



Estado do Paraná

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E  
IMOBILIZAÇÃO EM ESFERAS DE QUITOSANA**

**Mairim Dahm da Silva**

Toledo – Paraná – Brasil

2024



Estado do Paraná

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E  
IMOBILIZAÇÃO EM ESFERAS DE QUITOSANA**

**Mairim Dahm da Silva**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Dra Cleide Viviane Buzanello  
Coorientadora: Dra Maria Luiza Fernandes Rodrigues

MARÇO/2024

Toledo – PR

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Dahm da Silva, Mairim

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E IMOBILIZAÇÃO EM ESFERAS DE QUITOSANA / Mairim Dahm da Silva; orientadora Cleide Viviane Buzanello; coorientadora Maria Luiza Fernandes Rodrigues. -- Toledo, 2024.

28 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2024.

1. Enzima microbiana. 2. Wickerhamiella osmotolerans. 3. Imobilização enzimática. 4. Glutaraldeído. I. Buzanello, Cleide Viviane, orient. II. Fernandes Rodrigues, Maria Luiza, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Mairim Dahm da Silva**

**“OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E IMOBILIZAÇÃO EM ESFERAS DE  
QUITOSANA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleide Viviane Buzanello  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia R. Fagundes Klen

---

Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches

Aprovada em: 01 de março de 2024.  
Local de defesa: Auditório do Gerpel

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a Deus pela orientação, força e inspiração que me concedeu ao longo desta jornada. Sua graça e orientação foram fundamentais em cada passo deste caminho.

Agradeço aos meus pais, Hermínio e Miriam, à minha irmã, Maysa, e demais integrantes da minha família, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente em todos os desafios que enfrentei. Cada palavra de incentivo e gesto de carinho fortaleceu minha determinação e me deu a confiança necessária para seguir em frente.

Ao Gustavo Dal Bosco, por ser minha rocha durante este processo. Sua paciência, apoio inabalável e amor infinito foram meu porto seguro nos momentos de dúvida e cansaço. Agradeço à família Dal Bosco, pela acolhida calorosa, apoio constante e por fazerem-me sentir parte de sua família.

À minha orientadora Dra. Cleide Buzanello e coorientadora Dra. Maria Luiza Rodrigues, por sua orientação sábia, apoio incansável e crença em meu potencial. Suas sugestões valiosas e orientações precisas moldaram este trabalho e enriqueceram minha experiência acadêmica.

À doutoranda Jéssyca Carvalho pelas incontáveis horas em laboratório, me ensinando e ajudando em todas as etapas, compartilhando risadas, conselhos e momentos especiais ao longo deste percurso. Às professoras Marcia Klen e Rosemeire de Lucca, expresso meu profundo agradecimento por seu apoio e contribuições durante este trabalho. Ao técnico laboratorial Fernando Dressler pela colaboração. Agradeço aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCA e a todos os demais que de alguma forma contribuíram para este trabalho, o meu sincero agradecimento.

Agradeço também ao apoio financeiro da CAPES e CNPQ, que viabilizaram esta pesquisa e tornaram possível a realização deste estudo.

Agradeço a todos vocês por fazerem parte deste capítulo importante da minha vida. Cada um de vocês desempenhou um papel significativo, e por isso, este trabalho é tão meu quanto de vocês. Que nossos laços continuem a fortalecer-se, e que possamos compartilhar muitos mais momentos de alegria, aprendizado e sucesso juntos.

Com gratidão e carinho,

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS .....	6
RESUMO .....	9
1 Introdução.....	11
2 Materiais e métodos .....	11
2.1 Microrganismo e teste qualitativo da produção de lipase.....	11
2.2 Identificação molecular.....	12
2.3 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	12
2.3.1 Composição físico-química dos substratos.....	12
2.3.2 Cinética enzimática.....	12
2.3.3 Determinação da atividade lipolítica .....	13
2.3.4 Extração da lipase .....	13
2.4 Preparo da esfera de quitosana para imobilização .....	13
2.5 Imobilização da lipase no suporte.....	14
3 Resultados e discussão .....	14
3.1 Teste qualitativo da produção de lipase .....	14
3.2 Identificação molecular.....	15
3.3 Fermentação em estado sólido (FES) .....	15
3.3.1 Composição físico-química do substrato.....	15
3.3.2 Cinética de produção enzimática .....	16
3.3.3 Teor de umidade .....	18
3.3.4 Extração enzimática.....	19
3.3.5 Imobilização enzimática .....	20
4 Comentários finais.....	21
5 Referências .....	21

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

BHI – Brain Heart Infusion Broth  
FES – Fermentação em Estado Sólido  
FS – Fermentação em Estado Submerso  
FSG – Farelo de Semente de Girassol  
g – Grama  
g L<sup>-1</sup> – Grama por litro  
h – Hora  
IE – Índice Enzimático  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássico  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio dibásico anidro  
mg L<sup>-1</sup> – Miligrama por litro  
MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de magnésio  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mM – Milimolar  
m/v – Massa por volume  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
nm – Nanômetro  
pH – Potencial hidrogeniônico  
p/v – Peso por volume  
RFS – Resíduo de farelo de soja  
RFT – Resíduo de farelo de trigo  
rpm – Rotação por minuto  
ST – Sólidos totais  
v/v – Volume por volume  
YPD – Meio Extrato de Levedura Peptona Dextrose

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Teste qualitativo realizado com a levedura JC054, evidenciada pelo halo alaranjado, quando exposta a luz ultravioleta (366nm)..... 15
- Figura 2.** Cinética enzimática de produção de lipase utilizando a levedura *Wickerhamiella osmotolerans* JC054, por FES com diferentes substratos. .... 17
- Figura 3.** Produção de lipase por *Wickerhamiella osmotolerans* em diferentes teores de umidade e substrato. .... 18



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição físico-química dos substratos utilizados na FES.....	16
<b>Tabela 2.</b> Extração de lipase produzida por <i>Wickerhamiella osmotolerans</i> , do substrato sólido fermentado usando diferentes soluções. ....	19
<b>Tabela 3.</b> Rendimento de imobilização de lipase produzida por <i>Wickerhamiella osmotolerans</i> em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído. ....	20

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E IMOBILIZAÇÃO EM ESFERAS DE QUITOSANA

### RESUMO

SILVA, M. D. Otimização da produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais e imobilização em esferas de quitosana. 01 de março de 2024. 24f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, março de 2024.

As enzimas desempenham um papel fundamental em diversas indústrias, sendo as lipases especialmente importantes por catalisarem reações como a hidrólise de triglicerídeos. Este trabalho teve como objetivo promover a otimização da produção de lipase por meio de fermentação em estado sólido (FES), utilizando uma levedura isolada de ambiente aquático, com resíduos agroindustriais como substratos. A levedura JC054 foi identificada por métodos de biologia molecular, como *Wickerhamiella osmotolerans*, apresentando 100% de identidade com as sequências fúngicas depositadas no GenBank. A atividade lipolítica foi confirmada em meio sólido, contendo azeite de oliva e rodamina B, obtendo um índice enzimático (IE) de 3,7. Na FES, foram utilizadas diferentes proporções de substrato: FSG (farelo de semente de girassol - 100%); FSG/RFS (resíduo de farelo de soja - 50:50) e FSG/RFT (resíduo de farelo de trigo - 50:50), com umidade ajustada para 55% (tampão fosfato pH 7 e 50 mM). Na cinética enzimática, observou-se que atividade lipolítica atingiu o pico máximo em 48 h para todos os substratos testados. Nos estudos de umidade os teores variaram em 50%, 55% e 60%, onde o FSG alcançou sua atividade máxima a 55% ( $31,36 \pm 0,68 \text{ U g}^{-1}$ ), enquanto FSG/RFS e FSG/RFT mostraram atividade lipolítica ótima a 55% ( $18,44 \pm 0,86 \text{ U g}^{-1}$ ) e 50% ( $15,28 \pm 0,64 \text{ U g}^{-1}$ ), respectivamente. Na análise de extração enzimática, foram utilizadas as soluções extratoras na proporção 1:5 (p/v): NaCl (15 mM), Tampão Fosfato de Sódio (pH 7, 15 mM), NaCl/Tween 80 (15 mM, 0,5%) e Tampão Fosfato de Sódio/Tween 80 (15 mM, 0,5%). A solução extratora mais eficaz foi aquela composta por tampão fosfato de sódio/Tween 80, extraindo 88% das enzimas presentes no sólido fermentado. Para a imobilização enzimática, utilizou-se esferas de quitosana ativadas com 1% de glutaraldeído em tempos de 60, 120 e 180 min, a fim de determinar o melhor tempo de fixação da enzima. O melhor tempo para fixação se apresentou em 1 h com uma eficiência de imobilização de 29,32%. Este estudo contribui para o desenvolvimento de processos otimizados de produção de lipase por FES, destacando a importância do uso de resíduos agroindustriais como substratos e a imobilização da enzima em esferas de quitosana como uma estratégia promissora para aplicações industriais.

