ y Yolanda Garza⁴

¹ Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

² Universidad Agustino Neto. Instituto superior de Ciencias de la Educación de Huambo. Angola

³ Fábrica de Helados Coppelia, La Habana, Cuba

⁴ Departamento de Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. México

* Autor para correspondencia:

mecarballo@fbio.uh.cu

RESUMEN

El interés por las lipasas microbianas ha crecido significativamente debido a su acción catalítica en la hidrólisis de aceites y grasas, los cuales constituyen contaminantes de las aguas residuales de diferentes procesos industriales. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la producción de lipasas y el efecto de diferentes factores (tiempo de incubación, pH y temperatura) sobre la actividad lipolítica en bacterias aisladas de efluentes lácteos. Se utilizó el medio Agar-Tween 80 para el aislamiento bacteriano, en la determinación de la actividad lipolítica y en la selección de los aislados promisorios. Se evaluó la cinética de producción de las lipasas de 24 a 120 h, así como la influencia del pH inicial en el medio (6,5; 7,5; 8,5) y de la temperatura de incubación (27°C, 37°C, 47°C). Los resultados indicaron que los efluentes ricos en contaminantes lipídicos constituyen fuentes adecuadas para aislar los microorganismos de interés. El 16 % de los aislados produjeron lipasas e incrementaron su actividad lipolítica en el tiempo. El pH y la temperatura influyeron en la actividad enzimática y los valores de estos factores ambientales, que favorecieron el incremento de la producción de la enzima, dependieron del tipo de microorganismos y del tiempo de incubación. El 36,4 % de los aislados positivos pudieran ser aplicados en el tratamiento de residuos contaminados con grasas, debido a su actividad lipolítica.

Palabras clave: lipasas, actividad lipolítica, bacterias

ABSTRACT

Interest to microbial lipases has grown significantly due to their catalytic action in the hydrolysis of oils and fats, which are pollutants in the effluents of different industrial processes. The main goal of this work was to evaluate the lipase and the effect of different factors (incubation time, medium pH, temperature) on lipolytic activity in bacterial isolated from lactic effluents. Tween-80 Agar medium was utilized for the bacterial isolation, in the determination of the enzymatic activity and in the selection of the promissory isolates. The kinetic of lipase production, the influence of initial medium pH

Recibido: 2016-10-29

Aceptado: 2017-03-18

(6.5, 7.5, 8.5) and the incubation temperature (27°C; 37°C; 47°C) were determined from 24 to 120 h. The results demonstrated that the effluents with high level of lipid pollutions are a convenient source to find microorganisms with potentialities in the lipase production. The 16 % of the bacterial isolates showed positive reaction to the enzyme production and increased their lipolytic activity during the incubation time. The pH and the temperature had an effect on the enzymatic activity, the optimal values of these factors in the production of the enzyme, depended of the type of microorganisms and their kinetics production. The 36.4 % of positive bacteria could be employed in the wastewaters treatment containing oil, due to their lipolytic activity.

Keywords: lipases, lipolytic activity, bacteria

INTRODUCCIÓN

Los residuos lácteos se caracterizan por presentar niveles elevados de aceites y grasas que tienen un bajo coeficiente de biodegradabilidad (Prasad y Manjunath, 2011), cuyo vertimiento en suelos y aguas provoca la contaminación y el deterioro de estos ecosistemas. Estos contaminantes lipídicos en aguas superficiales pueden formar películas que provocan condiciones de bajas tensiones de oxígenos e incluso anóxicas que afectan la biota acuática (Cipinyte *et al.*, 2009). Además, constituyen componentes atrayentes de plagas con consecuencias para la salud pública (Chin *et al.*, 2010).

Actualmente, la aplicación de tratamientos convencionales a efluentes residuales para la biodegradación de lípidos es insuficiente, debido a las características hidrofóbicas de estos contaminantes que mantiene restringida su eliminación (Saranya *et al.*, 2014). Una alternativa biotecnológica para mitigar los impactos negativos asociados a la contaminación por aceites y grasas, constituye la tecnología de hidrólisis enzimática, especialmente la relacionada con las lipasas microbianas (Liu *et al.*, 2012).

