

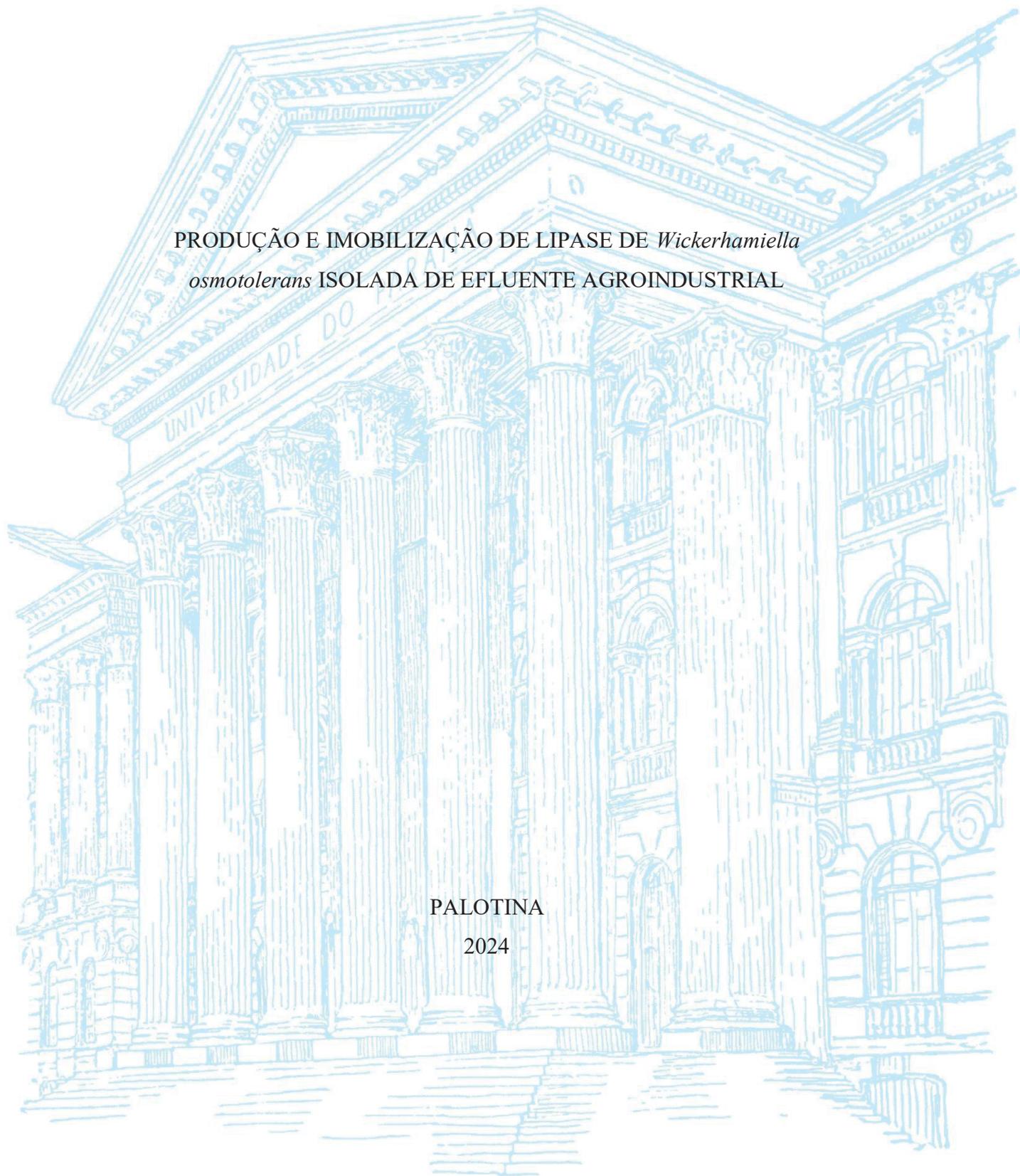
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSYCA KETTERINE CARVALHO

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Wickerhamiella*
osmotolerans ISOLADA DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL

PALOTINA

2024



JÉSSYCA KETTERINE CARVALHO

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Wickerhamiella*
osmotolerans ISOLADA DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental, área de Engenharias e Exatas da Universidade Federal do Paraná, setor de Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken

Coorientadora: Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

PALOTINA

2024

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

C331 Carvalho, Jéssyca Ketterine
Produção e imobilização de lipase de *Wickerhamiella
osmotolerans* isolada de efluente agroindustrial / Jéssyca Ketterine
Carvalho. – Palotina, PR, 2024.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken.

Coorientadora: Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues.

1. Enzimas. 2. Glutaraldeído. 3. Microrganismos. I. Teleken,
Joel Gustavo. II. Buzanello, Cleide Viviane III. Rodrigues, Maria
Luiza Fernandes. IV. Universidade Federal do Paraná. VI. Título.

CDU 579

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL - 40001016173P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JÉSSYCA KETTERINE CARVALHO** intitulada: **Produção e imobilização de lipase de *Wickerhamiella osmotolerans* isolada de efluente agroindustrial**, sob orientação do Prof. Dr. JOEL GUSTAVO TELEKEN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 29 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica
30/04/2024 08:04:06.0
JOEL GUSTAVO TELEKEN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
30/04/2024 08:52:30.0
CONCEIÇÃO DE FÁTIMA ALVES OLGUIN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
30/04/2024 08:53:34.0
SALAH DIN MAHMUD HASAN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO OESTE DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
30/04/2024 09:27:50.0
ROSEMEIRE APARECIDA DA SILVA DE LUCCA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
30/04/2024 08:25:59.0
MARCIA REGINA FAGUNDES KLEN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO OESTE DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, José e Jaqueline, por me guiar com sabedoria e amor. Sua dedicação em me ensinar valores como perseverança, determinação e empenho moldaram meu caráter e me inspiraram a sempre buscar o melhor em cada desafio. Suas palavras de encorajamento e apoio incondicional foram essenciais para que eu persistisse em seguir adiante, celebrando cada conquista ao longo do caminho.

Expresso minha sincera gratidão aos meus amados avós, Ademir e Ely, cujo apoio foi fundamental para o meu crescimento e sucesso acadêmico. Sempre acreditaram em mim e dedicaram seu tempo e energia para me incentivar em meus estudos, mesmo que à distância. Suas contribuições são inestimáveis e permanecerão eternamente em meu coração.

Dedico este momento especial ao meu esposo, Eduardo, sua presença constante trouxe conforto nos momentos difíceis, enquanto suas palavras de incentivo e compreensão iluminaram meu caminho. Cada desafio foi enfrentado com sua ajuda, e cada vitória celebrada ao seu lado se tornou ainda mais significativa. Sua colaboração incansável tornou essa jornada mais leve e gratificante.

Aos estimados professores da Unioeste, expresso minha profunda gratidão pela orientação, apoio e dedicação ao longo de minha jornada de pesquisa. Cada um de vocês contribuiu de maneira significativa para o meu crescimento acadêmico e pessoal, fornecendo orientação e assistência sempre que necessário. Especialmente, desejo destacar a professora Marcia Regina Fagundes-Klen, cujo incentivo e confiança em meu potencial foram fundamentais para explorar novas técnicas e alcançar novos patamares. À professora Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, meu sincero agradecimento por sua orientação incansável e contribuições cruciais para o desenvolvimento do meu trabalho. Sua disponibilidade e apoio foram inestimáveis em minha jornada. Agradeço também à comunidade da Unioeste por seu acolhimento caloroso, transformando minha experiência acadêmica em uma verdadeira jornada de aprendizado e crescimento.

Ao meu orientador Joel Gustavo Teleken, expresso minha mais profunda gratidão por sua compreensão, apoio e disponibilidade constante ao longo de minha jornada de pesquisa, sempre acreditou em meu trabalho e se dispôs a enfrentar desafios e mudanças que foram fundamentais para o meu progresso. Às minhas coorientadoras Cleide Viviane Buzanello e Maria Luiza Fernandes Rodrigues, minha sincera gratidão por estarem ao meu lado desde o início de minha trajetória acadêmica em 2018, durante o mestrado. Seu apoio e orientação foram essenciais para o meu crescimento como pesquisadora, e sou imensamente grata por sua presença constante e dedicação ao longo do doutorado.

Aos meus amigos, por estarem sempre ao meu lado, acompanhando, se preocupando e me incentivando ao longo de toda essa jornada. Suas palavras de apoio, encorajamento e amizade foram verdadeiros pilares que me sustentaram nos momentos mais desafiadores. Não há palavras suficientes para expressar minha gratidão por ter amigos tão especiais como vocês.

À Universidade Federal do Paraná, expresso minha profunda gratidão por me conceder a oportunidade de realizar o doutorado que sempre sonhei. À Capes sou imensamente grata pela concessão de bolsas de estudo e apoio financeiro, que foram fundamentais para minha formação acadêmica e realização de pesquisas, além do CNPQ, Fundação Araucária.

RESUMO

As enzimas, desempenham um papel fundamental na aceleração de reações químicas e processos metabólicos, oferecendo uma alternativa sustentável e eficaz na biotecnologia industrial. Essas moléculas apresentam uma ampla gama de aplicações, incluindo a produção de biocatalisadores altamente versáteis para catalisar uma variedade de reações químicas. A produção da enzima lipase por fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais mostra-se uma alternativa promissora, assim como a utilização de suportes como a quitosana para imobilizar essas enzimas, melhorando sua estabilidade e minimizando a contaminação provinda da FES. Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de lipase microbiana de *Wickerhamiella osmotolerans* pela técnica de fermentação em estado sólido utilizando farelo de semente girassol, associados a resíduos agroindustriais (casca de ovo e casca de arroz), como uma alternativa de produção eficiente e sustentável de enzimas lipolíticas. Além disso, investigar a imobilização dessas enzimas em esferas de quitosana, com o intuito de aumentar sua estabilidade e eficiência catalítica. As leveduras foram isoladas do efluente bruto do abate industrial de aves utilizando ágar YPD e foi realizado a triagem para verificar a capacidade de produção de lipase, utilizando dois diferentes meios enzimáticos. As leveduras que apresentaram os melhores resultados na triagem foram submetidas a FES utilizando farelo de semente de girassol variando granulometrias, associando a resíduos agroindustriais (casca de arroz e casca de ovo), umidade do meio sólido, e com e sem adição de indutor (óleo de girassol e azeite de oliva). A lipase produzida que apresentou o melhor resultado na FES, foi extraída e imobilizada em esferas de quitosana, a qual foi reticulada em glutaraldeído 1, 2 e 3% por 1, 2 e 3 horas. Como resultado foram isoladas 39 leveduras, das quais 5 foram submetidas a FES, destas, a *Wickerhamiella osmotolerans* JC030 apresentou maior atividade lipolítica, e o substrato escolhido como mais viável foi o farelo de semente de girassol/casca de arroz com 60% de umidade, sem indutor (24,14 U g⁻¹). Para a extração enzimática, o melhor extrator foi tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 associado ao surfactante tween 80 (0,4%). Após a extração, a enzima foi imobilizada em esferas de quitosana a qual foi reticulada com glutaraldeído onde foram testadas em diferentes concentrações e tempo de reticulação, sendo o melhor resultado obtido com glutaraldeído 1% em 1 hora totalizando uma eficiência de imobilização de 57.76% (88,36 U g⁻¹). A análise espectroscópica por infravermelho das esferas de quitosana revelou características típicas desse composto, com a formação da ligação C=N indicativa da reticulação com glutaraldeído. A imobilização da lipase foi confirmada pela modificação das regiões das bandas Amida I e II, sugerindo a presença da enzima. A imobilização bem-sucedida da lipase em esferas de quitosana reticulada com glutaraldeído reforça a viabilidade dessa abordagem para aplicações biotecnológicas, além de contribuem significativamente para o avanço da biotecnologia enzimática, fornecendo alternativas mais eficientes e eco-friendly para a produção de biocatalisadores.

Palavras-chave: Enzimas. Microrganismos. Imobilização. Glutaraldeído.

ABSTRACT

Enzymes play a fundamental role in accelerating chemical reactions and metabolic processes, offering a sustainable and efficient alternative in industrial biotechnology. These molecules have a wide range of applications, including the production of highly versatile biocatalysts to catalyze various chemical reactions. The production of lipase enzymes by solid-state fermentation (SSF) using agro-industrial residues is a promising alternative, as is the use of supports such as chitosan to immobilize these enzymes, improving their stability and minimizing contamination from SSF. This study aimed to evaluate the production of microbial lipase from *Wickerhamiella osmotolerans* through solid-state fermentation using sunflower seed bran associated with agro-industrial residues (eggshell and rice husk) as an efficient and sustainable alternative for producing lipolytic enzymes. Additionally, the study investigated the immobilization of these enzymes on chitosan spheres to increase their stability and catalytic efficiency. The yeasts were isolated from the raw effluent of industrial poultry slaughter using YPD agar, and screening was performed to verify lipase production capability using two different enzyme media. The yeasts that showed the best results in the screening were subjected to SSF using sunflower seed bran with varying particle sizes, associated with agro-industrial residues (rice husk and eggshell), different moisture levels of the solid medium, and with or without the addition of an inducer (sunflower oil and olive oil). The lipase that showed the best result in SSF was extracted and immobilized on chitosan spheres cross-linked with glutaraldehyde at concentrations of 1, 2, and 3% for 1, 2, and 3 hours. As a result, 39 yeasts were isolated, of which 5 were subjected to SSF. Among these, *Wickerhamiella osmotolerans* JC030 showed the highest lipolytic activity, and the most viable substrate was sunflower seed bran/rice husk with 60% moisture, without an inducer (24.14 u g⁻¹). For enzyme extraction, the best extractor was 50 mm sodium phosphate buffer pH 7.0 associated with 0.4% tween 80 surfactant. After extraction, the enzyme was immobilized on chitosan spheres cross-linked with glutaraldehyde, tested at different concentrations and cross-linking times, with the best result obtained with 1% glutaraldehyde for 1 hour, resulting in an immobilization efficiency of 57.76% (88.36 u g⁻¹). Infrared spectroscopic analysis of the chitosan spheres revealed typical characteristics of this compound, with the formation of the C=N bond indicative of cross-linking with glutaraldehyde. The successful immobilization of the lipase was confirmed by the modification of the amide I and II band regions, suggesting the presence of the enzyme. The successful immobilization of lipase on glutaraldehyde cross-linked chitosan spheres reinforces the viability of this approach for biotechnological applications and significantly contributes to the advancement of enzyme biotechnology, providing more efficient and eco-friendly alternatives for biocatalyst production.