**Palavras-Chave:** Enzima microbiana, *Wickerhamiella osmotolerans*, imobilização enzimática, glutaraldeído.

## OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY SOLID-STATE FERMENTATION USING AGROINDUSTRIAL RESIDUES AND IMMOBILIZATION ON CHITOSAN BEADS

### ABSTRACT

SILVA, M. D. Optimization of lipase production by solid-state fermentation using agroindustrial residues and immobilization on chitosan beads. March 1, 2024. 24p. Dissertation (Master's Degree) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, March 2024.

Enzymes play a fundamental role in various industries, with lipases being especially important for catalyzing reactions such as triglyceride hydrolysis. This study aimed to optimize lipase production through solid-state fermentation (FES) using yeast isolated from aquatic environments, with agroindustrial residues as substrates. Yeast JC054 identified by molecular biology methods as *Wickerhamiella osmotolerans*, showing 100% identity with fungal sequences deposited in GenBank. Lipolytic activity confirmed in a solid medium containing olive oil and rhodamine B, obtaining an enzymatic index (EI) of 3.7. In SSF, different substrate proportions used: FSG (sunflower seed meal - 100%); FSG/RFS (soybean meal residue - 50:50); and FSG/RFT (wheat bran residue - 50:50), with humidity adjusted to 55% (pH 7 phosphate buffer and 50 mM). In enzymatic kinetics, lipolytic activity reached its maximum peak at 48 h for all tested substrates. In humidity studies, levels ranged from 50%, 55%, and 60%, where FSG reached its maximum activity at 55% ( $31.36 \pm 0.68 \text{ U g}^{-1}$ ), while FSG/RFS and FSG/RFT showed optimal lipolytic activity at 55% ( $18.44 \pm 0.86 \text{ U g}^{-1}$ ) and 50% ( $15.28 \pm 0.64 \text{ U g}^{-1}$ ), respectively. In enzymatic extraction analysis, extraction solutions used in a 1:5 (w/v) ratio: NaCl (15 mM), Sodium Phosphate Buffer (pH 7, 15 mM), NaCl/Tween 80 (15 mM, 0.5%), and Sodium Phosphate Buffer/Tween 80 (15 mM, 0.5%). The most effective extraction solution was composed of sodium phosphate buffer/Tween 80, extracting 88% of the enzymes present in the fermented solid. For enzymatic immobilization, chitosan beads activated with 1% glutaraldehyde used at 60, 120, and 180 min to determine the best enzyme fixation time. The best fixation time found to be 1 h with an immobilization efficiency of 29.32%. This study contributes to the development of optimized lipase production processes by FES, highlighting the importance of using agroindustrial residues as substrates and enzyme immobilization on chitosan beads as a promising strategy for industrial applications.

**Keywords:** Microbial enzyme, *Wickerhamiella osmotolerans*, enzymatic immobilization, glutaraldehyde.

## 1 Introdução

As enzimas, são catalisadores biológicos que oferecem uma solução mais adequada para acelerar reações químicas e biológicas [1]. Ao contrário dos catalisadores químicos convencionais, as enzimas são produzidas por processos biológicos em organismos vivos, resultando em produtos altamente seletivos e eficientes, sem a geração de produtos indesejáveis [2, 3]. Com os avanços da biotecnologia, as enzimas, especialmente as lipases, não apenas oferecem benefícios ambientais, mas também representam produtos de alto valor agregado, com uma previsão de crescimento significativo no mercado global, ultrapassando os US\$ 797,7 milhões até 2025 [4, 5]. As lipases possuem uma ampla aplicação na indústria devido às suas propriedades catalíticas versáteis [6].

Em contraste com os métodos tradicionais que utilizam substâncias alcalinas e metais como catalisadores, as lipases proporcionam uma alternativa mais sustentável, reduzindo os impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente [7]. As diversas aplicações industriais das lipases, impulsionaram o interesse por novas fontes de lipases e a seleção de novos microrganismos lipolíticos [8]. Dentre as principais fontes para obtenção de lipases, as leveduras ganham destaque devido seu maior rendimento em relação a produção enzimática [9]. Logo, as lipases microbianas são amplamente aplicadas nos processos industriais, podendo ser utilizadas na forma extracelular, intracelular, líquida, imobilizada ou livre [10].

Dentre as possibilidades de cultivo, a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS) são as abordagens utilizadas na produção de lipases [11]. A fermentação é um processo biológico que envolve a conversão de substratos complexos em moléculas mais simples por meio de diversos microrganismos [12]. A FES apresenta vantagens em relação à FS, pois permite o uso de resíduos agroindustriais de baixo custo, como substrato sólido, bem como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento dos microrganismos, além de ser uma alternativa promissora para mitigar problemas ambientais decorrentes do descarte inadequado de resíduos [13,14].

A vasta quantidade de resíduos agroindustriais gerados globalmente, estimada em cerca de 1,3 bilhão de toneladas anuais, destaca a importância de explorar esses recursos como substratos valiosos em processos fermentativos [13]. A riqueza nutricional desses resíduos oferece uma fonte alternativa e economicamente viável de carboidratos, fibras, proteínas e minerais, substituindo as fontes sintéticas tradicionalmente utilizadas [15].

As lipases imobilizadas têm sido utilizadas na indústria devido à sua estabilidade e capacidade de serem reutilizadas. Diversas estratégias de imobilização são empregadas, incluindo adsorção, encapsulamento, ligação covalente, aprisionamento e reticulação [16]. A escolha do método de imobilização depende das características específicas da aplicação. Além das técnicas de imobilização, os materiais de suporte desempenham um papel na eficácia do processo. Polímeros naturais, como a quitosana, são utilizadas como materiais de suporte devido às suas propriedades únicas, como biodegradabilidade, atoxicidade e capacidade bioadesiva [17], além de estabilidade térmica, boa reutilização e proteção eficaz contra diferentes condições operacionais [18].

Com isto, este estudo visa otimizar a produção de lipase por meio da FES, utilizando uma levedura isolada de ambiente aquático, como fonte de microrganismo lipolítico. Será investigada a influência da composição físico-química dos substratos e das condições ideais de cultivo para maximizar a produção enzimática. Além disso, será avaliada a extração da enzima do sólido fermentado e a imobilização da lipase em esferas de quitosana. Espera-se que esses esforços contribuam para o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis e eficientes no aproveitamento e tratamento de resíduos agroindustriais.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Microrganismo e teste qualitativo da produção de lipase

A levedura JC054 foi isolada do rio Toledo, uma região com impacto antrópico. A triagem dos microrganismos coletados foi realizada por Carvalho [19] e a levedura JC054 foi preservada a -20 °C em meio BHI-Glicerol. Atualmente está depositada na coleção de cultura de leveduras do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

(UNIOESTE). A atividade enzimática da levedura JC054 foi avaliada por meio de um teste qualitativo em placas de Petri.

O meio de cultura utilizado para o teste qualitativo (0,02% MgSO<sub>4</sub>, 0,01% NaCl, 0,04% extrato de levedura, 0,04% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% azeite de oliva extravirgem, 0,001% corante rodamina B e 0,01% Tween 80) foi autoclavado. A inoculação foi realizada por método pontual no meio lipase e realizadas em triplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 30 °C por 96 h, sendo a presença de um halo alaranjado fluorescente sob luz ultravioleta de 366 nm indicativa a produção de lipase pela levedura [20], seguido do cálculo do índice enzimático (IE). O IE foi calculado em relação ao diâmetro do halo de hidrólise e da colônia, seguindo a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis [21], com as medidas realizadas em milímetros utilizando um paquímetro digital.

## 2.2 Identificação molecular

A análise molecular foi conduzida seguindo a metodologia descrita por Brandão et al. [22]. Inicialmente, realizou-se a extração interna do DNA total. A identificação da levedura foi realizada através da amplificação do DNA total com os primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), que se ligam aos domínios D1-D2 na região 26S, um gene conservado utilizado para identificação de espécies [23].