Las enzimas lipasas catalizan la hidrólisis de los triacilglicéridos insolubles (grasas y aceites) para generar ácidos grasos libres y glicerol (Ferreira-Dias *et al.*, 2013) y tienen amplia especificidad por el sustrato (Spohner *et al.*, 2015). Estas características las convierte en agentes eficientes para disminuir la concentración de lípido presentes en aguas residuales (Dors *et al.*, 2013). Los microorganismos constituyen una fuente renovable de enzimas lipasas en cantidades abundantes, con estabilidad y actividades catalíticas diversas en corto tiempo (Navarro-González y Periaño, 2012; Lee *et al.*, 2013).

La producción de lipasas microbianas depende de factores ambientales, tales como temperatura, pH, sales minerales, fuentes de carbono, nitrógeno y de

oxígeno, así como del tipo de microorganismo. Entre los géneros bacterianos con actividad lipolítica se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* y *Enterobacter* (Aceves y Castañeda, 2012; Facchin *et al.*, 2013).

La demanda de biotecnologías específicas y limpias para la hidrólisis de compuestos lipídicos es alta, por lo que la búsqueda de lipasas microbianas para hidrolizar compuestos complejos como las grasas constituye una necesidad. Como precedente a la aplicación de estas estrategias biotecnológicas, una significativa atención lo ha merecido el aislamiento y caracterización de aislados microbianos con actividad lipolítica. Consecuentemente, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de lipasas y el efecto de diferentes factores (tiempo de incubación, pH y temperatura) sobre la actividad lipolítica en bacterias aisladas de efluentes lácteos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento bacteriano

A partir de trampas colectoras de los efluentes de la Fábrica de Helados Coppelia, ubicada en la avenida Independencia, municipio Boyeros, La Habana, Cuba. Se colectaron muestras en recipientes de 10 L, que se introdujeron a una profundidad de aproximadamente 50 cm. El tipo de muestra colectada por trampa fue el siguiente: Trampa I- agua, Trampa II y Trampa III- agua y sedimento-grasa. Las muestras fueron homogenizadas y diluidas en solución fisiológica desde 10^{-1} a 10^{-10} . De cada dilución se inocularon 100 μ L, diseminados con espátula de Drigalsky, en placas con el medio de cultivo Agar-Tween 80 a pH 7,5 e incubadas a 37°C por 48 h. Las colonias que crecieron se caracterizaron morfológicamente y tinteóticamente, a través de tinción de Gram con la ayuda del

microscopio óptico de campo claro y aumento de 1000 x. A todos los aislados se les comprobó la pureza y fueron conservados en Agar nutriente a 4°C en refrigeración.

Evaluación de la producción de lipasas en los aislados bacterianos

A partir de un crecimiento en Agar nutriente por 24 h a 37°C, los aislados se inocularon por punción en placas Petri con el medio Agar-Tween 80 y se incubaron a pH 7,5 y 37°C, a las 24 y 48 h. Se determinó el halo de hidrólisis por el cálculo del diámetro de la zona opaca alrededor de la colonia, debido a la reacción de precipitación de los ácidos grasos libres con el CaCl_2 presente en el medio de cultivo (Almeida y Augusto, 2012). Se seleccionaron los aislados que presentaron halos de hidrólisis ≥ 1 mm, como reacción positiva a la producción de lipasas (Silveira *et al.*, 1999).

Determinación del tiempo de incubación en la producción de lipasa

El diámetro del halo de hidrólisis formado alrededor de las colonias se determinó cada 24 h hasta 120 h. Se seleccionaron los aislados que presentaron actividad lipolítica con halos ≥ 5 mm (Goldbeck y Filho, 2013), en al menos uno de los tiempos analizados. Las condiciones de pH y temperatura fueron similares a las establecidas en el aislamiento bacteriano.

Efecto del pH sobre la actividad lipolítica

El efecto del pH sobre la producción de lipasas se evaluó en medio Agar-Tween 80 a diferentes pH iniciales (6,5; 7,5 y 8,5), ajustado mediante el uso de NaOH 1M o HCl 1M. Las placas se incubaron a 37°C durante 120 h y cada 24 h se evaluó cualitativamente la actividad enzimática.

Efecto de la temperatura sobre la actividad lipolítica

Se inocularon los aislados seleccionados por punción en placas con Agar-Tween 80 a pH 7,5 y se incubaron a diferentes temperaturas (27°C; 37°C y 47°C). Se midió el halo de precipitación para la determinación cualitativa de la actividad enzimática cada 24 h hasta 120 h.