Keywords: Enzymes. Microorganisms. Immobilization. Glutaraldehyde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelos de interação enzima-substrato com sistemas chave-fechadura e ajuste induzido.	20
Figura 2 - Aplicabilidade da lipase nos setores industriais.....	23
Figura 3 - Técnicas físicas e químicas utilizadas para imobilização da lipase.....	27
Figura 4 - Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído.....	31
Figura 5 - Fluxograma referente às etapas dos experimentos realizadas durante o trabalho...	32
Figura 6 - Localização geográfica da cidade onde foi realizada a coleta do efluente do abate industrial de aves para seleção das leveduras.....	33
Figura 7 - Marcações em quadrantes (A e B) utilizados para contagem em câmara de Neubauer.....	38
Figura 8 - Granulometrias do substrato sementes de girassol.....	40
Figura 9 - Suportes de casca de arroz e casca de ovo utilizados na fermentação em estado sólido	41
Figura 10 - Processo esquemático de preparação das esferas de quitosana.....	43
Figura 11 - Análise qualitativa de triagem para produção de lipases composta por meios com rodamina B, azeite de oliva e com e sem adição de Tween 80.....	49
Figura 12 - Comparativo do halo fosforescente em meios com e sem a adição de Tween 80.	50
Figura 13 - Análise filogenética usando a sequência de RNA ribossômico 26S das cepas isoladas vs espécies relacionadas.....	51
Figura 14 - Cinética utilizando 100% FSG granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm comparando 5 leveduras quanto a produção lipolítica.	55
Figura 15 - Cinética utilizando 100% FSG com granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm e 4,76 mm comparando quanto a produção lipolítica.	56
Figura 16 - Cinética utilizando 100% FSG com granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm, e combinações de substratos FSG/CA (1:1) e FSG/CO (1:1) utilizando a levedura <i>W. osmotolerans</i> JC030.	57
Figura 17 - Variação da porcentagem de umidade inicial na FES utilizando diferentes substratos como FSG, FSG/CA e FSG/CO para a levedura <i>W. osmotolerans</i> JC030.....	59
Figura 18 - Gráfico de Pareto do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis, para verificar as influências do Substrato (2 níveis) e do Indutor (3 níveis) sobre a atividade lipolítica.	60
Figura 19 - Superfície de resposta da AL obtida no Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis.....	61

Figura 20 - Gráfico da distribuição dos resíduos vs valores preditos pelo modelo obtido no Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis.	62
Figura 21 - Avaliação da eficiência de extração da lipase através da otimização do tempo de contato entre as soluções extratoras e o sólido fermentado	63
Figura 22 - Avaliação da eficiência de extração da lipase através da otimização dos parâmetros de porcentagem dos surfactantes utilizados nas soluções extratoras	64
Figura 23 - Transformação da quitosana da forma em pó à imobilização reticulada e imobilizada	65
Figura 24 - Avaliação da atividade lipolítica através da quantidade de glutaraldeído (%)	66
Figura 25 - Espectros FTIR – ATR das esferas de quitosana (A), esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 1% (B) e da lipase imobilizada nas esferas ativadas (C).	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de leveduras produtoras de lipases e sua aplicabilidade na biotecnologia.	24
Tabela 2. Sólidos fermentados de lipases provindos de leveduras e suas aplicabilidades na biotecnologia	26
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos do efluente de abate industrial de aves	33
Tabela 4. Níveis dos fatores.....	42
Tabela 5. Análises físico-química do efluente de abate industrial de aves que foi utilizado para o isolamento das leveduras.	46
Tabela 6. Índice enzimático (mm) das leveduras produtoras de lipase isoladas do efluente de abate industrial de aves, em temperaturas de 25 °C, 30 °C e 35 °C.....	48
Tabela 7. Identificação de leveduras selecionadas com melhores índices enzimáticos.	50
Tabela 8. Análise composicional do farelo de semente de girassol, casca de arroz e casca de ovo.	53
Tabela 9. Pico de atividade lipolítica das leveduras submetidas a FES, bem como sua queda após o período de 144 horas da cinética.	55
Tabela 10. Matriz de dados do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis para a resposta de atividade lipolítica	59
Tabela 11. ANOVA do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis	61
Tabela 12. Otimização dos parâmetros de reticulação da quitosana com glutaraldeído e tempo de incubação no impacto na atividade lipolítica ($U\ g^{-1}$) e rendimento de imobilização.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AL	- Atividade da Lipase
DBO	- Demanda Bioquímica do Oxigênio
DQO	- Demanda Química do Oxigênio
CA	- Casca de Arroz
CO	- Casca de Ovo
CHIT	- Quitosana
FSG	- Farelo de Semente de Girassol
FES	- Fermentação em Estado Sólido
FS	- Fermentação Submersa
GLUT	- Glutaraldeído
IE	- Índice Enzimático
O&G	- Óleos e Graxas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 JUSTIFICATIVA.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivo geral.....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 EFLUENTE PROVINDO DO ABATE INDÚSTRIAL DE AVES.....	19
2.2 CATALISADORES BIOLÓGICOS – ENZIMAS.....	19
2.3 LIPASE.....	21
2.4 LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE.....	23
2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	25
2.6 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE.....	27
2.7 QUITOSANA.....	28
2.8 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA QUITOSANA.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE DE ABATE INDUSTRIAL DE AVES.....	32
3.2 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS A PARTIR DO EFLUENTE.....	34
3.3 TRIAGEM DAS LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO MEIOS PARA LIPASE .	34
3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS MELHORES PRODUTORAS DE LIPASE	35
3.4.1 Extração e quantificação do DNA.....	35
3.4.2 Amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Eletroforese e <i>Fingerprint</i>	35
3.4.3 Amplificação do gene 26S, Purificação do Amplicon e Sequenciamento Genômico.....	36
3.4.4 Análise filogenética.....	37
3.5 PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.	37
3.5.1 Determinação da composição centesimal do substrato e dos suportes utilizados na FES.....	37
3.5.1.1 Determinação do teor de umidade.....	37
3.5.1.2 Determinação do teor de cinzas.....	38
3.5.1.3 Determinação do teor de óleo.....	38
3.5.2 Ativação e preparo dos inóculos.....	38

3.5.3 Condições de cultivo para produção de lipase	39
3.5.4 Avaliação da influência da granulometria do substrato	40
3.5.5 Avaliação da combinação do substrato com suportes	40
3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.6.1 Avaliação do efeito da umidade na FES para produção de lipase	41
3.6.2 Avaliação do efeito do tipo de suporte associado ao uso de indutor na FES	41
3.7 EXTRAÇÃO DA ENZIMA DO SÓLIDO FERMENTADO	42
3.8 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM ESFERAS DE QUITOSANA	43
3.8.1 Síntese e funcionalização das esferas de quitosana	43
3.8.2 Imobilização de lipase em esferas de quitosana reticuladas em glutaraldeído	44
3.8.3 Cálculo do rendimento de imobilização	44
3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS	45
3.9.1.1 Determinação da atividade enzimática do sólido fermentado	45
3.9.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE UTILIZADO PARA ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	46
4.2 TRIAGEM DAS LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO MEIOS PARA LIPASE .	47
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. .	53
4.3.1 Determinação da composição centesimal do substrato e dos suportes utilizados na FES.....	53
4.4 PRODUÇÃO DE LIPASE VARIANDO GRANULOMETRIAS DO SUBSTRATO E COMBINANDO SUBSTRATO COM SUPORTES.....	54
4.4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	58
4.5 EXTRAÇÃO DA ENZIMA DO SÓLIDO FERMENTADO	63
4.6 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM ESFERAS DE QUITOSANA	65
4.6.1 Síntese e funcionalização das esferas de quitosana	65
4.6.2 Imobilização de lipase em esferas de quitosana reticulada com glutaraldeído	66
4.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	68
5 CONCLUSÃO.....	70
6 REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

As enzimas desempenham um papel crucial na aceleração das reações químicas e processos metabólicos, destacando-se por sua alta especificidade e eficácia como catalisadores biológicos na tecnologia de bioprocessos (TAHERI-KAFRANI *et al.*, 2021). O aumento da utilização de catalisadores biológicos deve-se às suas características físico-químicas atrativas e viáveis, como a segurança ambiental, biodegradabilidade e capacidade de aplicação em condições mais amenas (CZAJA, 2015; THAPA *et al.*, 2019; GRAJALES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; SHAKERIAN; ZHAO; LI, 2020). Além disso, as enzimas apresentam capacidades como quimiosseletividade, enantiosseletividade e regioseletividade, ampliando ainda mais o seu potencial de aplicação (TONG; BUSK; LANGE, 2016; KUHLMANN *et al.*, 2019; GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

A maioria das enzimas são proteínas, mas algumas são consideradas ácidos ribonucleicos e são classificadas de acordo as reações que catalisam como: oxidoredutases EC 1 (reações de óxido-redução), transferases EC 2 (transferência de grupos funcionais de moléculas), hidrolases EC 3 (reação de hidrólise), liases EC 4 (quebra de ligações), isomerases EC 5 (transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros), ligases EC 6 (Formação de ligação do tipo C-C, C-S, C-O e C-N) e translocases EC 7 (transferência de elétrons e moléculas através das membranas) (CAI; CHOU, 2005; TAO *et al.*, 2020).

As enzimas lipolíticas, pertencentes às hidrolases, representam o terceiro grupo de catalisadores mais utilizados no âmbito industrial, sendo consideradas o biocatalisador mais importante na biotecnologia (KUMAR *et al.*, 2019). Sua aplicabilidade é vasta, pois são biocatalisadores altamente versáteis, com uma ampla gama de aplicações industriais (ZHANG; LE; SIMPSON, 2018; NAGHDI *et al.*, 2018; BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; KUMAR *et al.*, 2019), capazes de catalisar diversas reações químicas, como aminólise, acidólise, esterificação e transesterificação (COSTA-SILVA *et al.*, 2021).

Os microrganismos produtores de lipases são encontrados em diversos habitats, principalmente aqueles com alto teor de óleos e gorduras disponíveis como nutrientes, como processamento de óleos vegetais, fábricas de laticínios, solos contaminados e efluentes industriais (SALGADO *et al.*, 2020). Portanto, efluentes provindos de abatedouros como de aves, torna-se um ambiente estratégico para encontrar microrganismos lipolíticos.

Após o isolamento dos microrganismos lipolíticos, os processos de produção de lipases ocorrem por meio de fermentações submersa (FS) e em estado sólido (FES), amplamente utilizadas na transformação biológica de substratos complexos em moléculas mais simples.

Essas técnicas de fermentação oferecem uma abordagem versátil e eficaz para a produção de enzimas extracelulares, possibilitando a exploração de diferentes fontes de nutrientes e substratos, para a obtenção de lipases com potencial aplicação industrial (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

A FES se caracteriza pelo uso de uma matriz sólida em um processo com baixo teor de água livre. Para o desenvolvimento dos microrganismos, é essencial que o substrato ou suporte contenha a umidade adequada e forneça os nutrientes necessários para manter seu metabolismo ativo e promover seu crescimento (VANDENBERGHE *et al.*, 2021). Essa abordagem de fermentação é reconhecida pela sua eficiência econômica, pois utiliza substratos relativamente simples e de baixo custo, como resíduos agroindustriais, na produção de enzimas extracelulares (STEUDLER; WERNER; WALTHER, 2019).

Para melhorar a estabilidade enzimática e minimizar ou eliminar a contaminação do sólido fermentado, bem como do extrato enzimático, a imobilização da lipase utilizando suportes como a quitosana é uma estratégia eficiente (BOUDRANT *et al.*, 2020). A quitosana em forma de esferas de hidrogel mostra-se promissora na imobilização da lipase, proporcionando maior porosidade, área superficial e acesso aos locais internos de sorção em comparação com a quitosana em pó (RAFIEE; REZAEI, 2021).

1.1 JUSTIFICATIVA

A necessidade de avanços na tecnologia enzimática é evidenciada pela busca por alternativas aos catalisadores químicos tradicionais em processos industriais. Os catalisadores biológicos, como as enzimas, surgem como uma opção promissora devido à sua alta especificidade e eficácia, além de proporcionarem processos mais sustentáveis. No entanto, para que essas enzimas sejam amplamente adotadas na indústria, é crucial a pesquisa por microrganismos capazes de produzir enzimas mais estáveis e eficientes, bem como a otimização da produção e imobilização durante o processo.

Um dos desafios enfrentados é encontrar enzimas que sejam capazes de suportar as condições variáveis e extremas durante os processos industriais, como variações de temperatura e pH. Nesse contexto, a prospecção de microrganismos adaptados a ambientes específicos, com alta carga orgânica e outras condições desafiadoras, torna-se uma estratégia promissora para a descoberta de novas enzimas, como as lipases.

Assim, ao explorar a diversidade microbiana presente nos efluentes de abate industrial de aves, busca-se não apenas mitigar os impactos ambientais causados por esses resíduos, mas também aproveitar seu potencial como fonte de microrganismos produtores de enzimas com

aplicações industriais relevantes. Portanto, a prospecção de microrganismos produtores de lipases e a sua imobilização em suportes como a quitosana apresentam-se como estratégias fundamentais para o desenvolvimento de uma enzima mais eficiente.

Além disso, a utilização de suportes como a quitosana possibilita a criação de sistemas de biocatálise mais robustos e flexíveis, adaptáveis a uma variedade de condições de operação. Isso não apenas melhora a eficiência do processo, mas também resulta em redução de custos operacionais e minimização dos impactos ambientais, tornando-se uma alternativa promissora para aplicações industriais mais sustentáveis.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de lipase microbiana de *Wickerhamiella osmotolerans* pela técnica de fermentação em estado sólido utilizando substratos ricos em óleos e graxas, como o farelo de semente girassol, associados a resíduos agroindustriais (casca de ovo e casca de arroz), como uma alternativa de produção eficiente e sustentável de enzimas lipolíticas. Além disso, investigar a imobilização dessas enzimas em esferas de quitosana, com o intuito de aumentar sua estabilidade e eficiência catalítica, visando futuras aplicações industriais mais eficazes e sustentáveis.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar leveduras contidas no efluente de abate industrial de aves;
- b) Realizar testes de triagem para determinar a capacidade das leveduras em produzir lipase (teste qualitativo);
- c) Realizar identificação molecular das leveduras com melhor índice enzimático;
- d) Realizar análise quantitativa (fermentação em estado sólido) das leveduras de maior produção identificadas nos testes qualitativos;
- e) Encontrar as melhores combinações de substrato e suportes, bem como otimizar outros parâmetros da fermentação;
- f) Aprimorar o método de extração, encontrando os melhores extratores e melhores parâmetros;
- g) Otimizar o suporte de esferas de quitosana, adicionando glutaraldeído em diferentes porcentagens;

- h) Encontrar o melhor de tempo de imobilização entre a lipase e o suporte de quitosana;
- i) Realizar análise de espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier para verificar as mudanças estruturais do suporte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFLUENTE PROVINDO DO ABATE INDÚSTRIAL DE AVES

As indústrias responsáveis pelo abate de animais são reconhecidas como fontes significativas de poluição dos recursos hídricos devido aos elevados parâmetros físico-químicos e microbiológicos encontrados em seus efluentes. Esses efluentes apresentam uma composição variada e concentrações distintas, influenciadas pelo processo de abate e pelos objetivos específicos de cada instalação (MENEGASSI *et al.*, 2020). No caso do abate industrial de aves, as águas residuais resultantes carregam consigo uma carga considerável de sólidos suspensos totais e dissolvidos, além de óleos, gorduras e altas demandas químicas e bioquímicas, incluindo oxigênio, nitrogênio e fósforo, advindos principalmente do sangue e dos nutrientes presentes nos resíduos (HILARES *et al.*, 2021).

O acúmulo desses componentes nos efluentes representam uma ameaça significativa ao meio ambiente aquático, podendo causar problemas como eutrofização e afetar tanto os ecossistemas aquáticos quanto a saúde pública (AKPOR; MUCHIE, 2011). A presença de substâncias como sangue, gorduras, proteínas e fibras nos efluentes contribui para o aumento da matéria orgânica, criando condições favoráveis para a proliferação de microrganismos e algas (YAAKOB *et al.*, 2018).

Considerando esse contexto, é importante ressaltar que as águas residuais provenientes do abate industrial de aves apresentam uma ampla diversidade de nutrientes, que podem favorecer o crescimento de microrganismos, tanto de forma planctônica quanto sésseis. Esses microrganismos têm o potencial de desempenhar funções específicas, como a decomposição de óleos e gorduras presentes no efluente. Assim, torna-se viável explorar essa riqueza microbiana como uma fonte promissora para a realização de processos biotecnológicos (DLANGAMANDLA *et al.*, 2016).

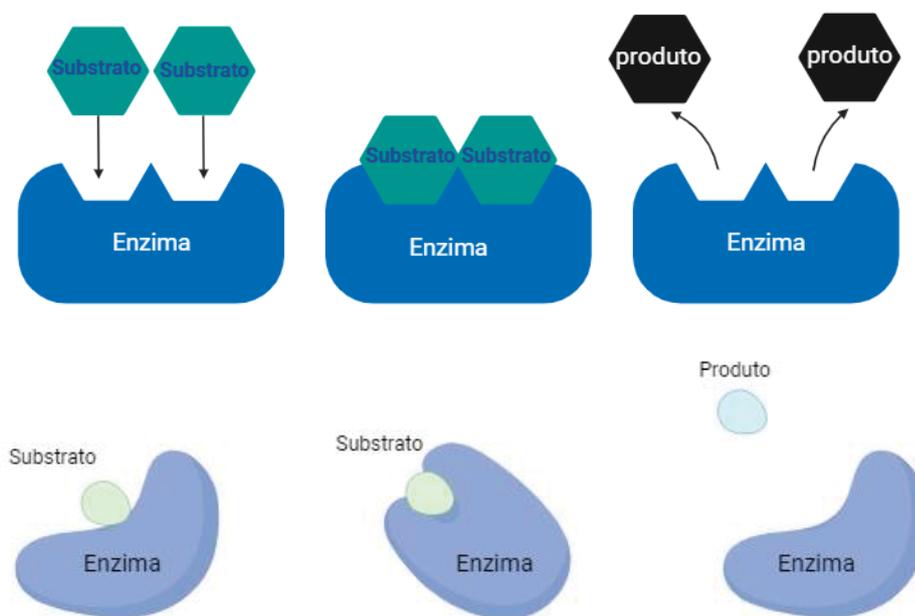
2.2 CATALISADORES BIOLÓGICOS – ENZIMAS

As enzimas, também conhecidas como biocatalisadores enzimáticos, desempenham um papel fundamental na conversão de reações complexas em etapas mais simples. Especializadas nessa função, essas biomoléculas reduzem as barreiras de energia de ativação quando o substrato se liga ao sítio ativo da enzima, facilitando a formação de arranjos ideais (PUNEKAR, 2018).