Os produtos resultantes da purificação por PCR foram utilizados no sequenciamento, empregando um sequenciador automático MegaBACE TM 1000 (Amersham Biosciences, EUA). Para o processo de purificação, foram utilizados os seguintes componentes: 47,0 µL de amplicon, 11,75 µL de EDTA (125 mM) e 141 µL de etanol absoluto. O sequenciamento foi conduzido na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, MG, Brasil. As sequências de DNA obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank do Centro Nacional de Informações sobre biotecnologia (NCBI) por meio da ferramenta de busca de alinhamento local – BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) [24].

## 2.3 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A técnica de FES foi empregada para quantificar a capacidade de secreção de lipase pelo microrganismo em estudo.

### 2.3.1 Composição físico-química dos substratos

Os resíduos agroindustriais e seu processamento representam um desafio ao meio ambiente, uma vez que a maioria é atualmente queimada ou depositada no solo, resultando em poluição do ar e da água. Diante desse cenário, buscando aproveitar esse tipo de material, foram utilizados três substratos de origem vegetal para a fermentação em estado sólido: farelo de semente de girassol (FSG), resíduo de farelo de soja (RFS) e resíduo de farelo de trigo (RFT). O FSG foi adquirido no mercado local, enquanto o RFS e o RFT foram obtidos em uma indústria de produção de grãos no oeste do Paraná.

Os substratos foram processados, peneirados em partículas com tamanhos de 1,40 mm (12 mesh) e 2,00 mm (9 mesh), e secos em estufa a 50 °C por 24 h [25]. As análises físico-químicas foram conduzidas para avaliar a composição dos substratos e sua capacidade como indutora para a produção de lipase. Essa análise incluiu a determinação da umidade, cinzas, teor de óleos, proteínas e carboidratos, de acordo com os métodos da AOAC [26]. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.3.2 Cinética enzimática

A análise de cinética foi realizada em três ensaios para determinar o tempo ideal de crescimento do microrganismo, visando atingir os melhores índices de produção enzimática, seguindo a metodologia de Fernandes et al. [27]. Os ensaios foram conduzidos utilizando uma

mistura dos substratos em duas granulometrias e realizados em triplicata. No primeiro ensaio, foram utilizados FSG peneirado em mesh 9 e 12. No segundo ensaio, empregou-se uma mistura de 50% de FSG peneirado em mesh 12 e 50% de RFS peneirado em mesh 9. No terceiro ensaio, a mistura foi composta de 50% de FSG peneirado em mesh 12 e 50% de RFT peneirado em mesh 9.

A levedura foi ativada em Erlenmeyer contendo meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose), suplementado com 0,05% cloridrato de tetraciclina e incubada em estufa a 30 °C por 48 h. A concentração celular foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer em microscópio óptico, visando atingir uma concentração de  $10^8$  células por grama de substrato seco [28].

Após a preparação dos substratos e ajuste de umidade (55%), com uma solução fosfato a 50 mM e pH 7, os substratos foram autoclavados por 20 min a 121 °C. O inóculo foi então adicionado aos frascos Erlenmeyer com o substrato esterilizado. As amostras foram incubadas a 30 °C por 120 h e retiradas a cada 24 h para congelamento a -20 °C (interromper o crescimento e metabolismo da levedura). Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 30 °C por 48 h, trituradas, peneiradas e armazenadas a 4 °C, conforme descrito por Fernandes et al. [27]. O melhor resultado obtido na cinética enzimática foi utilizado como base para investigar o impacto do teor de umidade na fermentação, testando diferentes níveis de umidade (50%, 55% e 60%), com o objetivo de otimizar a atividade enzimática.

### **2.3.3 Determinação da atividade lipolítica**

A atividade lipolítica foi determinada titulando-se com o NaOH os ácidos graxos liberados pela enzima a partir dos triacilgliceróis, seguindo o método descrito por Rodrigues et al. [25]. O meio reacional, preparado como uma emulsão, consistia em tampão fosfato 50 mM pH 7,0, 10% de goma arábica e 7,15% de azeite de oliva como substrato (1 mM).

As amostras foram incubadas em shaker, a 150 rpm, por 20 min a 37 °C, contendo 1 g do sólido fermentado e 20 mL da emulsão para liberação dos ácidos graxos. A reação foi então interrompida pela adição de 20 mL de solução de etanol/acetona (v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (50 mM), utilizando fenolftaleína como indicador, até atingir pH 10.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades por grama ( $U\ g^{-1}$ ) de amostra, onde 1 U corresponde à liberação de 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto, conforme metodologia utilizada por Rodrigues et al. [25].

### **2.3.4 Extração da lipase**

Diferentes extratores foram empregados, na proporção 1:5 (m/v), para obter o extrato enzimático bruto, incluindo NaCl (15 mM), Tampão Fosfato de Sódio (pH 7, 15 mM), NaCl/Tween 80 (15 mM, 0,5%) e Tampão Fosfato de Sódio/Tween 80 (15 mM, 0,5%), seguindo metodologia utilizada por Putri et al. [29] e Singh et al. [30]. As amostras (3 g) foram misturadas com 15 mL das soluções extratoras em Erlenmeyers e agitadas a 150 rpm por 20 min a 30 °C. Após filtragem e centrifugação a 4.000 rpm por 20 min, os sobrenadantes foram designados como extrato bruto e submetidos a teste de determinação de atividade enzimática.

## **2.4 Preparo da esfera de quitosana para imobilização**

Para a fixação das enzimas, utilizou-se a quitosana como suporte, uma vez que este é um material natural, renovável, atóxico, biodegradável e econômico [31]. A quitosana, com grau de desacetilação de 85% e peso molecular de 47,9 kDa, foi fornecida pela Polymar Ltda (Brasil).

O procedimento foi realizado conforme descrito por Chiou et al. [32], onde 2,0 g de quitosana foi dissolvida em 100 mL de ácido acético a 1%. Essa mistura foi mantida em agitação em agitador magnético a 70 rpm em temperatura ambiente até completa homogeneização da solução. Esta solução foi gotejada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, em um banho coagulante de solução de NaOH 1,0 M contendo etanol numa proporção 75:25, sob agitação para formar as esferas de quitosana úmida. Foram formadas esferas com diâmetro variando entre 1 e 2 mm.

Em seguida, as esferas foram deixadas em repouso por 12 h e as esferas foram posteriormente removidas por filtração com papel de filtro. Após as esferas foram lavadas com água deionizada, secas a 37° em estufa de circulação de ar e armazenadas até serem utilizadas [33].

Para ativar o suporte (esferas de quitosana), empregou-se o glutaraldeído como agente químico [34]. As esferas de quitosanas (1 g) foram imersas em 25 mL de tampão fosfato (50mM, ph 7) contendo 1% de glutaraldeído, agitadas em agitador shaker a 350 rpm, 35° C, por 60 min, e então deixadas em geladeira por 12 horas. Após o processo da ativação química, o suporte foi lavado com água deionizada para remover os agentes químicos não ligados, e em seguida, o suporte foi seco em estufa com circulação de ar a 45°C, sendo armazenado em geladeira até o uso.

## 2.5 Imobilização da lipase no suporte

Neste experimento, a imobilização da lipase em esferas de quitosana foi realizada por meio de ligação covalente utilizando o glutaraldeído como agente químico, seguindo a metodologia descrita por Gonawan et al. [33]. Para imobilizar a enzima, adicionou-se 1,0 g de esferas a 29 mL do extrato enzimático bruto, contendo aproximadamente 70 U de atividade enzimática. Simultaneamente, outro extrato sem a presença da enzima, denominado controle, foi utilizado para fins comparativos durante o processo de imobilização. As amostras foram agitadas em um agitador shaker a 30°C e 150 rpm por 60, 120 e 180 minutos, a fim de determinar o melhor tempo de fixação da enzima.

Para avaliar o rendimento de imobilização da lipase no suporte, foram coletadas amostras dos sobrenadantes contendo o extrato enzimático e do controle a cada 60 minutos. Essas amostras foram dosadas utilizando o método titulométrico, conforme descrito no item 2.3.2. Para determinar a quantidade de lipase ligada ao suporte, foi calculado eficiência da imobilização (EI) apresentada na Equação 1, de acordo com Bayramoglu et al. [35]. Onde  $I_0$  e  $I_1$  é a atividade enzimática volumétrica antes e depois da imobilização.