Análisis estadísticos

Se aplicó ANOVA de clasificación simple a los datos obtenidos (diámetro de halos de hidrólisis en mm) en los experimentos del efecto del pH y la temperatura, para cada tiempo analizado por microorganismo.

Para la determinación de la significación estadística de los resultados se aplicó la prueba de Tukey a posteriori, mediante la comparación de medias con un nivel de significación de $p < 0,05$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó el programa estadístico Statistica versión 6.1 para Windows.

RESULTADOS

Caracterización morfo-tintorial de los aislados bacterianos

La Fig. 1 muestra el porcentaje correspondiente a cada morfología celular en relación con la respuesta a la tinción de Gram de las 68 colonias que crecieron a partir del aislamiento microbiano. Entre todos los aislados predominaron las bacterias Gram positivas (91,17 %), representadas en tres grupos morfológicos diferentes, y en general resultaron mayoría las que exhibieron una morfología bacilar (93,54 %).

Determinación de la actividad lipasa en los aislados bacterianos

De los 68 aislados bacterianos, 11 (16 %) formaron halos de hidrólisis del sustrato ≥ 1 mm de diámetro hasta las 48 h de incubación. El diámetro de estos halos, alrededor de las colonias, permitió clasificar a estas bacterias como positiva a la producción de enzimas lipasas. Estos resultados, así como la caracterización morfo-tintorial de cada aislado seleccionado, se muestran en la Tabla 1.

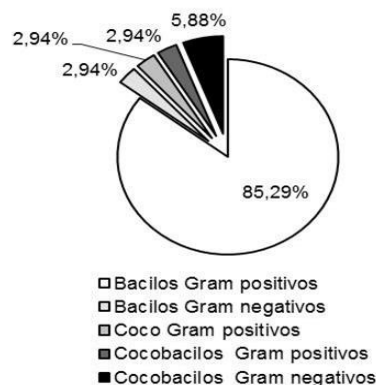


Figura 1. Caracterización morfológica y tintorial de los aislados bacterianos procedentes de efluentes de productos lácteos.

Figure 1. Morphological and Gram stain characterization of bacterial isolated from dairy product effluents.

Tabla 1. Aislados bacterianos seleccionados por su actividad lipolítica en medio Agar-Tween 80.**Table 1.** Bacterial isolates selected by their lipolytic activity on Tween-80 Agar medium

Aislados lipolíticos	Halo de hidrólisis (diámetro en mm)		Morfología	Respuesta a la Tinción de Gram
	24h	48h		
DT1-1	1	3	Bacilar	Gram positiva
DT1-17	1	3	Bacilar	Gram positiva
DT1-21	2	4	Bacilar	Gram positiva
DT1-23	1	4	Bacilar	Gram positiva
DT1-24	1	1	Cocobacilo	Gram negativa
DT1-25	3	5	Bacilar	Gram positiva
DT2-H	2	8	Bacilar	Gram positiva
DT2-J	1	2	Bacilar	Gram negativa
DT3-3	1	1	Bacilar	Gram positiva
DT3-5E	1	2	Bacilar	Gram positiva
DT3-17	1	1	Bacilar	Gram positiva

DT1- Bacterias aisladas de la trampa de grasa I, DT2- bacterias aisladas de la trampa de grasa II, DT3- bacterias aisladas de la trampa de grasa III.

DT1-bacterial isolated from fat trap I, DT2- bacterial isolated from fat trap II, DT3 bacterial isolated from fat trap III.

Influencia del tiempo de incubación en la producción de lipasas

La influencia del tiempo de incubación en la producción de la enzima se determinó en ocho de los aislados bacterianos, siguiendo como criterio de selección el incremento en el diámetro de hidrólisis del sustrato entre 24 y 48 h (datos presentados en la Tabla 1). En la Fig. 2 se observa que la actividad lipasa aumentó hasta las 72 h, comportamiento que posteriormente tienden a estabilizarse o a manifestar ligeros aumentos. Además, que los aislados DT1-1, DT1-21, DT1-25, DT1-23, DT2-J y DT2-H alcanzaron halos de hidrólisis en el medio Agar Tween 80 ≥ 5 mm durante las 120 h de incubación, lo que sustentó su selección, según criterio de Goldbeck y Filho en el 2013.