Altamente seletivas, as enzimas são compostas por biopolímeros e cofatores ou grupos prostéticos, componentes essenciais para sua atividade biológica. Sua principal função é acelerar reações químicas até o equilíbrio, sem alterar sua posição ou sofrer mudanças químicas significativas (BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020).

Essas macromoléculas, formadas por aminoácidos e ligações peptídicas, possuem pesos moleculares que variam de 10 kDa a 2.000 kDa. Os sítios ativos das enzimas, localizados em suas estruturas terciárias ou quaternárias, determinam sua especificidade em relação ao substrato, podendo seguir o modelo chave-fechadura ou o modelo do ajuste induzido (Figura 1) (ROBINSON, 2015; CHEN; ARNOLD, 2020).

Figura 1 - Modelos de interação enzima-substrato com sistemas chave-fechadura e ajuste induzido.



Fonte: A autora

No modelo chave-fechadura, a enzima (representada pela estrutura azul) possui uma forma específica que se encaixa perfeitamente com o substrato (molécula menor em verde), assemelhando-se a uma chave que se ajusta a uma fechadura. Já no modelo do ajuste induzido, a interação entre a enzima e o substrato não é inicialmente perfeita, mas ocorrem mudanças conformacionais na enzima, levando a um ajuste mais preciso entre ambas as estruturas, resultando em uma ligação mais eficiente.

Esses modelos conferem às enzimas uma alta seletividade nas reações catalíticas, gerando produtos praticamente livres de impurezas devido à baixa formação de coprodutos secundários durante o processo. Além disso, as enzimas auxiliam em reações químicas

complexas em condições ambientais amenas, contribuindo para processos mais eficientes e sustentáveis (PRASAD; ROY, 2018).

No campo da biotecnologia, as enzimas emergem como uma alternativa promissora para a produção eficiente de compostos de alto valor agregado, promovendo o uso sustentável de recursos naturais renováveis (THANGARAJ *et al.*, 2019). Com atributos atraentes, como biodegradabilidade aprimorada, adaptabilidade a condições amenas e capacidade de reutilização, as enzimas solidificam sua posição como uma escolha ambientalmente consciente (THAPA *et al.*, 2019).

Diante desse cenário, há uma busca crescente por alternativas viáveis para obtenção de enzimas, com destaque para aquelas derivadas de microrganismos. Essas fontes tendem a ser ecologicamente corretas e economicamente relevantes quando comparadas às de origem animal e vegetal (VYAS; CHHABRA, 2017). Além disso, os microrganismos são as principais fontes de enzimas devido à facilidade de obtenção, ampla disponibilidade, necessidades nutricionais simples, rápida taxa de crescimento e diversidade em atividades catalíticas (THAPA *et al.*, 2019).

2.3 LIPASE

As lipases (EC 3.1.1.3), também conhecidas como glicerol éster de triacilglicerol hidrolase são abundantes na natureza e pertencem ao grupo das serinas hidrolases (FATIMA *et al.*, 2020). Seu peso molecular encontra-se na faixa de 19 kDa a 60 kDa, além de ser descrita como proteína monomérica (formadas apenas por uma cadeia polipeptídica) (CHANDRA *et al.*, 2020), e o que diferencia as lipases dos outros tipos de esterases é a capacidade de hidrolisar ésteres insolúveis em água (KARTAL, 2016).

Essas enzimas possuem um sítio constituído por uma tríade catalítica formada por resíduos de serina, histidina e ácido aspártico (DOBREV *et al.*, 2015). Além disso, apresentam elementos estruturais essenciais como a cavidade hidrofóbica, tampa polipeptídica, fenda oxianiónica e a ligação dissulfeto. A cavidade hidrofóbica está diretamente relacionada à atividade da enzima, pois facilita o alinhamento da ligação éster ao sítio ativo (FATIMA *et al.*, 2020). Esta cavidade é protegida pela tampa polipeptídica, que se desloca na presença da interface água-óleo expondo a área hidrofóbica. permitindo ao substrato acessar o sítio ativo, que se liga à interface lipídica. Deste modo, nesse processo conhecido como ativação interfacial, ocorre um rearranjo estrutural da forma inativa para a ativa ocasionando o aumento da atividade catalítica das lipases (KHAN *et al.*, 2017; PRIYANKA *et al.*, 2019).

Já a fenda oxianiónica é de extrema importância, influenciando na eficiência catalítica das lipases por estabilizar a distribuição de carga e reduzir a energia no mecanismo de catálise (GAO *et al.*, 2011), enquanto a ponte ligação dissulfeto contribui para a estabilidade conformacional, diminuindo a entropia e influenciando na estabilidade térmica da enzima (TAMBUNAN; RANDY; PARIKESIT, 2014, KHAN *et al.*, 2017, PRIYANKA *et al.*, 2019).

Essas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise e síntese de triglicérides, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol, além de apresentarem atividade de hidrólise, interesterificação, esterificação, aminólise, acidólise e alcoólise (JAVED *et al.*, 2018). Elas sintetizam ésteres de glicerol a partir do glicerol e ácidos graxos, bem como ácidos graxos de cadeia longa em meio não aquoso, contribuindo para uma ampla gama de aplicações industriais (CHANDRA *et al.*, 2020).

A eficiência das lipases está relacionada a fatores como as propriedades físicas e a posição do ácido graxo na estrutura do glicerol, comprimento da cadeia e grau de insaturação (TONG; BUSK; LANGE, 2016; CARPEN *et al.*, 2019). Embora ocupem o terceiro lugar na aplicação industrial, atrás das proteases e amilases, as lipases são altamente versáteis, o que as torna amplamente utilizadas (JAVED *et al.*, 2018; ARORA *et al.*, 2020), especialmente as de origem microbiana, como as provenientes de bactérias, fungos e leveduras (VYAS; CHHABRA, 2017).

A obtenção de microrganismos produtores de enzimas envolve várias etapas, como isolamento, triagem, identificação genética, otimização de parâmetros do processo fermentativo, purificação e caracterização. A maioria dos microrganismos utilizados na produção de enzimas industriais é geneticamente modificada para garantir uma produção significativa durante o processo (SANDHYA *et al.*, 2015).

Esses catalisadores biológicos podem ser aplicados em diversas áreas, sintetizando produtos de diversos setores industriais. Na Figura 2 são descritas algumas aplicações significativas das lipases microbianas.

Figura 2 - Aplicabilidade da lipase nos setores industriais



Fonte: A autora.

2.4 LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE

Os microrganismos produtores de lipases são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em diversos ambientes, como água, solo e resíduos contaminados com óleo. Eles desempenham um papel crucial na biodegradação de compostos ricos em lipídios, utilizando vias metabólicas específicas para converter esses lipídios em produtos de baixo peso molecular, através da secreção de enzimas extracelulares (FIBRIANA; UPAICHT; CHEIRSILP, 2021).

Dentre os microrganismos produtores de lipase, as leveduras se destacam no cenário industrial devido à sua segurança, não toxicidade e aplicações versáteis. Elas desempenham papéis únicos nos setores químico, farmacêutico, produção de biodiesel e na indústria alimentícia (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Embora muitas leveduras possuam a capacidade de produzir lipases, alguns gêneros se destacam como os principais produtores. Entre eles, estão *Candida*, *Rhodotorula*, *Yarrowia* e *Trichosporon*. Além desses, outros gêneros de leveduras também são reconhecidos como bons produtores de lipase, incluindo *Saccharomyces*, *Torulospora*, *Kluyveromyces*, *Pseudozyma*,

Pichia, *Lachancea* e *Zygosaccharomyces* (MOFTAH *et al.*, 2012; NAGARAJAN, 2012; DIVYA; PADMA, 2015; LAN *et al.*, 2016; SU *et al.*, 2020).

A Tabela 1 apresenta algumas espécies específicas de leveduras produtoras de lipase e suas respectivas aplicações industriais, destacando a diversidade e importância desses microrganismos na produção de enzimas lipolíticas.

Tabela 1. Espécies de leveduras produtoras de lipases e sua aplicabilidade na biotecnologia.

Espécie de leveduras	Aplicações	Referências
<i>Candida rugosa</i>	Síntese de ésteres de sabor e aromas, cosméticos, produção de biodiesel e outras sínteses de produtos químicos.	Bayramoglu <i>et al.</i> , 2021; Subroto <i>et al.</i> , 2020.
<i>Candida antarctica</i>	Produção de biodiesel, detergente, alimentos, indústria química, cosméticos, têxtil, tratamento de couro, papel, entre outros.	Shahedi <i>et al.</i> , 2019; Monteiro <i>et al.</i> , 2021.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ésteres aromatizantes, ésteres de cera, biolubrificantes, indústria alimentícia, biosensores, biodiesel.	Souza; Ribeiro; Coelho, 2019; Madzak <i>et al.</i> , 2018.
<i>Rhodotorula</i> sp.	Formulação de detergentes.	Maharana e Singh, 2017.
<i>Trichosporon</i> sp.	Síntese de triacilgliceróis estruturados, surfactantes, aditivos alimentares, biocombustíveis, lubrificantes e detergentes.	Cao <i>et al.</i> , 2021.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biorremediação, medicina, farmacêuticos, agrícola, indústria alimentícia.	Massoud <i>et al.</i> , 2019.
<i>Mucor miehei</i>	Produção de biodiesel.	Carteret; Jacob; Blin, 2018.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Biodiesel, lubrificantes, indústria alimentícia	Kumar e Gupta, 2015.
<i>Williopsis californica</i>	Indústria química e indústria alimentícia	Thakur, 2012.

Fonte: A autora

Leveduras do gênero *Candida* são reconhecidas como destaques no cenário industrial devido ao seu grande potencial na produção de lipases extracelulares. Uma vantagem significativa dessas leveduras é sua capacidade de atuação em ésteres de cadeia longa, permitindo a hidrólise e síntese de uma variedade de óleos (ALAMI *et al.*, 2017).

Algumas espécies do gênero *Candida* se destacam como excelentes produtoras de lipase, apresentando um alto potencial industrial. Essas espécies são amplamente estudadas

devido às suas propriedades únicas, estruturas e atividades catalíticas, com diversos relatos na literatura científica (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

Entre elas destacam-se *C. albicans*, *C. antarctica*, *C. deformans* CBS 2071, *C. curvata*, *C. rugosa*, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. zeylanoides*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. cylindracea* e *C. valida* (ALAMI *et al.*, 2017).

2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Na fermentação, os microrganismos convertem nutrientes em metabólitos por meio de processos bioquímicos. Essa transformação ocorre em dois métodos principais: a Fermentação Submersa (FS) e a Fermentação em Estado Sólido (FES) (SUKMA; JOS; SUMARDIONO, 2018). Ambos os métodos são amplamente empregados na obtenção de diversos produtos, especialmente no setor industrial, onde os microrganismos são utilizados para converter substratos complexos em moléculas mais simples (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

A FES, em particular, utiliza uma matriz sólida e requer baixo teor umidade. Nesse processo, é essencial que o substrato ou suporte forneça umidade e nutrientes para sustentar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos (VANDENBERGHE *et al.*, 2021). Essa técnica desempenha um papel crucial na produção de diversos compostos de interesse industrial, incluindo enzimas, pigmentos, bioetanol, compostos aromáticos, antibióticos e micotoxinas, sendo as enzimas um dos principais produtos buscados (LONDOÑO-HERNANDEZ *et al.*, 2020).

Com o aumento da industrialização, a geração de subprodutos agroindustriais tem crescido, resultando em preocupações ambientais. Nesse contexto, há uma demanda crescente por alternativas de reaproveitamento desses resíduos, como a utilização na produção de enzimas por meio da FES, pois esses subprodutos oferecem vantagens como disponibilidade, baixo custo e composição adequada para o crescimento microbiano (ERGUN; UREK, 2017).

Diversos tipos de resíduos agrícolas e florestais são comumente empregados como substratos e suportes na FES. Entre eles, destacam-se grãos de cereais, sementes de leguminosas, farelos como aveia e soja, tortas (resíduos sólidos de prensagem ou extração de óleo de sementes oleaginosas), bagaços de cana-de-açúcar e mandioca, polpas e cascas de frutas e café, palhas, serragens, lascas de madeira, e outros materiais de origem vegetal e animal (FARINAS, 2015; SADH; DUHAN; DUHAN, 2018). Esses substratos e suportes são de baixo custo, facilmente disponíveis e fornecem todos os nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (PALUZAR; TUNCAY; AYDOGDU, 2021).

O destaque da FES reside no fato de ser um processo bioquímico em que os microrganismos crescem em um material fermentável, que atua como fonte de nutrientes e suporte, ou em um suporte inerte enriquecido com meio de cultura e umidade (LONDOÑO-HERNANDEZ *et al.*, 2020). Durante esse processo, os microrganismos excretam enzimas e realizam o catabolismo dos nutrientes disponíveis, promovendo seu crescimento e gerando metabólitos (SOCCOL *et al.*, 2017).

A FES representa uma abordagem econômica, utilizando substratos relativamente simples para a produção de enzimas extracelulares, principalmente provenientes de fungos. Isso se deve à semelhança com o habitat natural desses microrganismos, onde podem crescer e liberar produtos com alto valor agregado durante seu metabolismo (STEUDLER; WERNER; WALTHER, 2019).

As vantagens em utilizar FES incluem menor suscetibilidade à contaminação, menor necessidade de esterilização, maior produtividade enzimática, menor suscetibilidade à inibição relacionada ao substrato, uso de resíduos agroindustriais e atividade do substrato sem a necessidade de adição de solventes orgânicos, tornando o processo mais ecológico e econômico (SOCCOL *et al.*, 2017).

A variação das condições de cultivo durante a fermentação, como umidade relativa, tamanho da partícula, quantidade de água, temperatura, pH, tempo de fermentação, quantidade de inóculo e disponibilidade de oxigênio, influenciam diretamente na formação dos produtos e, portanto, requer um controle rigoroso para garantir a eficiência do processo (POLETTO *et al.*, 2017).

Considerando a ampla aplicabilidade e o potencial das lipases, há uma clara necessidade de maior investigação nessa área (AGUIEIRAS *et al.*, 2018). A Tabela 2 apresenta alguns estudos que utilizam sólidos fermentados provindos de leveduras e suas respectivas aplicações, ilustrando o potencial e a diversidade de aplicações da FES na produção de diversos produtos de interesse industrial.

Tabela 2. Sólidos fermentados de lipases provindos de leveduras e suas aplicabilidades na biotecnologia

Espécie de microrganismos	Sólido fermentado	Aplicações	Referências
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Cascas de melancia	Despolimerização do polietileno tereftalato (PET)	Sales <i>et al.</i> , 2020.
<i>Candida viswanathii</i>	Farelo de trigo com grão de cevada	Hidrólise da gordura de frango	Almeida <i>et al.</i> , 2016.

<i>Trichoderma harzianum</i>	Torta de azeitona	Compostos de sabor	Laufenberg; Kunz; Nystroem, 2003.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Resíduos agroindustriais mistos	Compostos de sabor	Mantzouridou; Paraskevopoulou; Lalou, 2015.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Farelo de soja	Síntese de ésteres	De Souza <i>et al.</i> , 2019.

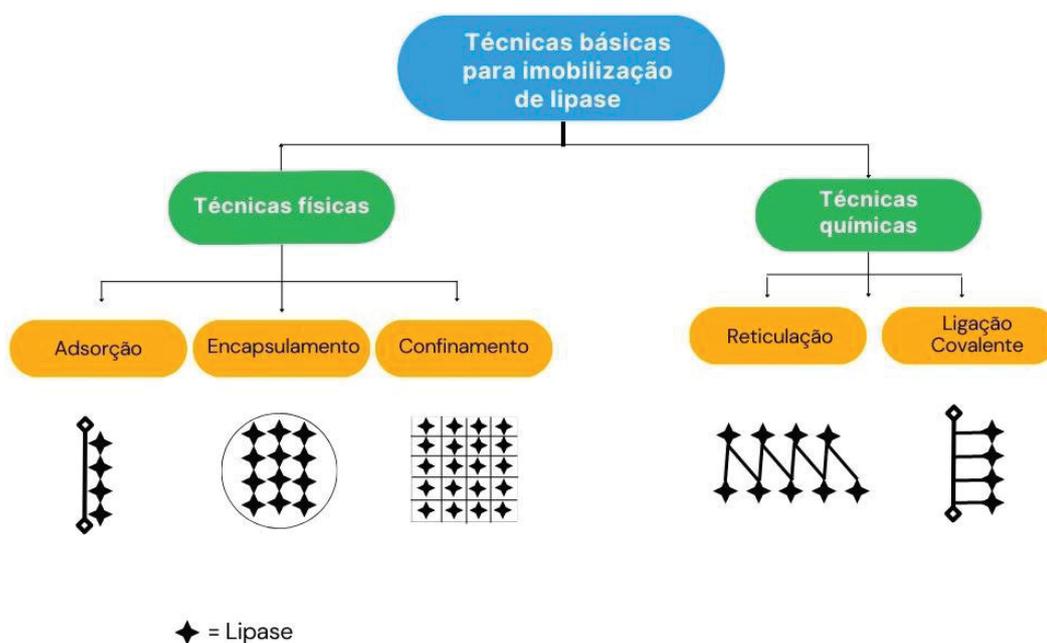
Fonte: A autora

2.6 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

Um aspecto crucial para aumentar a eficiência e a viabilidade econômica da utilização de enzimas produzidas por FES é a sua imobilização. A técnica de imobilização de enzimas consiste em aprisionar a enzima, seja por métodos físicos, como adsorção, encapsulamento e confinamento, ou por métodos químicos, como reticulação e ligação covalente, em uma matriz sólida. Essa abordagem oferece diversas vantagens, incluindo maior resistência da enzima a variações de pH, temperatura e solventes orgânicos, além de proporcionar maior possibilidade de reutilização da enzima (FATIMA *et al.*, 2021).