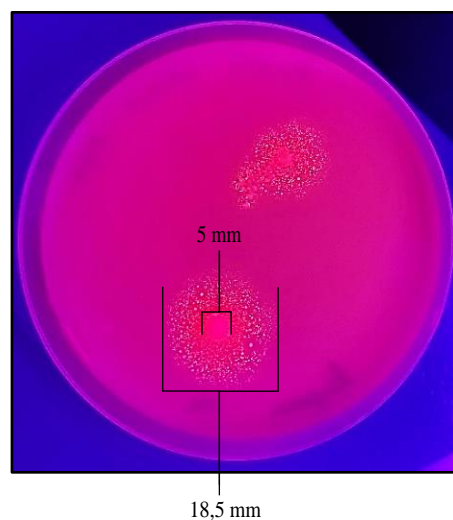
$$\text{Eficiência da Imobilização (\%)} = [I_0 - I_1 / I_0] \cdot 100 \quad (1)$$

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Teste qualitativo da produção de lipase

O microrganismo JC054, em teste qualitativo, em meio sólido, contendo azeite de oliva e tween 80 como principais fontes de carbono e rodamina B, destacou seu potencial de produção e secreção da enzima hidrolítica lipase. Após o período de incubação, observou-se a presença de um halo alaranjado fluorescente ao redor da colônia (Figura 1), quando exposta à luz ultravioleta (366nm), indicando a atividade enzimática. A atividade da lipase foi avaliada utilizando a relação entre o diâmetro do halo de hidrólise (18,5 mm) e o diâmetro da colônia (5 mm), resultando em uma estimativa de atividade enzimática de 3,7.

**Figura 1.** Teste qualitativo realizado com a levedura JC054, evidenciada pelo halo alaranjado, quando exposta a luz ultravioleta (366nm).



O IE de 3,7 obtido nesse trabalho indica a eficácia da lipase produzida pela levedura na degradação de lipídeos. De acordo com Hankin e Anagnostakis [21], índices iguais ou superiores a 2 sugerem que a enzima tem potencial para aplicação industrial. Este parâmetro é utilizado para facilitar a seleção qualitativa de linhagens com maior capacidade de degradação, representando uma abordagem ágil e simples para a quantificação dos níveis mínimos de atividade de lipase [36].

### 3.2 Identificação molecular

A análise molecular do isolado JC054 foi conduzida para obter informações sobre a espécie da levedura. Ao sequenciar as regiões ITS e Beta-tubulina, foi possível caracterizar o isolado como pertencente à espécie *Wickerhamiella osmotolerans*. A levedura apresenta identidade de sequência de 100% com as sequências fúngicas depositadas no GenBank NCBI, 2015, sob o número de acesso PP402695.

Um único estudo disponível na literatura sobre *Wickerhamiella osmotolerans* foi conduzido por Sakpuntoon et al. [37], focando na identificação molecular dessa levedura isolada de uma caixa de gordura na Tailândia. O gênero *Wickerhamiella* abriga uma variedade diversificada de leveduras, compreendendo aproximadamente 90 espécies conhecidas e outras 50 ainda não formalmente descritas [38]. Essas leveduras são notáveis por sua associação principalmente com flores e insetos florícolas [39].

As espécies de *Wickerhamiella* são altamente especializadas nutricionalmente e ecologicamente [40], exibindo características metabólicas únicas, como a capacidade de produzir manitol, um álcool de açúcar, a partir da glicose, ao contrário da maioria das leveduras que o produzem a partir da frutose [41]. Uma característica notável é a capacidade dessas leveduras de produzir sorofolípídios, glicolípídios que funcionam como biossurfactantes não nocivos ao ambiente [39]. Estudos conduzidos por Li et al. [42] e Liu et al. [43] demonstraram que a espécie *W. domercqiae* é capaz de produzir sorofolípídios utilizando resíduos provenientes da indústria agrícola e alimentícia.

### 3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

#### 3.3.1 Composição físico-química do substrato

A composição físico-química dos substratos utilizados na FES foi avaliada para entender sua influência nas condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão absoluto na Tabela 1.



**Tabela 1.** Composição físico-química dos substratos utilizados na FES. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão absoluto.

<b>Composição físico-química</b>	<b>Farelo de semente de girassol (FSG)</b>	<b>Resíduo de farelo de soja (RFS)</b>	<b>Resíduo de farelo de trigo (RFT)</b>
Umidade (%)	4,25 $\pm$ 0,19	10,60 $\pm$ 0,7	9,14 $\pm$ 1,2
Cinzas (%)	2,86 $\pm$ 0,04	6,2 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,5
Teor de óleo (g)	49,92 $\pm$ 1,44	9,7 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 0,7
Proteínas (g)	32,91 $\pm$ 1,52	45,1 $\pm$ 0,1	12,7 $\pm$ 1,1
Carboidratos (g)	23,47 $\pm$ 0,27	27,4 $\pm$ 0,5	54,7 $\pm$ 0,3

A composição físico-química dos substratos influencia diretamente suas propriedades como indutores para a produção de enzimas durante a fermentação. O uso de resíduos agrícolas como RFS e RFT na FES não apenas minimiza o desperdício de resíduos agroindustriais, mas também adota uma abordagem ambientalmente correta, convertendo subprodutos em fontes de nutrientes valiosas para a produção de enzimas [44]. Além disso, o teor de umidade desempenha um papel crucial nas condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos [45], e os resultados da análise mostraram que o FSG possui o menor percentual de umidade, seguido pelo RFT e RFS.

Os maiores teores de cinzas encontrados no RFS e RFT em comparação com o FSG podem influenciar a disponibilidade de nutrientes durante a fermentação. No entanto, é importante ressaltar que altas concentrações de minerais podem inibir a produção de lipase e estender o tempo de fermentação [46].

O alto teor de óleo no FSG oferece uma vantagem durante o processo de fermentação, eliminando a necessidade de adicionar indutores e contribuindo para a redução de custos [45]. Além disso, Nascimento et al. [5], sugerem que os substratos necessitam de uma quantidade significativa de lipídeos para induzir a produção de lipase.

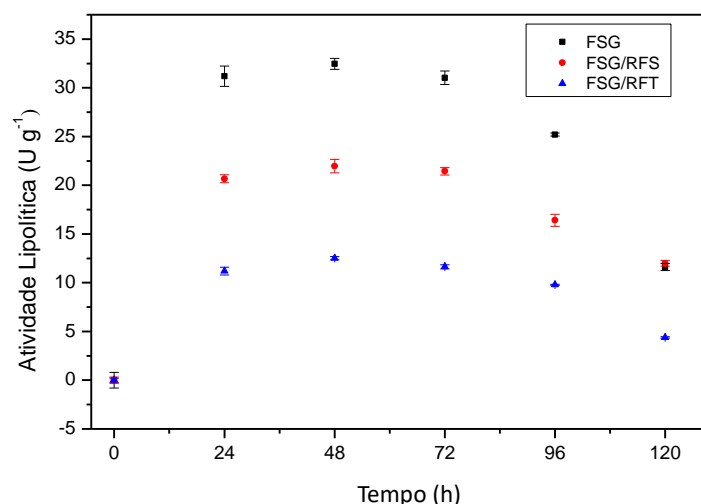
Substratos ricos em carboidratos, como RFT, desempenham um papel fundamental como fonte de carbono em fermentações microbianas, sendo hidrolisados em açúcares simples prontamente utilizados pelos microrganismos [47]. Em condições de estresse, os microrganismos frequentemente secretam lipases devido à preferência por carboidratos como principal fonte de energia durante seu crescimento [45].

A presença de proteínas nos substratos, especialmente no RFS, pode fornecer uma fonte de nitrogênio importante para a produção de lipase microbiana [48]. De acordo com Azevedo et al. [46], é essencial balancear os nutrientes necessários para o crescimento ideal dos microrganismos durante a fermentação. No contexto da FES, a combinação de diferentes substratos, como FSG/RFS e FSG/RFT, apresentou-se mais promissora do que a utilização de cada um separadamente. Essa abordagem permitiu um equilíbrio nos nutrientes necessários para o crescimento ideal dos microrganismos durante a fermentação. No entanto, é importante destacar que um excesso de nitrogênio no meio de cultura pode inibir o crescimento dos microrganismos devido ao acúmulo de metabólitos [49].

### 3.3.2 Cinética de produção enzimática

Os resultados da cinética enzimática (Figura 2) apresentam a atividade lipolítica ao longo do tempo para as três combinações de substrato utilizados no processo de fermentação. As barras representam o desvio padrão absoluto correspondente a cada média.

**Figura 2.** Cinética enzimática de produção de lipase utilizando a levedura *Wickerhamiella osmotolerans* JC054, por FES com diferentes substratos. As barras representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. FSG: Farelo de Semente de Girassol. FSG/RFG: Farelo de Semente de Girassol e Resíduo de Farelo de Soja. FSG/RFT: Farelo de Semente de Girassol e Resíduo de Farelo de Trigo.