Influencia del pH en la producción de lipasas

La variación del pH inicial en el medio de cultivo influyó sobre la actividad lipolítica. El análisis estadístico aplicado a los diámetros de halos de hidrólisis (Fig. 3) muestra el efecto de este factor abiótico en cada uno de los tiempos de producción de las enzimas, con excepción del aislado DT1-21 a las 72 h de incubación (gráfico B). El pH 8,5 resultó más significativo en los aislados DT1-25, DT2-H, DT1-1 y DT1-23, en correspondencia con la mayor actividad lipolítica, la que a su vez no mostró diferencias

significativas con la detectada a pH 7,5 para los dos últimos aislados a las 120 y 72 h de producción de las lipasas. Un comportamiento diferente se pudo observar en la cepa DT2-J que alcanzó la mayor

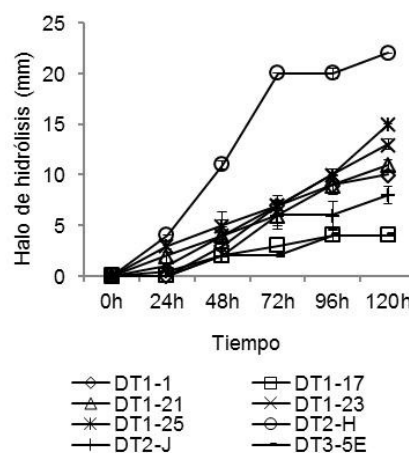


Figura 2. Producción de lipasas bacterianas a diferentes tiempos de incubación. Medio con pH inicial-7,5 y temperatura de incubación-37°C. Barras de error representan desviación estándar de tres repeticiones por tiempo para cada microorganismo (n=3).

Figure 2. Bacterial lipases production at different incubation times. Culture medium with initial pH-7.5 and incubation temperature-37° C. Error bars represent the standard deviation of three repetition by time, for each microorganisms (n=3).