Na Figura 3, é possível visualizar como funcionam esses diferentes métodos empregados na imobilização de enzimas.

Figura 3 - Técnicas físicas e químicas utilizadas para imobilização da lipase



Fonte: A autora

A técnica de adsorção é a mais simples e eficiente em que a enzima é imobilizada nos suportes por ligações fracas como força de 'Van der Waals', ligações de hidrogênio e conexão hidrofóbica (CARVALHO *et al.*, 2020). As técnicas de aprisionamento e encapsulamento restringem a enzima em uma matriz polimérica ou microcápsulas permitindo o escoamento dos produtos ou substratos utilizados na aplicação (NIGAM *et al.*, 2014). A ligação covalente é a técnica mais eficiente devido as fortes interações entre o suporte e a enzima, é formado entre um grupo funcional na superfície da molécula de proteína da enzima e um grupo funcional na superfície do suporte. Na técnica de reticulação cria um agregado reticulado bidimensional insolúvel em água (ABDULMALEK; YAN, 2022).

Os suportes que são comumente empregados para imobilização de lipase são nanofibras, monólitos poliméricos, materiais mesoporosos, nanomateriais, membrana e celulose (LIU *et al.*, 2020). Algumas das partículas utilizadas para imobilização inclui calcita, carvão ativado, quitosana, óxido de grafeno, nanopartícula de magnetita, sílica em gel, resinas, poliuretano, zeolita, entre outros (KUMAR; THAKUR, 2020).

A ciência da imobilização enzimática demanda uma abordagem multidisciplinar que engloba diversas áreas do conhecimento, incluindo ciência dos materiais, química de superfícies, química de proteínas, biofísica, biologia molecular, biocatálise e engenharia química (GUISAN *et al.*, 2020). Essa interdisciplinaridade é essencial para compreender os princípios fundamentais por trás da imobilização de enzimas, desenvolver novos suportes e técnicas de imobilização, bem como otimizar o desempenho e a estabilidade das enzimas imobilizadas em uma variedade de aplicações industriais e biotecnológicas.

2.7 QUITOSANA

A quitosana ($C_8H_{11}O_4N$)_n é um polissacarídeo derivado *N*-desacetilado da quitina ($C_8H_{13}O_5N$)_n, o segundo biopolímero mais abundante na natureza, e durante a desacetilação existe uma substituição do grupo acetamino por um grupo amino (HISHAM *et al.*, 2021). A quitina, que é encontrada nas paredes celulares de fungos e nas cascas de crustáceos, como caranguejos, camarões, lagostas e krills (espécie semelhante ao camarão) (YOUNES; RINAUDO, 2015).

A quitosana é amplamente preferida em relação ao seu precursor, a quitina, devido a uma série de vantagens significativas como compostos orgânicos, alta solubilidade em soluções ácidas, capacidade adesiva, biocompatibilidade e características catiônicas, o que conferem à quitosana uma versatilidade superior em várias aplicações industriais e biomédicas (PETER *et*

al., 2021). Além disso, a quitosana é mais suscetível à hidrólise enzimática em comparação com a quitina, o que facilita sua degradação e processamento (OMAR *et al.*, 2022).

A quitosana pode ser classificada em quatro graus distintos, dependendo do nível de desacetilação do polímero. O baixo grau de desacetilação, variando entre 55-70%, caracteriza-se por uma maior proporção de grupos acetamida, no grau médio, entre 71-85%, essa proporção diminui, enquanto no grau alto, entre 86-95%, a desacetilação é ainda mais evidente, por fim, o ultra-alto grau, entre 96-100%, indica uma quase completa desacetilação do polímero (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). Essas variações conferem propriedades específicas à quitosana, influenciando diretamente em suas aplicações em diferentes campos, como na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e biomédica.

Diante disso, esse biopolímero linear possui grupos amino e hidroxila reativos, proporcionando sítios de ligação favoráveis para as enzimas (COSTA-SILVA *et al.*, 2021). Sua capacidade de resposta ao pH permite ajustar as condições de imobilização de acordo com as necessidades específicas do processo, o que a torna uma escolha viável em muitas aplicações industriais (VERMA *et al.*, 2020). Sua resistência ao ataque microbiano e sua alta afinidade por proteínas são atributos valiosos, garantindo estabilidade e eficiência na imobilização de enzimas (RAFIEE; REZAEI, 2021).

A quitosana bruta pode passar por diversos processos de modificação para atender a diferentes necessidades, podendo ser transformada em formas variadas como pó, flocos ou hidrogéis, incluindo esferas, membranas e filmes, através de modificações físicas (LIU; GOU, 2024). No entanto, é essencial destacar que a quitosana na forma de pó ou flocos geralmente exibem uma estrutura cristalina mais evidente, podendo restringir sua capacidade de adsorção, uma vez que a adsorção é predominantemente favorecida na região amorfa dos cristais (VAKIL *et al.*, 2013).

A quitosana destaca-se como um biopolímero extremamente versátil para a imobilização enzimática devido à sua capacidade de reagir com uma variedade de compostos ativadores bifuncionais (RODRIGUES *et al.*, 2019). Estes compostos incluem epicloridrina, tripolifosfato de sódio (TPP), glutaraldeído, glicidol, ácido cítrico, etilenodiamina (EDA), genipina, glioxal, polialdeídos e outros (OKURA *et al.*, 2020). Esses grupos funcionais presentes na quitosana permitem a formação de ligações covalentes com as enzimas, proporcionando uma ancoragem estável e eficaz no suporte, o que resulta em uma imobilização robusta e duradoura (COSTA-SILVA *et al.*, 2021).

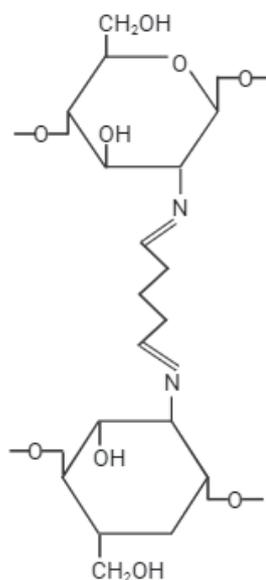
2.8 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA QUITOSANA

O objetivo das modificações químicas aplicadas a um suporte como a quitosana, é criar esferas de hidrogel avançadas, que possuam propriedades físico-químicas aprimoradas e uma gama mais ampla de funcionalidades. Essas alterações melhoraram as características do material, como a introdução de grupos funcionais que facilitam a imobilização de enzimas e ampliam suas possíveis aplicações, e como resultado aumentam a capacidade de adsorção, eleva a resistência mecânica, aumenta a eficiência de encapsulamento e apresenta um perfil de liberação mais preciso e desejável (QU; LUO, 2020).

A reticulação é uma das técnicas mais frequentemente empregadas em modificações químicas, em que um agente químico reage com pelo menos dois grupos na estrutura da quitosana, atuando como um agente de reticulação, resultando em uma melhoria significativa da resistência mecânica e da estabilidade coloidal do suporte, fortalecendo assim a estrutura do material (WANG; CHEN, 2014).

Entre os agentes reticulantes, o glutaraldeído desempenha um papel fundamental ao reagir com os grupos amino presentes na quitosana, gerando grupos aldeído que, por sua vez, reagem com a enzima para formar uma ligação imina (ligação química formada entre um grupo aldeído ou cetona e um grupo amino primário ou secundário). Essa reação é essencial para a imobilização eficaz da enzima na matriz de quitosana, garantindo sua estabilidade e eficiência catalítica (PITA-LÓPEZ *et al.*, 2021). Na Figura 4 podemos observar a ligação covalente entre o glutaraldeído e a quitosana estabelecida por meio da reação da ligação imina resultado na formação de uma ligação cruzada entre as moléculas de glutaraldeído e os grupos amino da quitosana, promovendo a reticulação da matriz polimérica.

Figura 4 - Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído. Os grupos amino da quitosana reagem com o glutaraldeído, formando ligações cruzadas covalentes entre as moléculas de quitosana, resultando em uma estrutura reticulada.



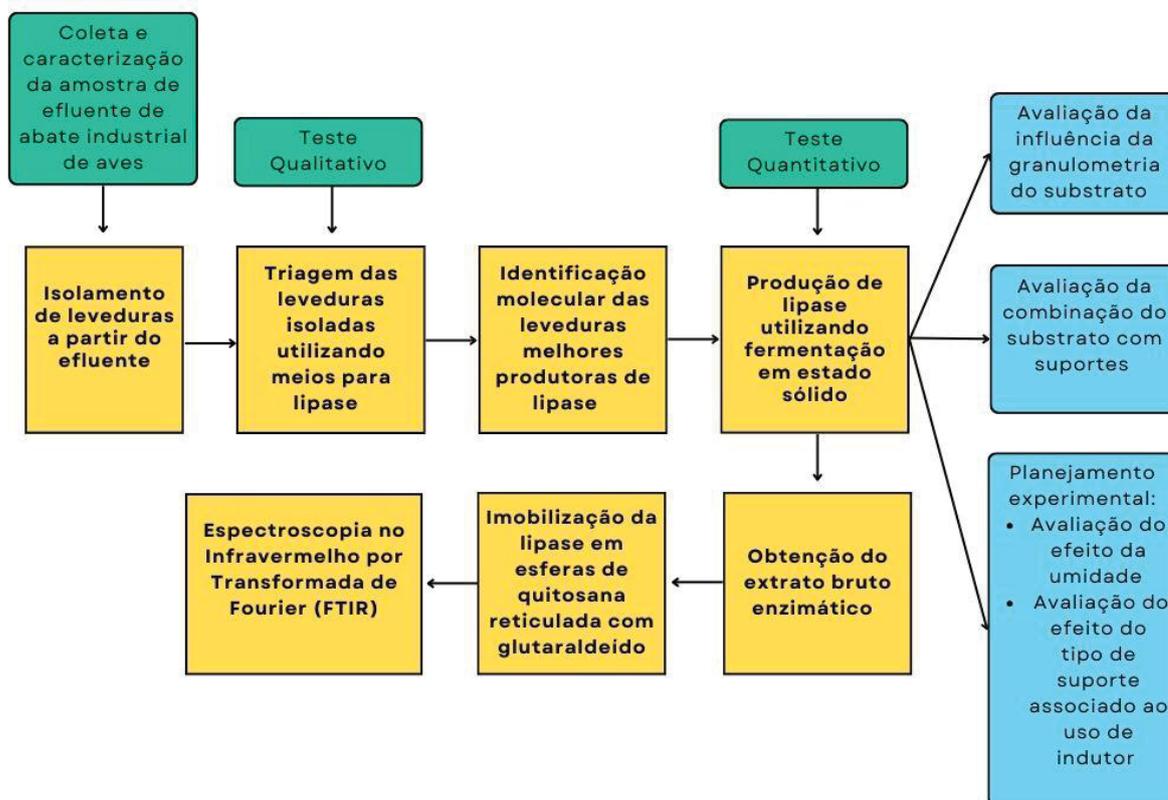
Fonte: A autora

Com isso, compreender os detalhes dessa reticulação é crucial para a otimização do processo de imobilização enzimática. A seguir, será apresentado a seção de Material e Métodos, onde detalharemos as metodologias empregadas nesta pesquisa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, encontram-se as metodologias empregadas, utilizando como base um fluxograma para ilustrar de maneira simplificada as etapas desenvolvidas nesse trabalho, conforme Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma referente às etapas dos experimentos realizadas durante o trabalho.



Fonte: A autora

3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE DE ABATE INDUSTRIAL DE AVES

As leveduras foram obtidas de amostra do efluente coletado na entrada da caixa de equalização durante o período de abate, ou seja, o efluente já tinha passado pela etapa de peneiramento em que resíduos maiores como pele foram contidos, etapa constituinte do tratamento primário de um abatedouro industrial de aves, localizado na cidade de Palotina (24°17'5.09"S 53°49'52.74"O), região Oeste do Paraná, (Figura 6). O efluente foi acondicionado em recipiente de plástico de 5 litros, limpo e esterilizado.

Figura 6 - Localização geográfica da cidade onde foi realizada a coleta do efluente do abate industrial de aves para seleção das leveduras



Fonte: A autora

As amostras de efluente foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, localizado no *Campus* de Toledo-PR, para análise.

As análises para determinar as características físico-químicos foram realizadas seguindo os métodos e referências pertinentes, descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos do efluente de abate industrial de aves

Parâmetros	Unidade	Métodos ou referências utilizadas
pH	-----	Sonda multiparâmetro.
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	(mg L ⁻¹)	Método 5210- B (5 dias à 20 °C). Apha, 1995.
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	(mg L ⁻¹)	DQO o método 5220-D (refluxo fechado). Apha, 1995.

Óleos e Graxas (O&G)	(mg L ⁻¹)	Apha, 1995.
-------------------------	-----------------------	-------------

Fonte: A autora

3.2 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS A PARTIR DO EFLUENTE

Alíquotas de 250 µL foram semeadas por espalhamento em superfície utilizando pérolas de vidro esterilizadas, em placas de Petri contendo meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona, 2% de ágar bacteriológico), suplementado com 0,05% de cloridrato de tetraciclina para inibir o crescimento bacteriano. As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C por 48 horas (CARVALHO *et al.*, 2021). O isolamento das leveduras foi realizado por meio de sucessivas inoculações em ágar YPD com antimicrobiano, utilizando o método de esgotamento, até a obtenção de culturas puras.

3.3 TRIAGEM DAS LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO MEIOS PARA LIPASE

As colônias selecionadas foram submetidas a dois métodos seletivos para comparar sua capacidade de atividade enzimática extracelular para lipase e avaliar a adaptação das cepas ao meio. Inicialmente, as leveduras foram cultivadas em meio ágar YPD e, em seguida, submetidas ao método de inoculação por ponto em placas contendo meios específicos para lipase.

Para identificar as leveduras produtoras de lipase, foram utilizados meio base composto por MgSO₄ (0,02%), NaCl (0,01%), extrato de levedura (0,04%), KH₂PO₄ (0,04%) e K₂HPO₄ (0,01%), ágar bacteriológico (2,0 %) ao qual foram complementados com 1% de azeite de oliva extra-virgem (nível de acidez 0,5%), 0,001% de corante rodamina B e outro meio com todos os itens acima citados e a adição de 0,01% de Tween 80, afim de verificar a influência desse surfactante. As cepas produtoras de lipase foram verificadas pela formação de um halo alaranjado fosforescente quando expostas à luz ultravioleta de 366 nm (OLIVEIRA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2024).

Os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos, e os experimentos foram conduzidos em triplicata, sendo incubados por um período de 96 horas a temperaturas de 25, 30 e 35 °C, visando encontrar a melhor temperatura de produção qualitativa da lipase.

A atividade enzimática dos isolados foram estimadas mediante a Equação 1, em que o índice enzimático (IE) consiste na relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia (em milímetro), conforme Hankin e Anagnostakis, (1975).

Eq. (1)

$$IE = \frac{\text{DIÂMETRO MÉDIO DO HALO DE DEGRADAÇÃO}}{\text{DIÂMETRO MÉDIO DE CRESCIMENTO MICROBIANO}}$$

3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS MELHORES PRODUTORAS DE LIPASE

As análises moleculares para a identificação genética das leveduras isoladas seguiram as etapas e protocolos padrões do Departamento de Biociências da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina.