Os resultados mostram que a atividade lipolítica aumenta inicialmente para todos os substratos durante as primeiras 24 h de fermentação (FSG:  $31,19 \pm 1,81 \text{ U g}^{-1}$ ; FSG/RFS:  $20,67 \pm 0,69 \text{ U g}^{-1}$ ; FSG/RFT:  $11,20 \pm 0,69 \text{ U g}^{-1}$ ). Em seguida, a atividade atinge um pico máximo em 48 h de fermentação para todos os substratos testados. Após esse ponto, a atividade lipolítica tende a diminuir gradualmente até o final do período de fermentação de 120 h.

No substrato composto inteiramente por FSG, a atividade lipolítica atinge seu valor máximo após 48 h, registrando  $32,46 \pm 0,96 \text{ U g}^{-1}$ . Quando o substrato é uma combinação de FSG/RFS, a atividade lipolítica também atinge seu pico máximo após 48 h, porém com uma medida ligeiramente menor de  $21,96 \pm 1,19 \text{ U g}^{-1}$ . Por fim, para o substrato composto por uma mistura de FSG/RFT, a atividade lipolítica atinge seu valor máximo em 48 h, com uma medida de  $12,51 \pm 0,30 \text{ U g}^{-1}$ .

O tempo de incubação e o substrato são fatores influentes na produção de lipase através da FES [50]. De acordo com Lopes et al. [51], leveduras crescem em substratos ricos em lipídios, como óleos e gorduras, liberando lipases, que hidrolisam moléculas de gordura e ácidos graxos livres, sendo então usados pelas células da levedura como fonte de energia e matéria-prima para crescimento e metabolismo.

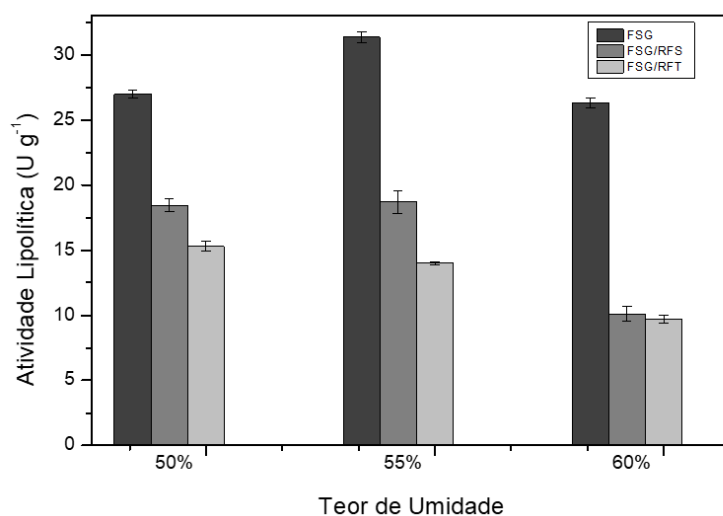
O aumento inicial do crescimento contínuo do microrganismo, na cinética de produção enzimática, pode ser atribuído à maior disponibilidade de substrato, seguido por uma diminuição gradual da atividade. Resultado semelhante ao tempo de fermentação obtido nesse estudo, foi observado no trabalho de Costa et al. [52], onde a enzima produzida por *Yarrowia lipolytica*, atingiu o nível máximo de produção em um período de 48 h. Os autores justificam também, que a liberação de proteases no meio de fermentação, pode explicar a diminuição de lipases após o período, justamente pela capacidade desta enzima de degradar lipases.

Estudos anteriores, como o de Souza et al., [45], demonstraram que outras fontes, como o farelo de soja, resultaram em atividades lipolíticas máximas menores ( $9,4 \pm 3 \text{ U g}^{-1}$ ) após 10 h de fermentação com *Yarrowia lipolytica*. Além disso, Fleuri et al. [53] obtiveram atividades lipolíticas de  $15,0 \text{ U mL}^{-1}$  (soja) e  $10,4 \text{ U mL}^{-1}$  (trigo) utilizando fungos *Aspergillus* sp., enquanto *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. produziram  $13,5 \text{ U mL}^{-1}$  e  $14,4 \text{ U mL}^{-1}$  (soja) e  $10,8 \text{ U mL}^{-1}$  (trigo), respectivamente. Esses resultados ressaltam a eficácia do FSG como substrato promissor para a FES na produção de lipase, corroborando a escolha dos demais consórcios de substratos.

### 3.3.3 Teor de umidade

Após determinar o pico de produção de lipases em 48 h para os três substratos (FSG, FSG/RFS e FSG/RFT), foram realizados testes para determinar o parâmetro físico ótimo de umidade (50%, 55% e 60%) visando otimizar a atividade da lipase. Os resultados dos testes de umidade para os três substratos estão apresentados na Figura 3, as barras representam o desvio padrão absoluto correspondente a cada média.

**Figura 3.** Produção de lipase por *Wickerhamiella osmotolerans* em diferentes teores de umidade e substrato. As barras representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. FSG: Farelo de Semente de Girassol. FSG/RFG: Farelo de Semente de Girassol e Resíduo de Farelo de Soja. FSG/RFT: Farelo de Semente de Girassol e Resíduo de Farelo de Trigo.



Os resultados da análise do teor de umidade em diferentes substratos revelaram variações na atividade da enzima lipase. Inicialmente, o substrato FSG alcançou sua máxima atividade enzimática quando submetido a uma umidade de 55% ( $31,36 \pm 0,68 \text{ U g}^{-1}$ ). Por outro lado, ao combinar o FSG com o RFS, foi observado que a atividade da lipase permaneceu relativamente constante independentemente da variação na umidade. Tanto em 50% quanto em 55% de umidade, a atividade da lipase foi registrada em torno de  $18,44 \pm 0,86 \text{ U g}^{-1}$  e  $18,7 \pm 1,50 \text{ U g}^{-1}$ , respectivamente, ocorrendo um decréscimo em 60% ( $10 \pm 0,97 \text{ U g}^{-1}$ ). Contudo, ao utilizar o substrato FSG combinado com o RFT, observou-se uma diminuição na atividade da lipase. O pico de atividade foi alcançado a 50% de umidade ( $15,28 \pm 0,64 \text{ U g}^{-1}$ ), representando uma redução de 71% em comparação com o substrato FSG puro.

A variação na atividade enzimática durante a FES de *Wickerhamiella osmotolerans* JC054 pode ser atribuída a diversos fatores influentes, sendo a umidade do substrato um dos principais. A FES é altamente sensível às condições de umidade e composição do substrato, influenciando significativamente a produção enzimática [5]. O substrato FSG atingiu atividade máxima com 55% de umidade, destacando a importância da umidade específica para reações enzimáticas eficientes. Este resultado está de acordo com estudos anteriores que determinaram a umidade ótima para a produção de lipase de *Candida rugosa* em 55% [54].

Por outro lado, o substrato FSG/RFS não apresentou variação na atividade enzimática com diferentes umidades. Isso pode ser atribuído à redução no teor lipídico do resíduo de farelo de soja em comparação com o substrato FSG, afetando sua atividade lipolítica [47]. Contudo, essa estabilidade na atividade enzimática pode sugerir que o substrato FSG/RFS pode ser menos sensível às mudanças de umidade em comparação com o substrato FSG.

O substrato FSG/RFT apresentou seu pico de atividade a 50% de umidade, com redução de 71%. Essa redução pode estar relacionada à presença de altos níveis de carboidratos no farelo de trigo, levando à repressão catabólica devido à abundância de fontes de carbono simples [55].

Embora o substrato combinado FSG/RFS tenha apresentado uma redução de 27% em sua atividade lipásica em comparação com o substrato FSG, ele representa uma alternativa mais econômica para a produção em FES de *W. osmotolerans* devido à acessibilidade do RFS como um resíduo agroindustrial [47].

### 3.3.4 Extração enzimática

A escolha da solução extratora desempenha um papel crucial no rendimento enzimático da FES. A Tabela 2 apresenta os resultados da extração enzimática da lipase produzida por *W. osmotolerans* a partir do substrato sólido fermentado, utilizando quatro diferentes soluções extratoras: NaCl (15 mM), Tampão fosfato (pH 7 - 5 mM), NaCl/Tween 80 (15 mM, 0,5%), e Tampão fosfato/Tween 80 (5 mM, 0,5%). Essas soluções foram testadas para determinar sua eficácia na extração da lipase, medida em termos de atividade total ( $\text{U g}^{-1}$ ) e rendimento da extração (%).