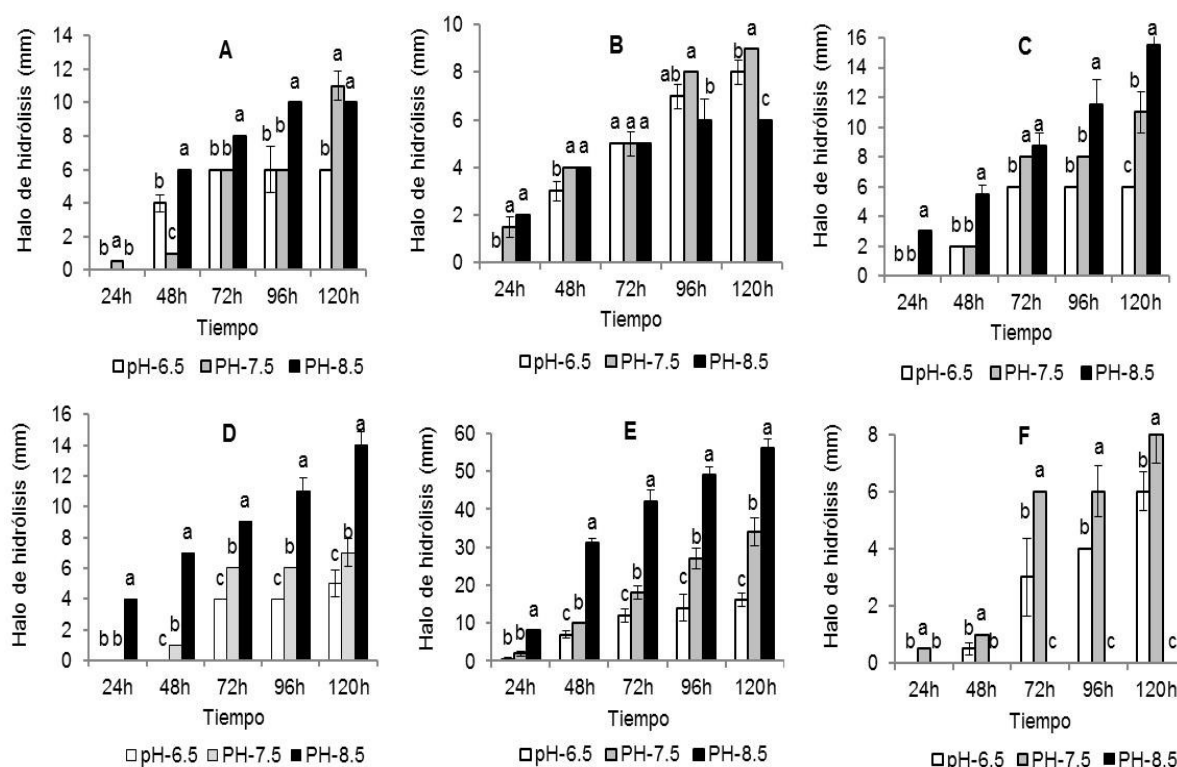


Figura 3. Producción de lipasas bacterianas a diferentes pH iniciales en el medio de cultivo. Temperatura de incubación-37°C. (A)- aislado DT1-1, (B)- aislado DT1-21, (C)-aislado DT1-23, (D)-aislado DT1-25, (E)-aislado DT2-H, (F)-aislado-DT2-J. Barras de error representan desviación estándar de tres repeticiones por tiempo para cada pH (n=3). Se aplicó ANOVA de clasificación simple para cada tiempo analizado por microorganismo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los diámetros de halos de hidrólisis de los diferentes pH para $p < 0,05$, según la prueba estadística Tukey *a posteriori*.

Figure 3. Bacterial lipase production at different pH in the culture medium. Incubation temperature- 37° C. (A)-isolate DT1-1, (B)- isolate DT1-21, (C)- isolate DT1-23, (D)- isolate DT1-25, (E)- isolate DT2-H, (F)- isolate DT2-J. Error bars represent standard deviation of three samples by time, for each pH (n=3). ANOVA test of simple classification was applied for each time examined by microorganism. Different letters indicate significant differences between the diameters of hydrolysis halos at different pH ($p < 0.05$, statistical test Tukey *a posteriori*).

producción de la enzima a pH 7,5, actividad enzimática que fue inhibida en medio alcalino.

Influencia de la temperatura en la producción de lipasas

La actividad lipolítica de los microorganismos a diferentes temperaturas se indica en la Fig. 4, donde se muestra que los mayores diámetros de los halos (media de tres réplicas) se alcanza a las temperaturas de 27 o 37°C en los seis aislados bacterianos, los cuales difieren estadísticamente del resto. Se destaca que el

efecto de este parámetro sobre la producción de la enzima varió en función del tiempo en los aislados DT₁-1, DT₁-23 y DT₂-J, mientras que una mayor estabilidad en la actividad lipolítica se logra en los aislados DT₁-21, DT₂-H y DT₁-25, a partir de las 48, 72 y 96 h de producción de las lipasas, respectivamente. El gráfico C, correspondiente al aislado DT1-23 evidenció que a 27°C no se produjo actividad lipolítica. Además, con excepción de este aislado a las 96 h, la capacidad lipolítica en todos los aislados fue menor o nula a 47°C, resultados confirmados por los análisis estadísticos.