3.4.1 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA das leveduras foi realizada utilizando a técnica modificada de Brandão *et al.* (2011). As leveduras com capacidade lipolítica identificadas na análise triagem, foram ativadas em meio placas de Petri contendo meio ágar YPD e incubadas à 30 °C por 24 h. Após esse período, as leveduras foram ressuspensas em tubo tipo Eppendorf contendo 100 µL de tampão de lise celular (50 mmol Tris L⁻¹, 250 mmol NaCl L⁻¹, 50 mmol EDTA⁻¹, 0,3% w/v SDS, pH 8), homogeneizado e incubado a 65 °C por 30 minutos em banho seco, após, foi adicionado 200 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado por inversão. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos.

Em seguida, 65 µL foram retirados do sobrenadante e transferidos para um novo tubo Eppendorf, adicionando isopropanol (v/v) ao sobrenadante, homogeneizando por inversão e mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado 200 µL de etanol 70% gelado (homogeneizado por inversão), seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos e novamente descartado o sobrenadante. Por fim, a amostra foi seca a temperatura ambiente *overnight*. Após, as amostras foram hidratadas com 50 µL de tampão TE (tampão de extração) pH 8 (Tris-EDTA) em banho seco à 37 °C por 30 minutos. Para verificar a quantidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas a dosagem em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

3.4.2 Amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Eletroforese e *Fingerprint*

Os perfis genéticos das leveduras isoladas foram realizados por meio das impressões digitais do DNA (*fingerprint*), obtidos pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

utilizando o *primer* microssatélite (GTG)⁵ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), como etapa preliminar para o agrupamento e escolha dos indivíduos representativos para posterior sequenciamento. A reação foi realizada utilizando o kit Sinapse com os seguintes reagentes: 16,8 µL de H₂O MiliQ (autoclavada), 2,5 µL de solução tampão a uma concentração de 10x, 1,5 µL de MgCl₂ a uma concentração de 25 mM, 2,0 µL do *primer* a uma concentração de 10 pmol, 1,0 µL de dNTP a uma concentração de 10 mM, 0,2 µL de Taq polimerase a uma concentração de 5 U µL⁻¹ e 1 µL do DNA.

As amostras foram submetidas ao termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*) com perfil térmico de 40 ciclos: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. A amplificação do DNA (*Amplicon*) foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1,5% em Tampão TBE 0,5x) e configurado a V: 90 v, I: 360 mA, P: 080 watts por 50 minutos. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta comparando a similaridade das bandas para determinar os *fingerprints*.

Para correr em gel em eletroforese, foi utilizado o padrão de 1 kb pares de base (2 µL) e corante GelRed (3 µL), já para as amostras foram utilizados 3 µL do corante GelRed e 5 µL do DNA. Uma amostra para controle negativo (sem o DNA) também foi utilizado na análise.

3.4.3 Amplificação do gene 26S, Purificação do Amplicon e Sequenciamento Genômico

As leveduras selecionadas após o *fingerprint*, foram submetidas a uma nova amplificação com os *primers* NL 1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL 4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se anelam nos domínios D1-D2 na região do gene 26S que é um gene conservado utilizado para identificar espécies. Foram utilizados 38,8 µL de água MiliQ ultrapura, 5,0 µL de tampão (10x), 1,0 µL do *primer* NL 1, 1,0 µL do *primer* NL 4, 2,0 µL de dNTP (10mM), e 0,2 µL de Taq Polimerase (5 U). Foi misturado 3,0 µL do mix acima com 2,0 µL do corante reagente GelRed para posterior PCR.

O programa do termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*) constituiu em 95 °C por 2 minutos e 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos minuto e extensão a 72 °C por 20 segundos e o último ciclo de 72 °C por 7 minutos. O *amplicon* foi verificado por eletroforese em gel de agarose (1,0% em Tampão TBE 0,5x) corado com o GelRed, configurado a V: 120 v, I: 360 mA, P:080 watts por 20 minutos. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta observando-se a similaridade das bandas.

Para a purificação de cada produto amplificado em PCR com os iniciadores NL1/NL4, foram utilizados: 47,0 µL do *amplicon*, 11,75 µL de EDTA (125mM), 141 µL de etanol

absoluto. As amostras foram homogeneizadas por inversão, mantidas em repouso por 15 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 25 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado 120 µL de etanol 70%, homogeneizado por inversão e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. No final desse processo, o sobrenadante foi retirado e descartado com auxílio de uma pipeta. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente para secar *overnight*.

Após esse período, as amostras foram hidratadas com 10 µL de água MiliQ ultrapura por 30 minutos em banho seco à 37 °C. O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos da purificação do PCR usando um sequenciador automático MegaBace™ 1000 (*Amersham Biosciences*). As sequências de DNA foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (MEDEIROS *et al.*, 2012).

3.4.4 Análise filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas usando o software MEGAX 11, e alinhadas usando o algoritmo ClustalW. A árvore filogenética foi construída com o algoritmo *Neighbour-joining*, usando o método Kimura w-parameter (KÜSTER; WILLIAMS, 1964) como modelo de substituição de DNA.

3.5 PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

3.5.1 Determinação da composição centesimal do substrato e dos suportes utilizados na FES

As análises de umidade, cinzas e óleos e graxas foram conduzidas em triplicata no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, localizado em Toledo-PR. Para a determinação da composição centesimal, foram seguidos os protocolos descritos pela AOAC, 2016 e APHA (2012), método 5520D.

3.5.1.1 Determinação do teor de umidade

Para determinar o teor de umidade, as amostras foram trituradas até formarem um pó fino. Em seguida, 3 g da massa foram pesadas em uma balança analítica e colocadas em placas de Petri previamente tratadas (1 hora em estufa a 105 °C). As placas foram então armazenadas em estufas a 105 °C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para um dessecador com sílica gel, até atingirem a temperatura ambiente e submetidas a uma nova pesagem até que o peso se tornasse constante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5.1.2 Determinação do teor de cinzas

Para a determinação quantitativa das cinzas totais, foram pesados 3 g da amostra e colocadas em cadinhos de porcelana previamente calcinados, resfriados e pesados. Em seguida, a amostra foi distribuída uniformemente nos cadinhos e incineradas em mufla a 550 °C por 5 horas. As porcentagens de cinzas foram então calculadas em relação ao substrato após a secagem. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

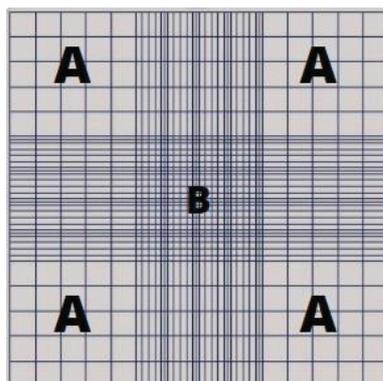
3.5.1.3 Determinação do teor de óleo

Para determinar o teor de óleo, empregou-se o extrator de Soxhlet. Foram pesadas 10 g da amostra em balança analítica, acondicionadas em cartucho e colocadas em extrator Soxhlet, submetidas ao refluxo contínuo com 300 mL do solvente (*n*-hexano). O condensador foi acoplado enquanto a manta de aquecimento foi ligada a uma temperatura de 70 °C por um período de extração de 8 horas, contadas a partir do início da ebulição. Após esse período, o solvente foi removido por evaporação em estufa de circulação de ar e as amostras secas foram pesadas novamente. Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

3.5.2 Ativação e preparo dos inóculos

As leveduras, denominadas JC030, JC031, JC032, JC033, JC034 e JC039 (identificadas como as melhores produtoras de lipase no teste qualitativo), foram ativadas a partir do meio BHI/Glicerol para placas de Petri contendo meio ágar YPD. Após o crescimento, foram ressuspendidas em Erlenmeyer de 250 mL contendo caldo YPD e 0,05% de cloridrato de tetraciclina, e incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer nos quatro campos da extremidade (quadrantes A) e na parte central (quadrante B) em microscópio óptico, para determinar a concentração necessária em mL (10^8 células) para cada 1 g do substrato, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Marcações em quadrantes (A e B) utilizados para contagem em câmara de Neubauer.



Fonte: A autora

Depois da contagem, o número total de células foi aplicado nas Equação 2 e Equação 3 para determinar a quantidade do inóculo que seria utilizado, onde o volume das células foram calculados pelas seguintes equações:

$$\text{Células/mL} = n \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot f \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

n = Média das células nos quadrantes da câmara de Neubauer

$5 \cdot 10^4$ = Constante da câmara de Neubauer.

f = Fator de diluição

$$V \text{ inóculo} = \frac{G_{\text{substrato}} \cdot C}{\text{células/mL}} \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que:

V.inóculo = Volume do inóculo a ser adicionado em mL por grama do substrato

Gsubstrato = Gramas do substrato utilizado

C = Concentração inicial de células $1 \cdot 10^8 / \text{g}^{-1}$

Células/mL = Células por mL.

3.5.3 Condições de cultivo para produção de lipase

Todos os experimentos de avaliação da produção de lipase foram conduzidos da seguinte forma: 10 g do substrato ou substrato/suporte foram pesados em Erlenmeyer de 150 mL e os teores de umidade ajustados utilizando solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (50 mM), considerando uma concentração de inóculo de $1 \cdot 10^8$ células por grama. Todos os materiais utilizados foram esterilizados previamente. Posteriormente, os experimentos foram incubados em estufa bacteriológica a 30 °C por 144 horas, sendo retiradas amostras em triplicata a cada 24 horas e congeladas a -20 °C para interromper o processo fermentativo. Uma amostra denominada controle (branco), nas mesmas condições, mas totalmente esterilizada foi utilizada para fins comparativos com as amostras contendo inóculo. Após, as amostras de sólido fermentado que estavam congeladas, foram retiradas e dispostas em placas de Petri abertas em uma estufa de circulação de ar a 30 °C, onde permaneceram por 48 horas para secagem.

3.5.4 Avaliação da influência da granulometria do substrato

Para determinar a melhor granulometria do substrato farelo de semente de girassol (FSG) (*Helianthus annuus*) utilizou-se a metodologia proposta por De Moura-Dickel *et al.* (2022) e Bialeski *et al.*, (2024), onde as sementes de girassol foram trituradas e classificadas em granulometrias de 4,75 mm (4 mesh), 2,00 mm (10 mesh) e 1,18 mm (14 mesh), conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Granulometrias do substrato sementes de girassol



Legenda: (A) 4,75 mm; (B) 2,00 mm; (C) 1,18 mm.

Fonte: A autora

3.5.5 Avaliação da combinação do substrato com suportes

Foram utilizados dois suportes considerados resíduos agroindustriais, sendo eles casca de arroz (CA) (*Oryza sativa*) e casca de ovos (CO) (Figura 9) com a levedura *Wickerhamiella osmotolerans* JC030. Os suportes foram triturados, peneirados e separados em diferentes granulometrias, e as combinações foram conduzidas com 50% FSG (1,18 mm) + 50% CA (4,75 mm) (FSG/CO), e 50% FSG (1,18 mm) + 50% CO (FSG/CO). Os experimentos foram conduzidos utilizando tanto a combinação de substrato com suportes (CA e CO), quanto 100% FSG, para fins comparativos de viabilidade.

Figura 9 - Suportes de casca de arroz e casca de ovo utilizados na fermentação em estado sólido



Legenda: casca de arroz (A) e casca de ovo (B).

Fonte: A autora

Em todos os experimentos de avaliação na produção de lipase, as amostras foram submetidas as condições de cultivo proposto no item 3.5.3 e dosadas a atividade da lipase conforme item 3.9.1.1.

3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3.6.1 Avaliação do efeito da umidade na FES para produção de lipase

No estudo quantitativo da FES com a levedura *W. osmotolerans* JC030, foram realizados experimento considerando o substrato FSG e a combinação de substrato com suportes FSG/CA e FSG/CO na proporção 1:1. Cada experimento foi feito considerando os três níveis de umidade (50, 55 e 60%), tendo como resposta a atividade lipolítica (AL). Foi realizada a análise de variância ANOVA fatorial, seguida do teste de Tukey para comparação das médias da AL.

3.6.2 Avaliação do efeito do tipo de suporte associado ao uso de indutor na FES

Foram avaliados os efeitos das variáveis (fatores) Substrato (FSG/CA e FSG/CO) e os Indutores (azeite de oliva – AO, óleo de girassol – OG e sem indutor S/I) sobre o resultado da AL. Neste caso, foram utilizados 2 níveis para o Substrato e 3 níveis para o Indutor, conforme indicado na Tabela 4, para a configuração de um planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis. Foram realizados experimentos em triplicata o que resultou em 18 ensaios em sequência aleatória. O tipo de planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis foi capaz de gerar, para 2 fatores, um modelo conforme a Equação 4.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_2^2 + \beta_4 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad Eq. (4)$$

Onde Y corresponde a resposta AL em $U\ g^{-1}$, os valores de β correspondem aos coeficientes das variáveis na sua forma linear (β_1 e β_2) e quadrática (β_3), o coeficiente β_0 corresponde ao intercepto e β_4 ao coeficiente da interação das variáveis. Para o fator indutor (x_2), além do termo linear também foi gerado um termo quadrático devido ao fato de apresentar 3 níveis.

Tabela 4. Níveis dos fatores

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Substrato (x_1)	FSG/CA	-	FSG/CO
Indutor (x_2)	AO	S/I	OG

Legenda: Substrato: 2 níveis (-1 e +1); Indutor: 3 níveis (-1, 0 e +1).

Fonte: A autora.

As condições de cultivo e dosagem da AL seguiu os passos descritos nos itens 3.5.3 e 3.9.1.1, porém foi utilizado o melhor tempo determinado anteriormente, sendo de 24 horas de fermentação.

3.7 EXTRAÇÃO DA ENZIMA DO SÓLIDO FERMENTADO

Para realizar a extração das enzimas, o método baseado foi de Putri *et al*, (2020) com modificações, que consiste em utilizar solução tampão fosfato de sódio pH 7 (50 mM) e uma solução tampão fosfato de sódio pH 7 (50 mM) associada a dois surfactantes: Triton X-100 e Tween 80 ambos a 0,2%. Uma mistura de sólido fermentado levemente macerado e solução extratora (na proporção de 1:5) foram colocados em Erlenmeyer 150 mL e agitados durante 20 e 40 minutos em um agitador orbital a 150 rpm e 30 °C para determinar o melhor tempo de extração. Em seguida, a mistura foi filtrada utilizando uma bomba a vácuo com filtro de papel para separar o sólido do líquido contendo a lipase. O extrato resultante foi então centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm. Após determinar o melhor tempo de extração, foram realizadas variações na concentração dos surfactantes de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0%. A eficiência do processo de extração foi avaliada conforme descritos no item 3.9.1.1, exceto que foram utilizadas alíquotas do extrato resultante da centrifugação para a dosagem. Portanto, a atividade lipolítica dos extratos foi expressa em $U\ mL^{-1}$

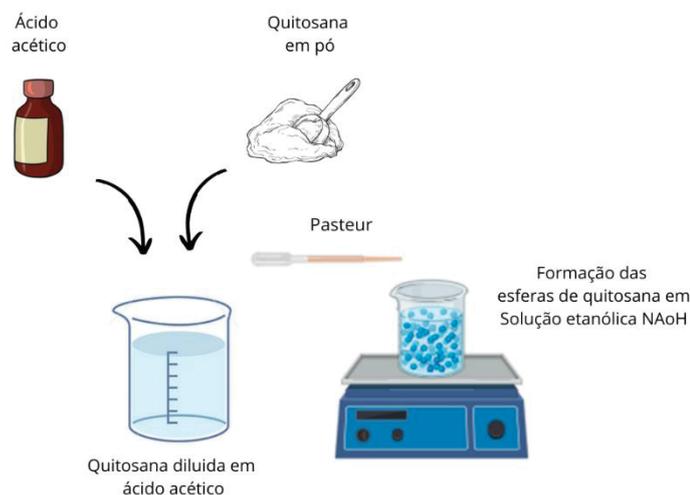
3.8 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM ESFERAS DE QUITOSANA

A imobilização da lipase em esferas de quitosana foi realizada com o objetivo de explorar o potencial dessas esferas como suporte para a enzima. O processo de imobilização envolveu diversas etapas, desde a preparação das esferas de quitosana até a incubação com a enzima.

3.8.1 Síntese e funcionalização das esferas de quitosana

As esferas de quitosana foram preparadas dissolvendo 2 g de quitosana desacetilada 85% em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) em Becker de 200 mL, mantido sob agitação com auxílio de um agitador magnético a 70 rpm em temperatura ambiente, até a completa homogeneização da solução, que durou em torno de 1 hora (HELAL *et al.*, 2021). Isso resultou em uma solução viscosa contendo aproximadamente 2,0% (m/v) de quitosana. Em seguida, a solução foi gotejada lentamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, em uma solução de 100 mL coagulante etanólica de NaOH 100 mM (NaOH:Etanol = 75:25), em Becker de 500 mL e mantidos em agitação constante com auxílio de um agitador magnético a 70 rpm em temperatura, conforme processo esquematizado na Figura 10.