**Tabela 2.** Extração de lipase produzida por *Wickerhamiella osmotolerans*, do substrato sólido fermentado usando diferentes soluções. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão absoluto.

Solução de extrato	Atividade total ( $\text{U g}^{-1}$ )	Rendimento da extração (%)
Sólido fermentado	24,4 $\pm$ 0,26	100
NaCl (15 mM)	7,20 $\pm$ 0,3	30
Tampão fosfato (pH 7 - 5 mM)	13,43 $\pm$ 0,25	55
NaCl/Tween 80 (15 mM - 0,5%)	9,90 $\pm$ 0,1	41
Tampão fosfato/Tween 80 (5 mM - 0,5%)	21,54 $\pm$ 0,15	88

Os resultados da extração enzimática da lipase produzida por *W. osmotolerans* revelaram diferenças entre as soluções extratoras testadas. A solução de tampão fosfato/Tween 80 se destacou como a mais eficaz (21,54  $\pm$  0,15  $\text{U g}^{-1}$ ) e um rendimento de extração de 88% em comparação ao sólido fermentado. Contudo, a solução de NaCl/Tween 80 não apresentou atividade semelhante, resultando em um rendimento de extração de apenas 41%, metade do rendimento da melhor solução extratora.

Por sua vez, o tampão fosfato isoladamente também demonstrou ser uma opção eficiente, apresentando um rendimento de extração de 55%. Por fim, a solução de NaCl apresentou o menor rendimento de extração entre todas as soluções extratoras utilizadas (30%). Isso sugere que o NaCl não foi eficaz por si só na extração da lipase produzida por *W. osmotolerans*.

A extração enzimática dos sólidos fermentados é um processo importante que influencia diretamente no rendimento enzimático da FES. A presença do surfactante Tween 80 melhorou a interação enzima-substrato, resultando em uma extração mais eficiente da enzima. Esses resultados ressaltam a eficiência dessa combinação na extração da lipase, sugerindo que a presença do surfactante Tween 80 potencializou a solubilização e a interação da enzima com o meio extrator, resultando em uma extração eficiente [56].

A fim de otimizar a extração da lipase produzida pela FES, surfactantes não iônicos são frequentemente utilizados pois não desnaturam as enzimas, preservando assim sua atividade durante o processo de extração [57]. Putri et al. [29] obtiveram uma atividade aumentada ao utilizar uma solução de NaCl e Tween 80 na extração da lipase de *Aspergillus niger* fermentado com farelo de arroz. Silva et al. [58] também obtiveram uma extração eficaz de *Penicillium simplicissimum* ao combinar NaCl e Tween 80.

Resultados diferentes foram observados nesse estudo em relação à eficácia das soluções extratoras. A solução de NaCl/Tween 80 apresentou metade do rendimento da melhor solução extratora (tampão fosfato/Tween 80). Isso indica que a adição de NaCl não foi eficaz em melhorar a extração da lipase quando combinada com o Tween 80, sugerindo possíveis interações desfavoráveis

entre esses componentes. Além disso, a solução de NaCl não se mostrou eficaz como solução extratora, da mesma forma que os resultados apresentados por Oliveira et al. [59].

Esses resultados ressaltam a importância da escolha adequada da solução extratora na extração enzimática, sendo o tampão fosfato/Tween 80 superiores devido à sua capacidade de aprimorar a interação enzima-substrato, resultando em uma extração mais eficiente das enzimas produzidas durante a fermentação.

### 3.3.5 Imobilização enzimática

A imobilização de enzimas é um processo biotecnológico que consiste na fixação de enzimas em um suporte sólido ou em uma matriz, permitindo que permaneçam ativas e estáveis em um ambiente de reação específico [60]. O método de imobilização possibilita a ligação e incorporação das enzimas em uma matriz sólida ou em uma superfície, mantendo sua atividade catalítica em condições específicas de pH, temperatura e composição do meio reacional [61]. A quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina presente em fungos e crustáceos, é reconhecida como um biomaterial versátil e econômico devido às suas propriedades únicas, como biodegradabilidade, atoxicidade e capacidade bioadesiva [17]. Suas características físico-químicas tornam a quitosana uma escolha preferencial na imobilização de biomoléculas, incluindo a lipase [59].

Os resultados da Tabela 3 indicam que a eficiência de imobilização foi mais elevada para esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído no tempo de 1 h (29,32%), sugerindo uma maior eficiência na ligação da lipase as esferas. Por outro lado, à medida que o tempo aumenta, apresenta um déficit na eficiência de rendimento reduzindo para 18,89% em 2 h e 6,84% no período de 3 h. O extrato bruto representa a quantidade total de enzimas utilizadas no momento da imobilização, este serve como referência para calcular a eficiência de imobilização em relação à atividade enzimática inicial.

**Tabela 3.** Rendimento de imobilização de lipase produzida por *Wickerhamiella osmotolerans* em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão absoluto.

Suporte	Tempo (h)	Atividade Enzimática total (U)	Eficiência da imobilização (%)
Esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído	1	49,58 $\pm$ 0,01	29,32
	2	56,90 $\pm$ 0,09	18,89
	3	65,35 $\pm$ 0,30	6,84
Extrato bruto	-	70,15 $\pm$ 0,31	100

Os resultados desse estudo apontaram diferenças na eficiência de imobilização das esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído. Pinheiro et al. [62] imobilizaram *Candida antarctica* em quitosana obtendo um rendimento de 55,6  $\pm$  1%, entretanto, quando essa imobilização se passa na presença de glutaraldeído o rendimento de imobilização aumenta para 94,7  $\pm$  1,37%. Silva et al. [63] também imobilizaram *C. antarctica*, utilizando duas concentrações de glutaraldeído como agente ativador (5% e 2%), obtendo rendimentos de imobilização superiores a 50%.

A reticulação da quitosana com glutaraldeído se mostra um método eficaz para a estabilização de ligações covalentes na imobilização enzimática [64]. A modificação sofrida pela quitosana na reticulação com glutaraldeído, reduz sua capacidade de retenção de água, melhorando seu desempenho e tornando-a resistente. [65]. Contudo, o tamanho das enzimas e dos poros dos suportes podem influenciar nos resultados [66].

A reticulação com glutaraldeído resulta na formação de grupos imina, através da reação dos grupos amina da quitosana com os grupos aldeído do glutaraldeído [35]. Essa modificação confere estabilidade à quitosana e aumenta sua capacidade de estabelecer múltiplas ligações, como relatado em diversos estudos. Gonawan et al. [33], utilizaram esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído a 25% e alcançaram uma melhoria na enzima de 46,5% em comparação a lipase livre. O mesmo

resultado foi obtido por Costa-Silva et al. [34], que conseguiram aumentar em 46,5% a atividade inicial da lipase quando utilizaram glutaraldeído a 15% para imobilização de lipase em esferas de quitosana através de tecnologia de leito fluidizado.

Nos protocolos de imobilização covalente de enzimas, a etapa inicial frequentemente envolve a ativação da superfície do suporte. Os grupos amino nativos ou os grupos ativos resultantes da modificação da superfície podem ser ligados a grupos aldeído utilizando glutaraldeído. No caso específico da quitosana, apenas um grupo amino pode ser ligado à enzima quando o glutaraldeído é usado como reticulador [32]. A ativação do glutaraldeído na quitosana é simples e eficiente, resultando na formação de uma base de Schiff entre o glutaraldeído e a  $\text{NH}_2$ -quitosana, permitindo a imobilização covalente de moléculas de lipase [34]. Essa abordagem de reticulação com glutaraldeído na quitosana oferece uma forma eficaz de imobilizar enzimas, permitindo a produção de uma variedade de biocatalisadores com diversas aplicações.

#### 4 Comentários finais

Este estudo explorou a produção de lipase utilizando a fermentação em estado sólido com levedura *Wickerhamiella osmotolerans* isolada de ambiente aquático, destacando sua eficácia em diferentes substratos agroindustriais e condições de umidade. A otimização das condições de cultivo e a escolha de substratos adequados foram importantes para maximizar a produção enzimática, destacando a importância do uso de resíduos agroindustriais como fontes alternativas e sustentáveis. A combinação de diferentes substratos, como a farelo de semente de girassol e o resíduo de farelo de soja, apresentou-se como uma estratégia promissora, não apenas pela eficiência na produção de lipase, mas também pelo aproveitamento do resíduo, contribuindo para a mitigação de problemas ambientais decorrentes do descarte inadequado desses resíduos.