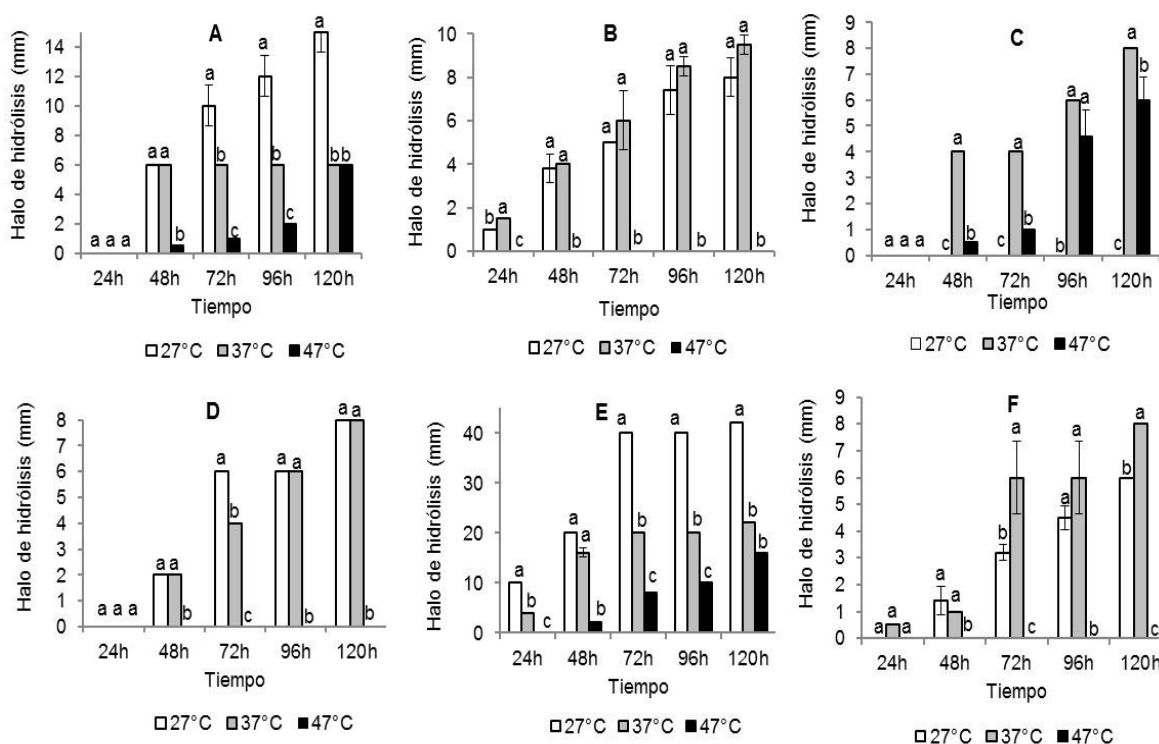


Figura 4. Producción de lipasas bacterianas a diferentes temperaturas. Medio de cultivo con pH inicial 7,5. (A)-aislado DT1-1, (B)-aislado DT1-21, (C)-aislado DT1-23, (D)-aislado DT1-25, (E)-aislado DT2-H, (F)-aislado DT2-J. Barras de error representan desviación estándar de tres repeticiones por tiempo para cada temperatura ($n=3$). Se aplicó ANOVA de clasificación simple para cada tiempo analizado por microorganismo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los diámetros de halos de las diferentes temperaturas para $p < 0,05$, según la prueba estadística Tukey *a posteriori*.

Figure 4. Bacterial lipases production at different temperatures. Culture medium with initial pH-7.5 (A)-isolate DT1-1, (B)-isolate DT1-21, (C)-isolate DT1-23, (D)-isolate DT1-25, (E)-isolate DT2-H, (F)-isolate DT2-J. Error bars represent standard deviation of three samples by time, for each temperature ($n=3$). ANOVA test of simple classification, for each time by microorganisms, was applied. Different letters indicate significant differences between the halos' diameters at different temperatures ($p < 0.05$, statistical test Tukey *a posteriori*).

DISCUSIÓN

Las diferentes morfologías celulares detectadas indican la diversidad microbiana presente en los efluentes lácteos, los que contienen materia orgánica e inorgánica, nutrientes que propician que sean hábitats favorables para la proliferación de microorganismos. La presencia de bacterias heterótrofas en aguas residuales ha estado bien sustentado en la literatura (Eze y Okpokwasili, 2010; Omiema *et al.*, 2012).

El tamizaje primario evidencia la presencia, en las bacterias seleccionadas, de sistemas enzimáticos para la degradación de compuestos lipídicos. Además, este permitió constatar que los residuos de la industria

láctea, constituyen un hábitat favorable para el aislamiento de microorganismos productores de enzimas lipasas. Trabajos previos han informado de la efectividad de los residuales de producciones de aceites vegetales como fuente de aislamiento de microorganismos lipolíticos (Prasad y Manjunath, 2011, 2012; Veerapagu *et al.*, 2013). Las diferencias en el diámetro de halo de hidrólisis del sustrato (Tabla 1) pueden estar relacionadas con la cantidad de lipasa extracelular, con la estabilidad de la enzima y su afinidad por el sustrato, o con la combinación de dos o más de estos factores (Cardenas *et al.*, 2001; Goldbeck y Filho, 2013), los que a su vez dependen del tipo de cepa bacteriana.

El comportamiento cinético de la producción microbiana de lipasas puede ser debido a la estabilidad de las enzimas, aun cuando la concentración de Tween 80 en el medio de cultivo pudiera constituir un factor limitante para el crecimiento celular. Anteriormente se planteó que la actividad metabólica bacteriana ante un sustrato lipídico en tiempos prolongados de incubación, constituye una alternativa de supervivencia celular (Nagarajan *et al.*, 2014). Sin embargo, investigaciones realizadas con *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. mostraron que la actividad lipolítica tiende a disminuir en el tiempo, debido al agotamiento de la fuente de carbono (Tembhurkar *et al.*, 2012). Las diferencias de los microorganismos en cuanto a la síntesis y excreción de las enzimas lipasas, pueden ser fundamentadas por causas tales como la propia especie o cepa microbiana, las características del cultivo y de su crecimiento (Almeida y Augusto, 2012), así como por el tipo de inductor enzimático utilizado (Hasan-Beikdashti *et al.*, 2012).