Figura 10 - Processo esquemático de preparação das esferas de quitosana



Fonte: A autora

Esferas com diâmetros variando entre 1 e 2 mm foram formadas durante esse processo. A mistura foi deixada em repouso durante a noite em temperatura de 4 °C. Após, as esferas foram filtradas, lavadas várias vezes com água destilada, secas em estufas de circulação de ar a 45°C e armazenadas a 4 °C até o uso.

Posteriormente, as esferas de quitosana foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL com uma solução de tampão fosfato de sódio pH 7 (50 mM) contendo 1, 2 e 3% de glutaraldeído, na proporção de 1 g de esferas de quitosana para 25 mL de solução tampão fosfato de sódio com glutaraldeído. Essas esferas foram agitadas a 350 rpm por 60 minutos a 30 °C em um agitador orbital. Após o término do processo, as esferas foram deixadas em temperatura de 4 °C durante a noite, e após esse período foram filtradas, lavadas com água destilada para remover o excesso de glutaraldeído não reticulado, secas em estufa de circulação de ar a 45 °C e armazenadas a 4 °C até o uso (KUMAR *et al.*, 2014).

3.8.2 Imobilização de lipase em esferas de quitosana reticuladas em glutaraldeído

O método de imobilização empregado baseia-se no uso de glutaraldeído como agente bifuncional para formar uma ligação covalente entre a enzima e o polímero. Foram utilizadas esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído como suporte para imobilizar a lipase de *W. osmotolerans* JC030. A imobilização foi conduzida em Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL do extrato (contendo aproximadamente 120 U de atividade enzimática) e 1 g de esferas. Além disso, um extrato sem as enzimas, denominado "controle", foi utilizado para fins comparativos durante o processo de imobilização. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 30 °C e 150 rpm por 1, 2 e 3 horas, com o objetivo de determinar o melhor tempo para o acoplamento eficaz entre a enzima e o suporte (GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2018).

3.8.3 Cálculo do rendimento de imobilização

Para determinar o rendimento da imobilização, foram retiradas alíquotas de 1 mL do sobrenadante (em triplicata) contendo o extrato enzimático e o controle nos períodos mencionados anteriormente. Essas alíquotas foram dosadas quanto à AL pelo método titulométrico utilizando NaOH 50 mM (conforme descrito no item 3.9.1.1), com o objetivo de acompanhar o melhor tempo de imobilização, porcentagem ideal de glutaraldeído e seu rendimento de imobilização. Para determinar o percentual de rendimento da imobilização, foi utilizada a seguinte fórmula Equação 5 descrita abaixo (Helal *et al.*, 2021).

Eq. (5)

$$x = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{Atividade do extrato enzimático}} \cdot 100$$

3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.9.1.1 Determinação da atividade enzimática do sólido fermentado

A determinação da atividade lipolítica foi baseada em um método de titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela enzima a partir dos triacilgliceróis (STUER; JAEGER; WINKLER, 1986). O meio reacional para o substrato foi preparado como uma emulsão, composta de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, 10% goma arábica em pó e como substrato 7,15% de azeite de oliva extra-virgem (acidez 0,5%).

As amostras foram colocadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 1 g do sólido fermentado e 20 mL da emulsão para liberação dos ácidos graxos, levadas a agitador orbital a 150 rpm por 20 minutos a 37 °C, após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH (50 mM) contendo fenolftaleína como indicador de pH, com auxílio de um titulador (Bureta Eletrônica Digital Kasv), até atingir o pH final de 10. Os ensaios do controle (branco) também foram realizados até pH 10. Uma unidade (U) da atividade lipolítica (AL) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácidos graxos por minuto sob condições de ensaio. A AL foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U g^{-1}). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para determinar a AL (U g^{-1}), foi utilizado a Equação 6.

Eq. (6)

$$U = \frac{\Delta V}{\Delta t} \cdot \frac{MNaOH \cdot fc}{m}$$

Em que:

ΔV (mL) = V_m (volume médio das triplicatas) – V_b (volume gasto no controle)

$MNaOH$ = Concentração molar do NaOH (mM)

fc = Fator de correção da solução de NaOH

Δt = Tempo da reação em minutos

m = Massa em gramas da amostra na reação

3.9.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras das esferas de quitosana, esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído 1% em 1 hora (melhor resultado nas análises anteriores) e lipase imobilizada nas

esferas de quitosana reticulada foram caracterizadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Essa técnica qualitativa permite identificar os grupos orgânicos mais relevantes presentes nas amostras. Os espectros foram registrados no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , 8 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} usando os modos de transmitância e acessório de reflexão total atenuada (ATR) num espectrômetro FT/IR Frontier da Perkin-Elmer.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE UTILIZADO PARA ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

A caracterização da amostra de efluente foi conduzida, determinando o pH, turbidez, teor de óleos e graxas, DBO e DQO, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Análises físico-química do efluente de abate industrial de aves que foi utilizado para o isolamento das leveduras.

Parâmetros	Unidade
pH	6,09
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	3.032,43 mg L^{-1}
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	4.009,01 mg L^{-1}
Óleos e Graxas (O&G)	1.275,00 mg L^{-1}

Fonte: A autora

Como se pode observar, o pH do efluente se enquadra dentro da faixa considerada propícia para o crescimento microbiano (próximo de 7,0). Além disso, Hankin e Anagnostakis (1975) destacam que um pH próximo à neutralidade é ideal para a prospecção de microrganismos.

Os valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) se aproximam de estudos anteriores em efluente de abate industrial de aves conduzidos por Septiana *et al.* (2019), onde a DQO foi de 6.406,4 mg L^{-1} e a DBO de 3.215,8 mg L^{-1} . Esses valores refletem a alta quantidade de resíduos orgânicos presentes nos efluentes, como sangue, vísceras e gorduras, justificando o alto teor de O&G encontrado. Os parâmetros

de DBO e DQO servem como indicadores indiretos do teor de matéria orgânica nos corpos d'água, evidenciando o potencial de consumo do oxigênio dissolvido.

Conforme destacado por Basitere *et al.* (2019), a média da carga de O&G nos efluentes provenientes do abate industrial de aves é de 715 mg L⁻¹, variando entre mínimas de 156 mg L⁻¹ e máximas de 1.710 mg L⁻¹. Nesse contexto, observamos que os valores obtidos em nosso estudo estão alinhados com essa média padrão, evidenciando a consistência dos resultados em relação aos parâmetros estabelecidos para esse tipo específico de efluente.

Conforme ressaltado por Fonseca *et al.* (2019), a escolha da fonte de isolamento das leveduras pode ter um impacto significativo em sua capacidade de adaptação e tolerância a diferentes condições ambientais. De acordo com Salgado *et al.* (2020), os microrganismos capazes de produzir lipases são frequentemente encontrados em ambientes com alto teor lipídico, como resíduos agroindustriais, subprodutos do processamento de óleo vegetal, laticínios e solos contaminados por óleo, entre outros. Esses achados respaldam a escolha da fonte de isolamento dos microrganismos em nosso estudo, uma vez que buscamos aumentar a probabilidade de encontrar leveduras com potencial lipolítico.

4.2 TRIAGEM DAS LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO MEIOS PARA LIPASE

Das 39 leveduras isoladas, todas foram submetidas a teste qualitativo com o objetivo de identificar potenciais produtores de lipase, utilizando meios específicos para essa finalidade. Diante dessas análises, 31% dos isolados demonstraram capacidade de produzir e secretar lipase. O índice enzimático (IE) foi estimado pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. O diâmetro do halo de hidrólise é considerado um parâmetro rápido e simples para auxiliar na seleção qualitativa das linhagens com maior capacidade de degradação. Conforme descrito por Hankin e Anagnostakis, 1975, leveduras com um IE igual ou superior a 2,0 são consideradas boas produtoras de enzimas.

Devemos considerar que fatores externos, como temperatura e tempo de incubação, podem influenciar ligeiramente na medição do halo. Em resumo, essa primeira etapa constitui uma abordagem qualitativa para selecionar cepas que foram posteriormente submetidas a testes quantitativos para confirmar seu potencial enzimático. A Tabela 6 apresenta os resultados dos testes qualitativos de triagem para produção de lipase, com variação de temperatura.

Tabela 6. Índice enzimático (mm) das leveduras produtoras de lipase isoladas do efluente de abate industrial de aves, em temperaturas de 25 °C, 30 °C e 35 °C.

Código levedura	Índice enzimático médio (mm)		
	25 °C	30 °C	35 °C
JC018	-	1,33	-
JC026	1,33	1,95	-
JC027	-	1,33	-
JC028	-	1,25	-
JC029	1,25	1,50	-
JC030	1,66	2,50	-
JC031	2,00	2,50	-
JC032	1,66	2,25	-
JC033	1,75	2,50	-
JC036	1,20	1,80	-
JC037	-	1,25	-
JC039	1,75	2,25	-

Fonte: A autora

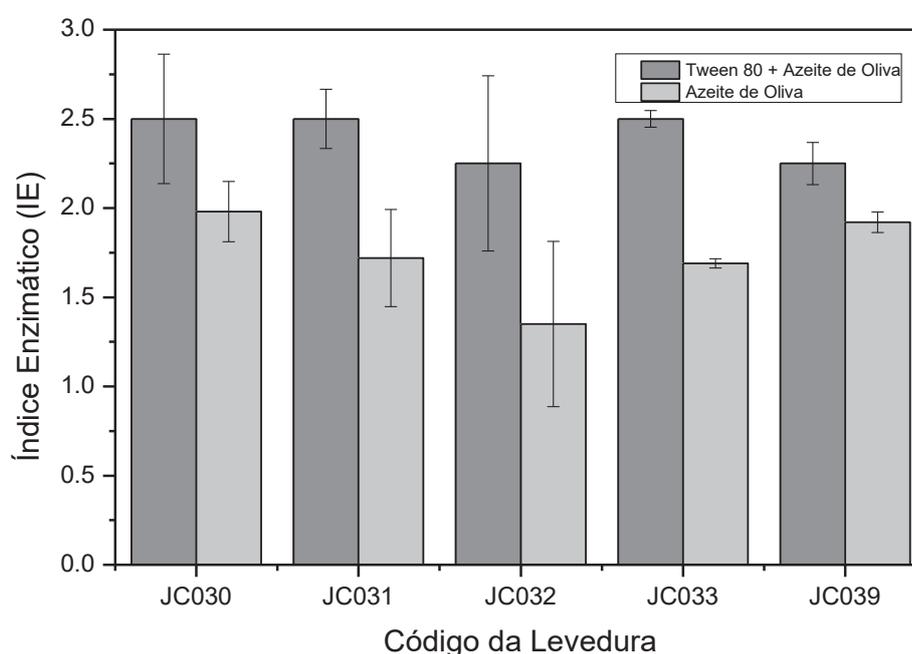
Legenda: (-) indica que não apresentou halo suficiente para medir

Ao analisar a influência da temperatura conforme os resultados da Tabela 6, observamos uma concordância com estudos prévios. Elegado *et al.* (2019), em seu estudo envolvendo leveduras isoladas de samambaias nas Filipinas, empregaram uma temperatura de 30 °C na triagem para lipase. Eldin, Kamel e Hossam (2019) isolaram leveduras da rizosfera no Egito e, em sua análise qualitativa de lipase, adotaram uma temperatura de 30 °C. Salgado *et al.* (2020) isolaram leveduras de águas residuais de oliva em Portugal e, durante a análise qualitativa para lipase, empregaram uma temperatura de 30 °C. Com isso, esses resultados corroboram com a temperatura de 30 °C como uma condição favorável para a expressão da atividade lipolítica em leveduras.

Podemos observar que, nas análises realizadas a 25 °C, as leveduras apresentaram halos menores em comparação com a temperatura proposta pela literatura (30 °C). Ao elevar a temperatura para 35 °C, não obtivemos resultados satisfatórios, pois o halo não pôde ser medido e a fosforescência era quase imperceptível. Com isso, podemos concluir que 30 °C foi a temperatura mais propícia, corroborando com os dados de trabalhos anteriores envolvendo isolados de leveduras.

A busca por microrganismos com habilidade lipolítica tem sido intensificada devido ao alto valor biotecnológico da enzima, dada a sua aplicabilidade em diversos setores industriais. Nesse contexto, foram selecionados os melhores produtores de lipase, ou seja, aqueles que apresentaram um IE igual ou superior a 2,0, para serem submetidos a testes de eficiência com a adição ou não do surfactante Tween 80 na composição do meio de triagem para produção de lipase. Os experimentos foram conduzidos mantendo a temperatura ideal de produção da enzima (30 °C), e os resultados estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Análise qualitativa de triagem para produção de lipases composta por meios com rodamina B, azeite de oliva e com e sem adição de Tween 80.



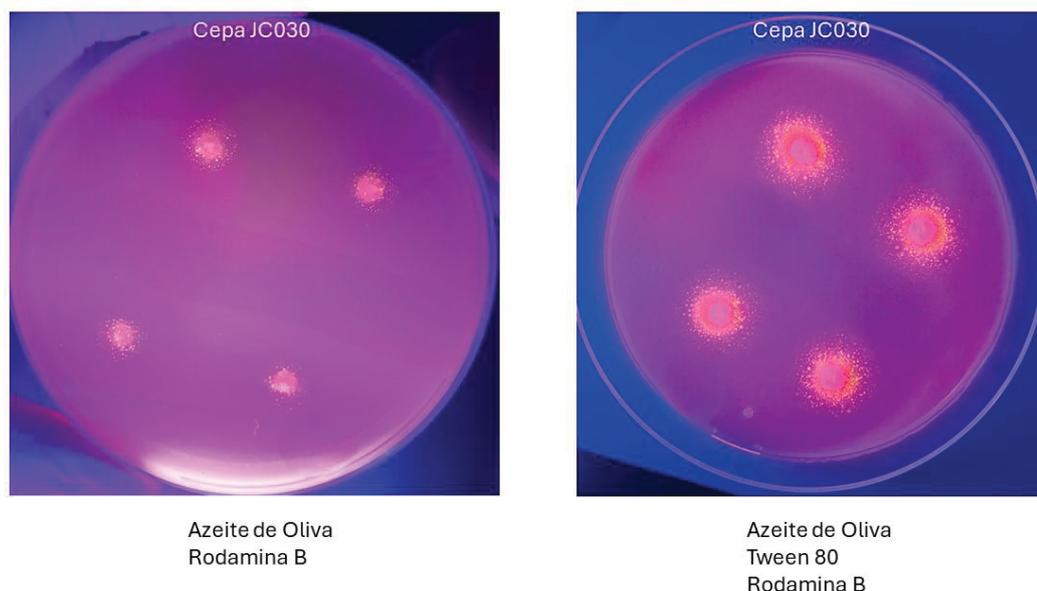
Fonte: A autora

A capacidade das leveduras em degradar lipase foi mais evidente com a utilização do azeite de oliva associado ao Tween 80 como surfactante (dispersante). Nesse contexto, foram identificadas 5 leveduras que apresentaram resultados positivos, considerados satisfatórios, com um IE igual ou superior a 2,0.

Pelo que podemos observar, o azeite de oliva e o Tween 80 são utilizados como substratos na produção da lipase, enquanto a rodamina B é empregada como indicador da atividade lipolítica, conforme destacado por Geoffry e Achur (2018) e Ilesanmi *et al.* (2020). Em relatos anteriores de autores como Mahmoud *et al.* (2015), Hermansyah *et al.* (2018), Bharathi e Rajalakshmi (2019), e Sahoo *et al.* (2020), são utilizadas metodologias contendo rodamina B em combinação com azeite de oliva ou o somente o detergente Tween 80, separadamente.

No entanto, neste estudo, o melhor resultado foi alcançado quando os dois substratos indutores de lipase, Tween 80 e azeite de oliva, foram associados. Parece que o Tween 80 auxiliou na dispersão do halo fosforescente, tornando-o mais evidente nas leveduras com capacidade lipolítica. A Figura 12 ilustra a diferença no halo observado com e sem a presença do Tween 80.

Figura 12 - Comparativo do halo fosforescente em meios com e sem a adição de Tween 80.



Fonte: A autora

Dessa forma, foram escolhidos os principais produtores de lipase ($IE \geq 2,0$), para serem submetidos à identificação molecular das espécies. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Identificação de leveduras selecionadas com melhores índices enzimáticos.