A otimização das condições de FES e a seleção de soluções extratoras adequadas, como tampão fosfato/Tween 80, são fundamentais para aumentar o rendimento enzimático. A imobilização da lipase em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído também apresentou resultados promissores, especialmente em tempos curtos de ativação, destacando a quitosana como um material de suporte promissor devido às suas propriedades únicas, como biodegradabilidade e capacidade bioadesiva.

Esses achados corroboram para o uso de FES e da imobilização enzimática em processos industriais, oferecendo uma alternativa sustentável e eficiente para a produção de lipases. Os resultados deste estudo abrem caminho para futuras pesquisas focadas na otimização de parâmetros de imobilização, como a estabilidade do imobilizado frente ao pH e temperatura. Sugere-se considerar a aplicação industrial dessa enzima imobilizada. Com os avanços contínuos na biotecnologia, espera-se que o uso de lipases e outras enzimas biotecnológicas continue a crescer, contribuindo para processos industriais mais limpos e sustentáveis.

#### 5 Referências

- [1] Meneghetti, S. P., Meneghetti, M. R., Suarez, P. A. Z. 2022. Contribuições da catálise na busca pela sustentabilidade. *Revista Virtual de Química*, 14(3). DOI: [dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220089](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220089)
- [2] Monteiro, V. N., do Nascimento Silva, R. 2009. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista processos químicos*, 3(5), 9-23. DOI: [doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83](https://doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83)
- [3] Ayub, J., Saeed, M. U., Hussain, N., Zulfiqar, I., Mehmood, T., Iqbal, H. M., Bilal, M. 2023. Designing robust nano-biocatalysts using nanomaterials as multifunctional carriers-expanding the application scope of bio-enzymes. *Topics in Catalysis*, 66(9-12), 625-648. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11244-022-01657-8>
- [4] Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., Azzazy, H. M. E. S. 2023. Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196. DOI: [doi.org/10.1021/acsomega.2c07560](https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560)

- [5] Nascimento, F. V. D., Lemes, A. C., Castro, A. M. D., Secchi, A. R., Zarur Coelho, M. A. 2022. A Temporal Evolution Perspective of Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. *Processes*, 10(2), 381. DOI: doi.org/10.3390/pr10020381
- [6] Filho, D. G., Silva, A. G., Guidini, C. Z. 2019. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 7399-7423. DOI: doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6
- [7] Vivek, K., Sandhia, G. S., Subramaniyan, S. J. B. A. 2022. Extremophilic lipases for industrial applications: A general review. *Biotechnology Advances*, 60, 108002. DOI: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108002
- [8] Gopinath, S. C., Anbu, P., LakshmiPriya, T., Hilda, A. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*, 2013. DOI: doi.org/10.1155/2013/154549
- [9] Mehta, A., Bodh, U., Gupta, R. 2017. Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8, 58.
- [10] de Souza, L. M. D., Ogaki, M. B., Teixeira, E. A. A., De Menezes, G. C. A., Convey, P., Rosa, C. A., Rosa, L. H. 2023. Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1923-1933. DOI: doi.org/10.1007/s42770-022-00834-x
- [11] de Souza, C. E. C., Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. Z. 2019. Characterization and application of *Yarrowia lipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189, 933-959. DOI: doi.org/10.1007/s12010-019-03047-5
- [12] Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Joyia, F. A., Parvaiz, A. 2021. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and applied biochemistry*, 68(3), 445-458. DOI: /doi.org/10.1002/bab.2019
- [13] Mandari, V., Nema, A., Devarai, S. K. 2020. Sequential optimization and large scale production of lipase using tri-substrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 89, 46-54. DOI doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.026
- [14] Carvalho, A. S. S., Sales, J. C. S., Nascimento, F. V. D., Ribeiro, B. D., Souza, C. E. C. D., Lemes, A. C., Coelho, M. A. Z. 2023. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation using amazon fruit by-products and soybean meal as substrate. *Catalysts*, 13(2), 289. DOI: doi.org/10.3390/catal13020289
- [15] Souza dos Santos, P., Santos Solidade, L., Gomes Barreto Souza, J., Sampaio, G., Ricardo Braga Jr, A. C., do Val de Assis, F. G., Lopes Leal, P. 2018. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4(2), 0181–0188. DOI:doi.org/10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188
- [16] Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., Pinelo, M. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. DOI: doi.org/10.3390/catal8020092
- [17] Verma, M. L., Kumar, S., Das, A., Randhawa, J. S., Chamundeeswari, M. 2019. Enzyme immobilization on chitin and chitosan-based supports for biotechnological

applications. *Sustainable Agriculture Reviews 35: Chitin and Chitosan: History, Fundamentals and Innovations*, 147-173. DOI: doi.org/10.1007/978-3-030-16538-3\_4

[18] Verma, M. L., Kumar, S., Das, A., Randhawa, J. S., Chamundeeswari, M. 2020. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 315-323. DOI: doi.org/10.1007/s10311-019-00942-5

[19] Carvalho, J. K. 2020. Isolamento e seleção de leveduras de ambiente continental lótico com capacidade de produção enzimática. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo. <https://tede.unioeste.br/handle/tede/5077>

[20] Oliveira, A. C. D., Watanabe, F. M. F., Rodrigues, M. L. F., Vargas, J. V. C., Mariano, A. B. 2013. Lipase production by endophytic yeast through factorial design. *Acad J Microbiol Res*, 1, 16-21.

[21] Hankin, L., Anagnostakis, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607. DOI: doi.org/10.2307/3758395

[22] Brandao, L. R., Libkind, D., Vaz, A. B., Espírito Santo, L. C., Moliné, M., de García, V., et al., 2011. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS microbiology ecology*, 76(1), 1-13. DOI: doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x

[23] Carvalho, J. K., Panatta, A. A. S., Silveira, M. A. D., Tav, C., Johann, S., Rodrigues, M. L. F., Martins, C. V. B. 2021. Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30, e00630. DOI: doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00630

[24] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402. DOI: doi.org/10.1093/nar/25.17.3389

[25] Rodrigues, M. L. F., da Silva, E. A., Borba, C. E., Oliveira, A. C. D., Kruger, C., Raimundo, R. W., et al., 2015. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 4, 129-145.

[26] AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 2019. *Official Methods of analysis of AOAC International*, 18th edn. AOAC, Washington

[27] Fernandes, M. L. M., Saad, E. B., Meira, J. A., Ramos, L. P., Mitchell, D. A., Krieger, N. 2007. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44(1), 8-13. DOI: doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.08.004

[28] de Moura Dickel, J. D., Carvalho, J. K., Silveira, M. A. D., Menegotto dos Santos, P., Rodrigues, M. L. F., Fagundes-Klen, M. R., et al., 2023. *Aspergillus sclerotiorum* lipolytic activity and its application in bioremediation of high-fat dairy wastewater environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(13), 35517-35527. DOI: doi.org/10.1007/s11356-022-24669-z

[29] Putri, D. N., Khootama, A., Perdani, M. S., Utami, T. S., Hermansyah, H. 2020. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. *Energy Reports*, 6, 331-335. DOI: doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064