La capacidad de los aislados bacterianos de producir lipasas a los tres valores de pH ensayados es coincidente con otras investigaciones que refieren la producción de enzimas lipolíticas por diferentes especies microbianas, en un rango de pH de 4 a 11 (Ghosh *et al.*, 1996). La síntesis y excreción de estas enzimas a pH ácidos se ha demostrado en *Aeromonas sobria*, cultivada en un medio con leche cruda a pH 6,0 (Lotrakul y Dharmsthi, 1997), en *Rhodococcus* sp. a pH 5,0, valor que le permitió alcanzar el 96,6 % de la actividad enzimática (Nagarajan *et al.*, 2014), así como en *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis*, bacterias que presentaron una máxima actividad lipolítica a pH 1,0 (Saranya *et al.*, 2014). Otros autores han determinado que el valor de pH 7,0 favorece la actividad lipolítica en diferentes bacterias (Prasad y Manjunath, 2012). Investigaciones posteriores, indicaron que el pH neutro resultó óptimo para la síntesis de la enzima por *Pseudomonas gessardii*, la que disminuyó su producción a valores de pH superiores (Veerapagu *et al.*, 2013). La preferencia por el pH alcalino (8,5) en varias de las aislados bacterianos, pudiera estar relacionado con la inducción que este potencial de hidrógeno ejerce sobre la secreción de lipasas para la degradación del sustrato lipolítico y garantizar la energía metabólica necesaria para la proliferación celular, si se tiene en cuenta que el pH del residual utilizado para el aislamiento presentó un valor promedio de este parámetro de 6,1. En trabajos previos se comprobó en diferentes bacte-

rias, procedentes de ambientes naturales, actividad lipasa a valores de pH alcalino. Entre las mismas se destacó una cepa de *Bacillus*, que presentó la mayor actividad de la enzima a pH 8,0. Este valor de pH resultó efectivo para la máxima actividad de síntesis y excreción de enzimas lipolíticas en *Pseudomonas* spp., aisladas de sedimentos de aguas residuales (Kathiravan *et al.*, 2012) y en particular de efluentes contaminados con aceites (Reyhamah *et al.*, 2013).

Las variaciones en la hidrólisis del sustrato, ocasionadas por la temperatura van a depender de las características intrínsecas de cada microorganismo, de la acción de este factor sobre la secreción de enzimas extracelulares, al poder cambiar las propiedades físicas de la membrana celular (Veerapagu *et al.*, 2013). Además, este factor puede influir sobre el estado físico del sustrato y consecuentemente en la especificidad enzima-sustrato. La ausencia de actividad lipolítica detectada a 47°C en los aislados DT1-21, DT1-25 y DT2-J, puede ser explicada por la ausencia de crecimiento celular a consecuencia, posiblemente, de la acción de esta temperatura sobre los procesos de nutrición y metabólicos. Otras investigaciones refieren que las lipasas microbianas son producidas en un rango amplio de temperatura, que comprenden valores adecuados para el crecimiento celular y la máxima producción de la enzima (Tembhurkar *et al.*, 2012).

El tamizaje de bacterias de efluentes contaminados con grasas, constituye una vía simple para la selección de bacterias productoras de enzimas lipasas con capacidad de hidrolizar carbonos lipídicos. Estos microorganismos constituyen fuentes renovables promisorias para su uso en la biorremediación de residuales lácteos. El ajuste de factores como el pH y la temperatura determina las mejores condiciones ambientales para la actividad lipolítica microbiana y propicia incrementos en la producción de lipasas, dependiendo de la cepa bacteriana y de la cinética de producción.

LITERATURA CITADA

- Aceves, A.E. y L.M. Castañeda (2012) Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae* 19:244-247.
- Almeida, M.V. y N.L. Augusto (2012) Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. *Ciênc. Agrár.* 33:333-342.