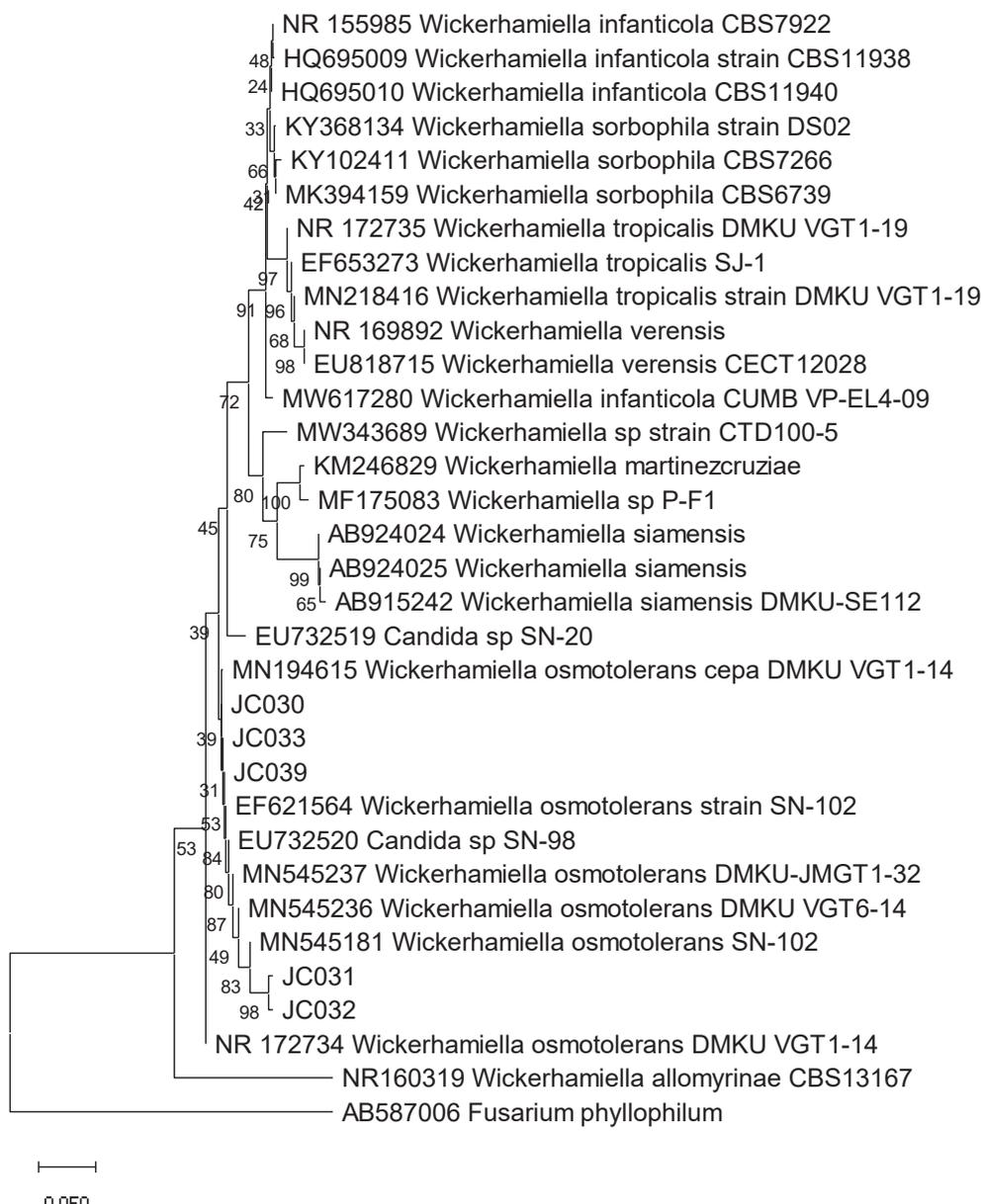
código da levedura	Espécies	Índice enzimático
JC030	<i>Wickerhamiella osmotolerans</i>	2.50
JC031	<i>Wickerhamiella osmotolerans</i>	2.50
JC032	<i>Wickerhamiella osmotolerans</i>	2.25
JC033	<i>Wickerhamiella osmotolerans</i>	2.50
JC039	<i>Wickerhamiella osmotolerans</i>	2.25

Fonte: A autora

No entanto, foram conduzidos uma análise filogenética comparativa entre JC030, JC031, JC032, JC033 e JC039 com os dados disponíveis. De fato, todas as leveduras isoladas foram identificadas como *Wickerhamiella osmotolerans*. Esses resultados validam a identificação dos indivíduos apresentados neste estudo.

A análise filogenética (Figura 13 - Análise filogenética usando a sequência de RNA ribossômico 26S das cepas isoladas vs espécies relacionadas.) foi realizada com o objetivo de confirmar a identificação das leveduras isoladas como *W. osmotolerans* e, além disso, avaliar a variabilidade genética entre elas. Embora a identificação por si só pudesse sugerir que são clones, a construção da árvore filogenética permitiu uma análise mais detalhada da relação genética entre as diferentes cepas. Isso é crucial para entender a diversidade dentro da espécie e suas potenciais implicações em termos de atividade enzimática, adaptação a diferentes condições ambientais e outros aspectos relevantes. Portanto, a análise filogenética fornece informações essenciais para validar a identificação das leveduras e compreender melhor sua diversidade genética.

Figura 13 - Análise filogenética usando a sequência de RNA ribossômico 26S das cepas isoladas vs espécies relacionadas.



Fonte: A autora

A história evolutiva das espécies foi reconstruída utilizando o método Neighbor-Joining, um dos mais comuns na filogenia molecular. Os valores de bootstrap, expressos como porcentagens, indicam a confiabilidade dos agrupamentos observados na árvore, após 1000 réplicas de bootstrap. As distâncias evolutivas entre os táxons foram calculadas pelo método Maximum Composite Likelihood e representam o número esperado de substituições de bases por sítio. Para esta análise, foram utilizadas sequências de nucleotídeos de cinco espécies diferentes, cujos números de acesso no GenBank (SUB13816212 OR608348, OR608349, OR608350, OR608351, OR608352) podem ser consultados. Todas as análises foram realizadas utilizando o software MEGA11, uma ferramenta amplamente reconhecida na comunidade

científica para estudos filogenéticos e evolutivos. Essa abordagem permitiu a reconstrução da história evolutiva das espécies estudadas, oferecendo *insights* importantes sobre seus relacionamentos filogenéticos e diversidade genética.

4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.3.1 Determinação da composição centesimal do substrato e dos suportes utilizados na FES

A produção de lipases está associada ao tipo e a concentração dos ácidos graxos, em que a alta produção de lipases está relacionada com o alto teor de ácido oleico, ao passo que o ácido linoleico exibe um efeito negativo para a síntese lipolítica (PUTRI *et al.*, 2020). Com isso, escolhemos como substrato o farelo de semente de girassol (FSG) por ser de fácil acesso em nossa região, além do alto teor lipídico. As sementes de girassol contêm teor de óleo de 19-51% sendo ricas em ácido oleico (55-70%) e menor teor em ácido linoleico (20-25%) (PECKAN *et al.*, 2021).

Ao analisarmos estudos anteriores, verificamos que a casca de ovo (CO) é comumente utilizada como catalisador ou suporte para imobilizar lipases, conforme descrito por diversos autores, como Ayodeji *et al.* (2018), Guo *et al.* (2019), Gollakota; Volli; Yaşar (2019), Vikrant *et al.* (2022), e Budžaki *et al.* (2022). No entanto, até o momento, não consta na literatura a utilização de CO como suporte durante o processo de FES.

Por outro lado, a casca de arroz (CA) é um resíduo agroindustrial amplamente estudado e empregado como suporte em diferentes processos. Diversos autores, como Nema *et al.* (2019) e Putri *et al.* (2020), já utilizaram CA na FES em seus trabalhos.

Considerando a busca por práticas sustentáveis, a utilização de CA como suporte durante o processo de FES representa uma forma eficaz de aproveitamento de resíduos agroindustriais. Ao adicionar CA e CO como suportes, esperou-se contribuir para a redução do desperdício e promover uma abordagem mais sustentável.

Para avaliar as características físico-químicas do FSG, CA e CO, foram seguidos os procedimentos descritos por AOAC, 2016. Os resultados dessa caracterização estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Análise composicional do farelo de semente de girassol, casca de arroz e casca de ovo.

Composição físico-química	Farelo semente de girassol (FSG)	Casca de arroz (CA)	Casca de ovo (CO)
Umidade (%)	4,25± 0,19	9,03 ± 0,26	0,41 ± 0,11

Cinzas (%)	2,86 ± 0,03	13,79 ± 0,70	95,53 ± 0,04
Teor de óleos g/ 100g	49,92 ± 1,44	0,47 ± 0,12	0,09 ± 0,01

Fonte: A autora.

Os resultados da análise indicaram que o substrato e suportes possuem baixo teor de umidade, fornecendo uma base para ajustar a umidade durante a fermentação, o que contribuiu para o resultado alcançado. O controle preciso da umidade é crucial para o sucesso da FES, já que afeta a atividade dos microrganismos e a taxa de reação (KUMAR; KANWAR, 2012).

O elevado teor de lipídios no substrato estimula a produção de lipase pelos microrganismos (PUTRI *et al.*, 2020). Nesse contexto, observamos que o FSG, usadas como substrato, apresentaram um teor significativo de óleos (49,92%), sendo esta, a principal fonte de carbono para os microrganismos produtores de lipase. Em contraste, tanto CA quanto CO demonstraram teores de óleo extremamente baixos (0,47% e 0,09%, respectivamente).

Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores, como o de Pekcan *et al.* (2021), que relataram teores de óleo da semente de girassol variando entre 19,12% e 51,46%, corroborando com a média obtida nessas análises. Diante disso, CA e CO podem servir como suporte para aumentar a área superficial de crescimento e disponibilizar nutrientes para os microrganismos, mas não podem ser utilizados sozinhos, por conter baixo teor de óleos.

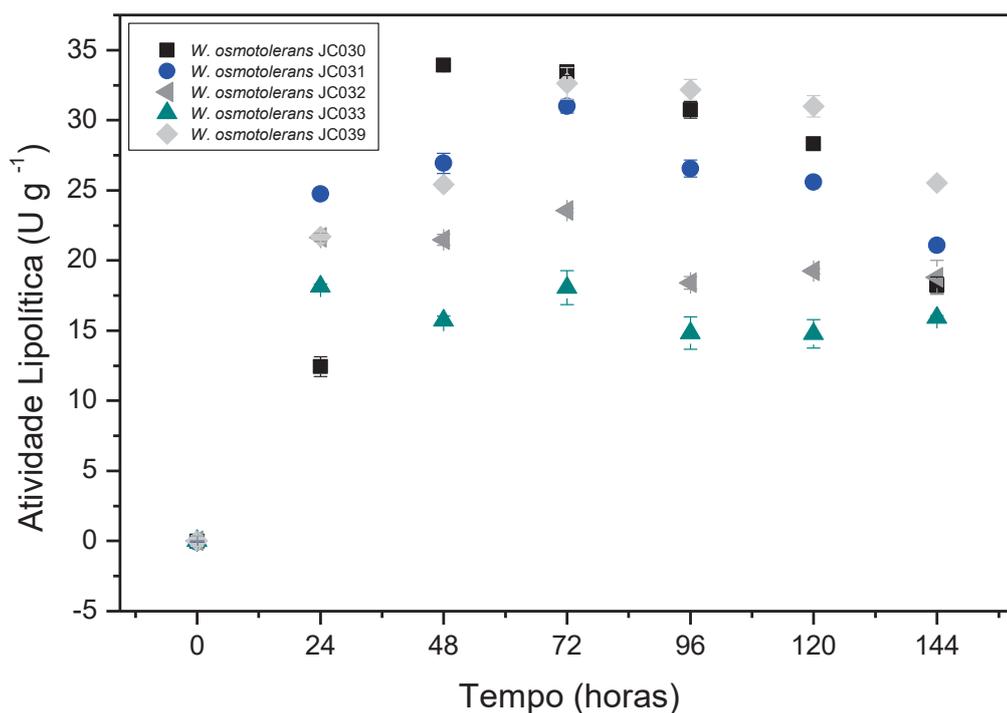
Os parâmetros avaliados, como cinzas, umidade e teor de óleos, podem variar em comparação com trabalhos anteriores devido a questões sazonais. Isso ocorre porque diferentes condições climáticas, períodos de colheita e regiões de produção podem influenciar esses fatores. Além disso, as técnicas de manipulação e análise também podem contribuir para as diferenças observadas nos resultados.

4.4 PRODUÇÃO DE LIPASE VARIANDO GRANULOMETRIAS DO SUBSTRATO E COMBINANDO SUBSTRATO COM SUPORTES

Entre os isolados testados, escolhemos 5 com base em sua capacidade de produção de lipase para prosseguir com a análise quantitativa. Esses isolados, denominados JC030, JC031, JC032, JC033 e JC039, foram identificados como pertencentes à espécie *Wickerhamiella osmotolerans*. Optamos por utilizar esses isolados na FES devido ao seu alto IE (>2,0). Essa escolha foi fundamentada na expectativa de obter um melhor desempenho na produção de lipase durante a FES.

Como observado na Figura 14, foi realizado uma cinética com 100% FSG com granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm e 60% de umidade, visando determinar quais das 5 leveduras apresentavam melhor atividade lipolítica, sendo o melhor resultado critério para a escolha de qual cepa daria continuidade as próximas análises. Com isso, podemos verificar que o pico máximo de produção variou de 48 a 72 horas, dependendo da cepa.

Figura 14 - Cinética utilizando 100% FSG granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm comparando 5 leveduras quanto a produção lipolítica.



Fonte: A autora

A levedura *W. osmotolerans* JC030 demonstrou o pico enzimático mais alto entre todas as testadas, atingindo atividade lipolítica em $35,39 \text{ U g}^{-1}$ em 48 horas. No entanto, observou-se uma redução gradual da atividade lipolítica após esse pico, evidenciando uma queda até o tempo de 144 horas. Esse declínio pode ser atribuído à diminuição da disponibilidade de fonte de carbono dos óleos presentes no substrato (ÇAKMAK; AYDOĞDU, 2021). Detalhes sobre o pico máximo de cada levedura e seu percentual de queda em 144 horas estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Pico de atividade lipolítica das leveduras submetidas a FES, bem como sua queda após o período de 144 horas da cinética.

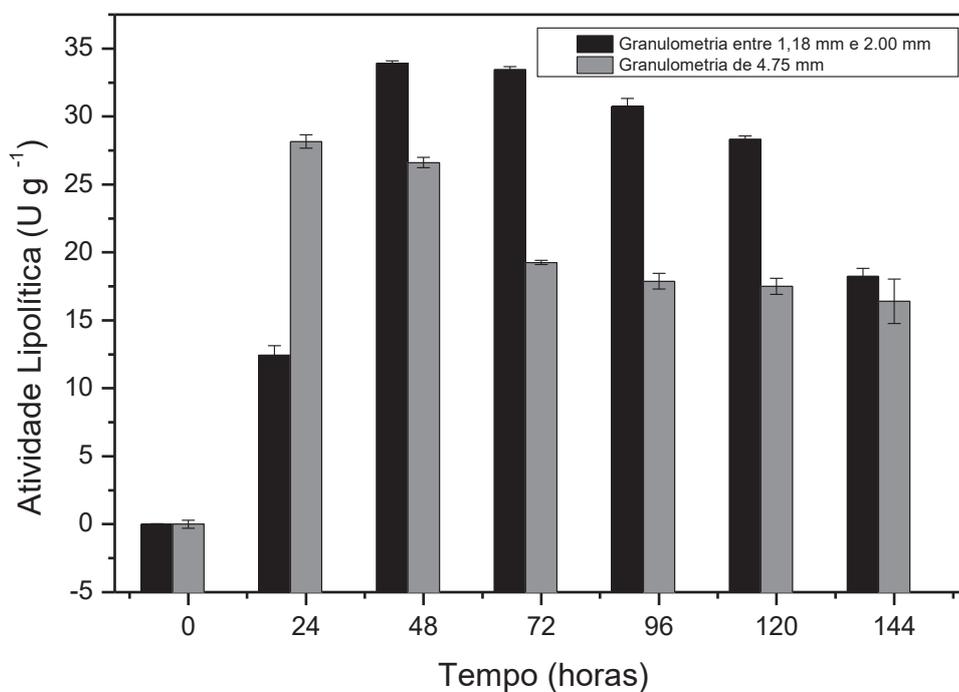
Código levedura	Tempo do pico máximo (h)	Atividade lipolítica (U g^{-1})	Percentual (%) de queda após 144 h
-----------------	--------------------------	--	------------------------------------

JC030	48	35,39±0,43	17,6
JC031	72	30,95±0,83	15,82
JC032	48	23,57±0,66	37,27
JC033	24	18,16±1,21	18,60
JC039	72	32,93±1,94	21,72

Fonte: A autora

Ao escolhermos a levedura com maior atividade enzimática na fermentação utilizando 100% FSG (*W. osmotolerans* JC030), procedemos com testes de granulometria para determinar o melhor parâmetro. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 15.