- [30] Singh, M. K., Singh, J., Kumar, M., Thakur, I. S. 2014. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110, 92-99. DOI: doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.010
- [31] Bilal, M., Zhao, Y., Noreen, S., Shah, S. Z. H., Bharagava, R. N., Iqbal, H. M. 2019. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: A review from immobilization strategies viewpoint. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(3), 159-182. DOI: doi.org/10.1080/10242422.2018.1564744
- [32] Chiou, Shao-Hua; WU, Wen-Teng. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, n. 2, p. 197-204. DOI: https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00482-4
- [33] Gonawan, F. N., Romli, M. M., Zuhan, M. K. N. M., Jaya, M. A. T. 2022. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on the Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. *Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 33-41. DOI: https://doi.org/10.15282/jceib.v8i1.7771
- [34] Costa-Silva, T. A. Carvalho, A. K. F., Souza, C. R. F., De Castro, H. F., Bachmann, L., Said, S., Oliveira, W. P. 2021. Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: Application in butyl butyrate production. *Applied Catalysis A: General*, v. 622, p. 118217. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217
- [35] Bayramoglu, G., Celikbicak, O., Kilic, M., Arica, M. Y. 2022. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. *Food chemistry*, v. 366, p. 130699. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130699
- [36] Gupta, R., Rath, P., Gupta, N., Bradoo, S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 63-71. DOI: doi.org/10.1042/BA20020059
- [37] Sakpuntoon, V., Angchaun, J., Boonmak, C., Chang, C. F., Liu, S. M., Lee, C. F., et al. 2020. *Wickerhamiella osmotolerans* sp. nov. and *Wickerhamiella tropicalis* sp. nov., novel ascomycetous yeast in the family *Wickerhamiellaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2596-2601. DOI: doi.org/10.1099/ijsem.0.004075
- [38] Gonçalves, P., Gonçalves, C., Brito, P. H., Sampaio, J. P. 2020. The *Wickerhamiella/Starmarella* clade—a treasure trove for the study of the evolution of yeast metabolism. *Yeast*, 37(4), 313-320. DOI: doi.org/10.1002/yea.3463
- [39] Gonçalves, C., Wisecaver, J. H., Kominek, J., Oom, M. S., Leandro, M. J., Shen, X. X., et al. 2018. Evidence for loss and reacquisition of alcoholic fermentation in a fructophilic yeast lineage. *Elife*, 7, e33034. DOI: doi.org/10.7554/eLife.33034
- [40] Lachance, M. A., & Kurtzman, C. P. (2011). *Wickerhamiella* van der Walt (1973). In *The Yeasts* (pp. 891-897). Elsevier. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00079-3
- [41] Gonçalves, C., Ferreira, C., Gonçalves, L. G., Turner, D. L., Leandro, M. J., Salema-Oom, M. et al. 2019. A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation. *Frontiers in microbiology*, 10, 2510. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2019.02510
- [42] Li, H., Ma, X. J., Wang, S., Song, X. 2013. Production of sophorolipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from *Wickerhamiella domercqiae* var.

sophorolipid using fish oil as a hydrophobic carbon source. *Biotechnology letters*, 35, 901-908. DOI: doi.org/10.1007/s10529-013-1151-4

[43] Liu, X. G., Ma, X. J., Yao, R. S., Pan, C. Y., He, H. B. 2016. Sophorolipids production from rice straw via SO<sub>3</sub> micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. *AMB Express*, 6, 1-11. DOI: doi.org/10.1186/s13568-016-0227-7

[44] Alexandri, M., López-Gómez, J. P., Olszewska-Widdrat, A., Venus, J. 2020. Valorising agro-industrial wastes within the circular bioeconomy concept: The case of defatted rice bran with emphasis on bioconversion strategies. *Fermentation*, 6(2), 42. DOI: doi.org/10.3390/fermentation6020042

[45] Souza, C. E., Farias, M. A., Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. 2017. Adding value to agro-industrial co-products from canola and soybean oil extraction through lipase production using *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation. *Waste and biomass valorization*, 8, 1163-1176. DOI: doi.org/10.1007/s12649-016-9690-2

[46] de Azevedo, W.M., de Oliveira, L.F.R., Alcântara, M.A., Cordeiro, A.M.T.D.M., Damasceno, K.S.F.D.S.C., Assis, C.F.D., Sousa Junior, F.C.D., 2020. Transformação de manteiga de cacay e farelo de trigo em substrato para produção de lipase por *Aspergillus terreus* NRRL-255. *Bioquímica Preparativa e Biotecnologia*, 50 (7), 689-696. DOI: doi.org/10.1080/10826068.2020.1728698

[47] Manan, M.A., Webb, C. 2017. Aspectos de projeto da fermentação em estado sólido aplicados ao bioprocessamento microbiano. *J Appl Biotechnol Bioeng*, 4 (1), 91. DOI: 10.15406/jabb.2017.04.00094

[48] Safdar, A., Ismail, F., Imran, M. 2023. Characterization of detergent-compatible lipases from *Candida albicans* and *Acremonium sclerotigenum* under solid-state fermentation. *ACS omega*, 8(36), 32740-32751. DOI: doi.org/10.1021/acsomega.3c03644

[49] Dallastra, E. D. G., Dias, A. C. P., de Moraes, P. B., da Silva, J. F. M., Casciatori, F. P., Grajales, L. M. (2023). Development of a novel pilot-scale tray bioreactor for solid-state fermentation aiming at process intensification. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 193, 109526. DOI: doi.org/10.1016/j.cep.2023.109526

[50] Araujo, S. C., Ramos, M. R. M. F., do Espírito Santo, E. L., de Menezes, L. H. S., de Carvalho, M. S., Tavares, I. M. D. C., et al., 2022. Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through solid-state fermentation using agro-industrial residue based on a univariate analysis. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 52(3), 325-330. DOI: doi.org/10.1080/10826068.2021.1944203

[51] Lopes, M., Miranda, S. M., Costa, A. R., Pereira, A. S., Belo, I. 2022. *Yarrowia lipolytica* as a biorefinery platform for effluents and solid wastes valorization—challenges and opportunities. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(2), 163-183. DOI: doi.org/10.1080/07388551.2021.1931016

[52] Costa, A. R., Salgado, J. M., Lopes, M., Belo, I. 2022. Valorization of by-products from vegetable oil industries: Enzymes production by *Yarrowia lipolytica* through solid state fermentation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 1006467. DOI: doi.org/10.3389/fsufs.2022.1006467

[53] Fleuri, L. F., de Oliveira, M. C., de Lara Campos Arcuri, M., Capoville, B. L., Pereira, M. S., Delgado, C. H. O., Novelli, P. K. 2014. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean

bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food science and biotechnology*, 23, 1199-1205. DOI: 10.1007/s10068-014-0164-7

[54] Omar, A. S., Zakia, M. M. 2022. Lipase and Protease Production in Submerged and Solid State Fermentation by *Candida rugosa* using Olive Mills Wastes. DOI: <http://repository.uob.edu.ly/handle/123456789/1628>

[55] Prabaningtyas, R. K., Putri, D. N., Utami, T. S., Hermansyah, H. 2018. Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. *Energy Procedia*, 153, 242-247. DOI: [doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.010](https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.010)

[56] Muñoz, S. S., Balbino, T. R., Alba, E. M., Barbosa, F. G., de Pier, F. T., de Almeida, A. L. M., et al. 2022. Surfactants in biorefineries: Role, challenges & perspectives. *Bioresource Technology*, 345, 126477. DOI: [doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126477](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126477)

[57] Dobrev, G., Strinska, H., Hambarliiska, A., Zhekova, B., Dobрева, V. 2018. Optimization of Lipase Production in Solid-State Fermentation by in Nutrient Medium Containing Agroindustrial Wastes. *The Open Biotechnology Journal*, 12(1). DOI: 10.2174/1874070701812010189

[58] Silva, J. N., Godoy, M. G., Gutarra, M. L., Freire, D. M. 2014. Impact of extraction parameters on the recovery of lipolytic activity from fermented babassu cake. *Plos one*, 9(8), e103176. DOI: 10.1371/journal.pone.0103176

[59] Oliveira, F., Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Pérez-Rodríguez, N., Domínguez, J. M., Venâncio, A., Belo, I. 2017. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40, 1123-1132. DOI: [doi.org/10.1007/s00449-017-1774-2](https://doi.org/10.1007/s00449-017-1774-2)

[60] Rafiee, F., Rezaee, M. 2021. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 170-195. DOI: [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198)

[61] Cen, Y. K., Liu, Y. X., Xue, Y. P., Zheng, Y. G. 2019. Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 361(24), 5500-5515. DOI: [doi.org/10.1002/adsc.201900439](https://doi.org/10.1002/adsc.201900439)

[62] Pinheiro, B. B., Rios, N. S., Aguado, E. R., Fernandez-Lafuente, R., Freire, T. M., Fechine, P. B., et al. 2019. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. *International journal of biological macromolecules*, 130, 798-809. DOI: [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145)

[63] Silva, J. A., Macedo, G. P., Rodrigues, D. S., Giordano, R. L. C., Gonçalves, L. R. B. 2012. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 16-24. DOI: [doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011](https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011)

[64] Barbosa, O. Ortiz, C. Berenguer-Murcia, A., Torres, R. Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advanced*, 4(4), 1583-1600. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>

[65] Moreira, K. D. S., de Oliveira, A. L. B., de Moura Júnior, L. S., de Sousa, I. G., Cavalcante, A. L. G., Neto, F. S., et al. 2022. Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B

from *Candida antarctica* onto chitosan: Characterization, kinetic resolution application, and docking studies. *Chemical Engineering Research and Design*, 177, 223-244. DOI: [doi.org/10.1016/j.cherd.2021.10.033](https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.10.033)

[66] Reis, W. S. M.; Ferreira, R. D. M; Pereira, E. B. 2020. Immobilization of commercial lipase onto different supports: Characterization and application in esterification reaction. *Int J Eng Res Sci*, v. 6, p. 15-24.