- Cardenas, J., E. Álvarez, M.S. de Castro-Álvarez, J.M. Sánchez-Montero *et al.* (2001) Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 14:111-123.
- Chin, S.P., N.S. Ismail, A.A. Al-Ashraf y R.M. Yahya (2010) Aerobic degradation of volatile fatty acids by bacterial strain Isolated from rivers and cow farm in Malaysia. *J. Bioremed. Biodegrad.* 1:1-6.
- Cipinyte, V., S. Grigiskis y E. Baskys (2009) Selection of fat degrading microorganisms for the treatment of lipid contaminated environment. *Biologija* 55:84-92.
- Dors, G., A.A. Mendes, E.B. Pereira, H. Castro *et al.* (2013) Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid rich wastewater from poultry industry. *Appl. Water Sci.* 3:343-349.
- Eze, V.C. y G.C. Okpokwasili (2010) Microbial and other related changes in Niger Delta river sediment receiving industrial effluents. *Continental J. Microbiology* 4:15-24.
- Facchin, S., P.D.D. Alves, F.D.F. Siquiera, T.M. Barocca *et al.* (2013) Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. *Open J. Ecology* 3:34-47.
- Ferreira-Dias, S., G. Sandoval, F. Plou y F. Valero (2013) The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron. J. Biotechnol.* 16.
- Ghosh, P.K., R.K. Saxena, R. Gupta y R.P. Yadav (1996) Davidson WS. Microbial lipases: production and applications. *Sci. Prog.* 79:119-157.
- Goldbeck, R. y M. Filho (2013) Screening, characterization, and biocatalytic capacity of lipases producing wild yeasts from Brazil biomes. *Food Sci. Biotechnol.* 22:79-87.
- Hasan-Beikdashti, M., H. Forootanfar, M.S. Safiaria, A. Ameri *et al.* (2012) Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Taiwan Inst. Chem. E.* 43:670-677.
- Kathiravan, T., J. Marykala, A. Sundaramanickam, S. Kumaresan *et al.* (2012) Studies on nutritional requirements of *Pseudomonas aeruginosa* for lipase production. *Adv. App. Sci. Res.* 3:591-598.
- Lee, M.H., K.H. Oh, C.H. Kang, J.M. Kim *et al.* (2013) Novel meta-genome-derived, cold adapted alkaline phospholipase with superior lipase activity as an intermediate between phospholipase and lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* 14:4959-66.
- Liu, X., K. Bolla, E.J. Ashforth y Zhuo *et al.* (2012) Systematics guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:55-66.
- Lotrakul, P. y S. Dhamsthi (1997) Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *J. Biotechnol.* 54:113-120.
- Nagarajan, J., N.M. Nawawi y I.L. Abdul (2014) *Rhodococcus* UKMP-5M, an endogenous lipase producing actinomycete from Peninsular Malaysia. *Biology Cellular and Molecular Biology* 69:123-132.
- Navarro-González, M. y J. Periago (2012) Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. *AN. VET.* 28:45-65.
- Omiema, S., T.J.K. Ideriah y D.N. Ogonna (2012) Distribution of heavy metals in water and sediment along Abonnenma shoreline. *Nigeria. Resources and Environment* 2:33-40.
- Prasad, M.P. y K. Manjunath (2011) Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian. J. Biotechnol.* 10:121-124.
- Prasad, M.P. y K. Manjunath (2012) Effect of media and process parameters in the enhancement of extracellular lipase production of bacterial isolates from industrial effluents. *Internat. J. Microbiol. Research* 4:308-311.
- Reyhameh, N., F. Tabandeh, P. Shariati y M. Otad (2013) Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp. *Iran J. Microbiol.* 5:422-427.
- Saranya, P., K.H. Sukanya, M. Jothieswari, R.B. Prasad *et al.* (2014) Novel extremely acidic lipases produced from *Bacillus* species using oil substrates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41:9-15.
- Silveira, I.A., E.P. Carvalho, D. Teixeira y B.E.B. Barrios (1999) Verificación de las actividades proteolíticas de la flora microbiana aislada de la leche cruda Tipo B refrigerada. *Microorganismos psicrotróficos. Rev. Latinoam. de Microbiología* 41:85-90.
- Spohner, S.C., H. Muller, H. Quitmann y P. Czernak (2015) Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J. of Biotechnology* 1-17.
- Tembhurkar, V.R., M.B. Kulkarni y S.A. Peshwe (2012) Optimization of lipase production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture. *Sci. Res. Rep.* 2:46-50.
- Veerapagu, M.A., N. Sankar, K. Ponmurugan y K.R. Jeya (2013) Screening selection, identification, production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6:62-67.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Annia Hernández