Figura 15 - Cinética utilizando 100% FSG com granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm e 4,76 mm comparando quanto a produção lipolítica.



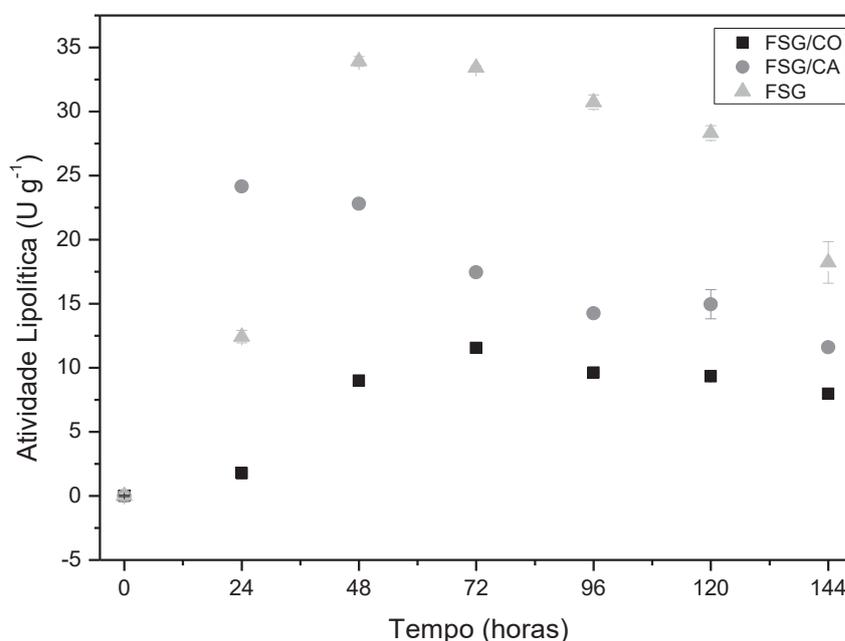
Fonte: A autora

A granulometria mostrou influência nos resultados obtidos, especialmente após 24 horas. Notamos que o sólido fermentado, com partículas variando entre 1,18 e 2,00 mm (1:1), apresentou maior AL no pico máximo de 48 horas (35,39 U g⁻¹) em comparação com o de 4,75 mm (25,88 U g⁻¹). Além disso, sua queda na atividade foi mais gradual, com uma diminuição mínima registrada após 144 horas (29,16 U g⁻¹). A escolha da granulometria foi embasada em estudos prévios de De Moura-Dickel *et al.* (2022) e Carvalho *et al.* (2024), com ajustes, visando melhorar a atividade enzimática e facilitar a secagem do sólido fermentado.

De acordo com estudos anteriores de Manan e Webb (2017), o processo de moer o substrato proporciona melhores condições para os microrganismos crescerem e aumentarem a taxa de degradação e hidrólise, além disso, o tamanho da partícula influencia na razão entre área de superfície e volume do substrato. Em que partículas menores fornecem área de superfície maior por volume permitindo o melhor contato entre o microrganismo e os nutrientes, porém afeta a difusão de oxigênio. Por outro lado, partículas maiores proporcionam uma área de superfície menor em relação ao volume, impactando no contato entre os microrganismos e os nutrientes, mas facilitam a difusão de oxigênio (SCHMIDT; FURLONG, 2012). O tamanho da partícula também afeta a porosidade, alterando a densidade aparente do substrato e os gases presentes (KARIMI *et al.*, 2014).

Após essa etapa, procedemos com análises da produção de lipase utilizando uma combinação entre substrato e suportes (Figura 16), a escolha de utilizar resíduos agroindustriais como suporte se deve ao fato de serem subprodutos com baixo valor agregado.

Figura 16 - Cinética utilizando 100% FSG com granulometrias entre 1,18 e 2,00 mm, e combinações de substratos FSG/CA (1:1) e FSG/CO (1:1) utilizando a levedura *W. osmotolerans* JC030.



Fonte: A autora

É importante destacar que a utilização exclusiva de CA e CO como base na FES não é eficiente, devido ao seu baixo teor de lipídios (0,47% e 0,09%, respectivamente), tornando necessária a adição de um substrato indutor para viabilizar os testes. Por essa razão, neste

estudo, optou-se por utilizar o FSG como substrato para induzir a produção de lipases, devido ao seu elevado teor de lipídios (49,92%)

Assim, ao analisarmos os dados

Figura 16, podemos observar que a utilização da FSG/CO não apresentou muita eficiência ($11.55 \text{ U g}^{-1} \text{ pico}$) em 72 horas, quando comparados a FSG/CA ($24.14 \text{ U g}^{-1} \text{ pico}$) em 24 horas, porém, a utilização de FSG 100% ainda apresentou como o melhor produtor ($33.92 \text{ U g}^{-1} \text{ pico}$) em 24 horas. Esses resultados podem ser explicados devido ao FSG possuir elevado teor lipídico, e ao misturar FSG/CA e FSG/CO, que possuem níveis extremamente baixos de óleos, conseqüentemente diminuiu a fonte lipídica presente no meio, diminuindo assim a produção de lipase. Mesmo diante desses resultados, o uso de FSG/CA ainda se apresentou mais viável, pois ao utilizar 50% de resíduo agroindustrial a redução foi de apenas 28,83% do resultado, comparado a 100% FSG, e levando em consideração que o farelo de semente de girassol é um produto com alto valor agregado, tornou-se inviável seu uso em 100%.

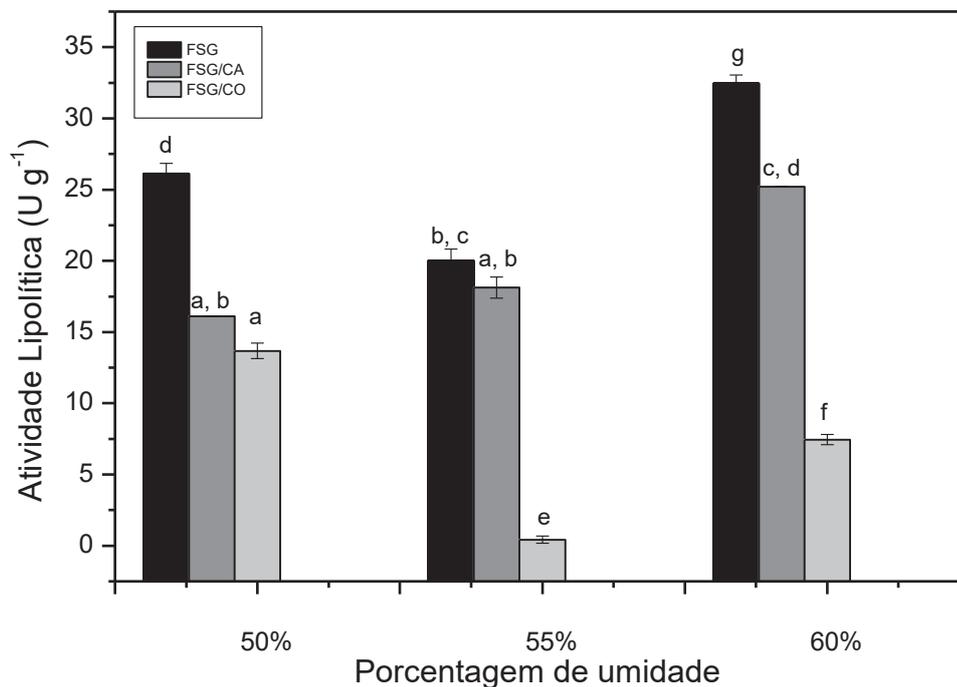
Em outros estudos, é comum observar o uso de um substrato indutor combinado com resíduos. Lopes *et al.* (2016), utilizaram a levedura *Yarrowia lipolytica* em farelo de trigo/resíduos de moinho de oliva no processo de FES e obtiveram AL de $9,69 \text{ U g}^{-1}$, os mesmos autores utilizaram somente o farelo de trigo e obtiveram $14,08 \text{ U g}^{-1}$ e somente o resíduo de moinho de oliva o resultado foi de $0,79 \text{ U g}^{-1}$. Mofthah *et al.* (2012) também utilizaram a levedura *Yarrowia lipolytica* em torta de azeite/extrato de levedura como substrato para a FES resultando em AL de $47,6 \text{ U g}^{-1}$.

4.4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Além dos substratos, o ajuste da umidade inicial é um fator crucial para otimizar a FES, levando em consideração que é um parâmetro variável dependendo principalmente do microrganismo utilizado. Na Figura 17, o gráfico de colunas representa as médias (com os desvios padrões) da AL considerando as diferentes umidades testadas (50, 55 e 60%) para os diferentes substratos utilizados (apenas FSG, FSG/CA 1:1 e FSG/CO 1:1) no melhor tempo de 24 horas. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) fatorial, onde foi possível verificar que todos os efeitos foram significativos ($p < 0,05$), ou sejam, umidade, substrato e a interação de ambos, sendo obtido uma média quadrática de 4,29 com 18 graus de liberdade para o resíduo.

Assim sendo, foi possível realizar o teste de Tukey para comparar as medias dos grupos (umidade) nos diferentes tratamentos (substrato). Com isso, a igualdade entre as médias dos diferentes grupos está representada pelas letras iguais (Figura 17).

Figura 17 - Variação da porcentagem de umidade inicial na FES utilizando diferentes substratos como FSG, FSG/CA e FSG/CO para a levedura *W. osmotolerans* JC030



Fonte: a autora

Ao analisarmos os resultados obtidos, verifica-se que a umidade de 60% foi melhor ao utilizar o 100% FSG, seguido do FSG/CA, já para FSG/CO a umidade de 50% se mostrou melhor, mas ainda apresentou a menor AL dentre os substratos testados.

A Tabela 10. Matriz de dados do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis para a resposta de atividade apresenta os resultados de AL para os 18 ensaios do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis, para verificar os efeitos das variáveis Substrato (2 níveis) e Indutor (3 níveis) no processo FES. O maior resultado (AL = 24,16 U g⁻¹) foi obtido no ensaio 8 que corresponde ao substrato FSG com o suporte casca de arroz (FSG/CA) utilizando o indutor óleo de girassol (OG). A pior condição (AL = 5,42 U g⁻¹) foi verificada no ensaio 16 com a casca de ovo como suporte (FSG/CO) com o indutor OG.

Tabela 10. Matriz de dados do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis para a resposta de atividade lipolítica

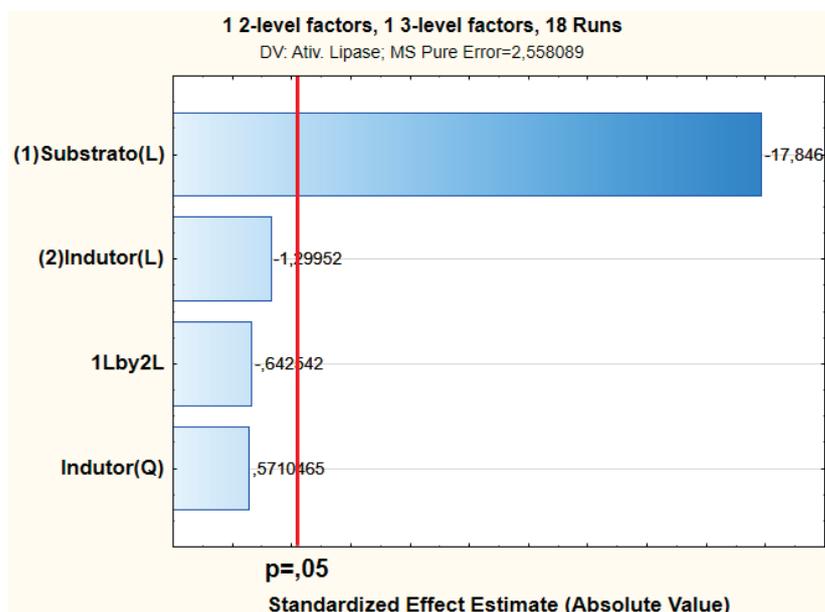
Experimento	Substrato (X1)	Indutor (X2)	AL (U g ⁻¹)
1	-1	-1	20,97
2	-1	-1	21,33
3	-1	-1	21,20

4	-1	0	21,71
5	-1	0	20,79
6	-1	0	21,62
7	-1	1	19,03
8	-1	1	24,16
9	-1	1	18,49
10	1	-1	8,44
11	1	-1	8,30
12	1	-1	8,28
13	1	0	7,27
14	1	0	6,30
15	1	0	9,97
16	1	1	5,42
17	1	1	7,94
18	1	1	6,28

Fonte: A autora

Conforme o gráfico de Pareto (Figura 18), apenas o fator Substrato (X1) foi significativo no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), indicando que a mudança do Indutor (X2) não interfere no resultado AL, ao contrário do Substrato. O efeito do Substrato neste caso é negativo, e, para aumentar a AL deve-se trabalhar com o Substrato no nível inferior, ou seja, o Substrato FSG/CA gera maiores valores de AL, o que é evidenciado pelos resultados apresentados na Tabela 10.

Figura 18 - Gráfico de Pareto do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis, para verificar as influências do Substrato (2 níveis) e do Indutor (3 níveis) sobre a atividade lipolítica.



Fonte: A autora

A análise de variância (ANOVA) do planejamento é apresentada na Tabela 11. ANOVA do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis para o nível de significância de 5%. É possível verificar que o modelo ajusta muito bem os resultados experimentais de AL, com $p < 0,05$ para o modelo e tendo a falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$). Isso é corroborado pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9639$), o qual apresenta um valor considerável e próximo ao valor do coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado} = 0,9528$), o que é um indicativo de um modelo altamente preditivo, conforme a equação (7).

$$Y = AEL (U g^{-1}) = 14,64 - 6,73.X_1 - 0,60.X_2 - 0,46.X_2^2 - 0,30.X_1.X_2 \quad Eq. (7)$$

Tabela 11. ANOVA do Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis

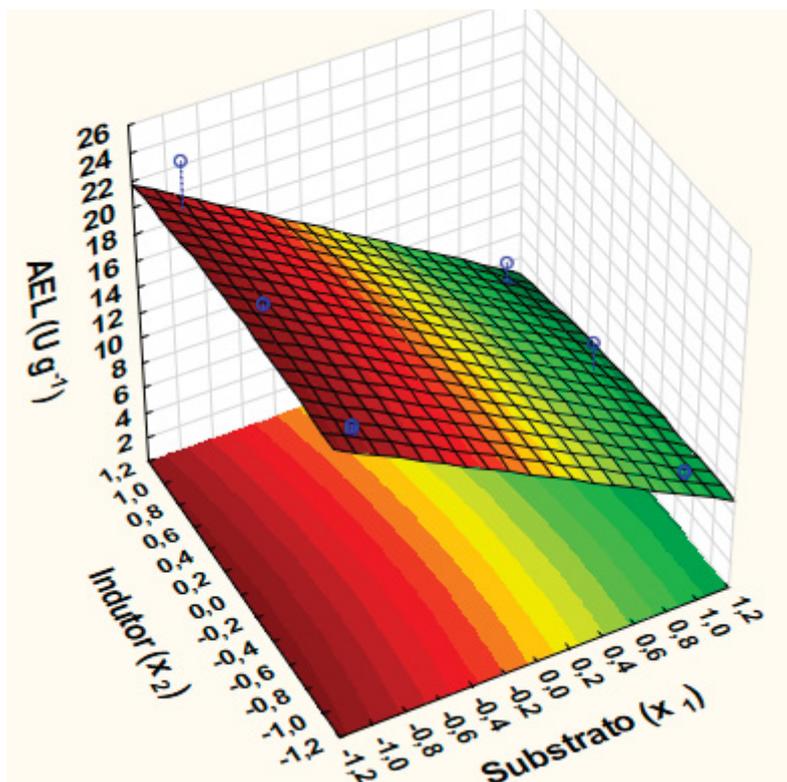
Fator	SQ	GL	MQ	Fcalc	p
(1) Substrato (L)	814,7339	1	814,7339	318,4932	0,000000
(2) Indutor (L)	4,3200	1	4,3200	1,6888	0,218175
Indutor (Q)	0,8342	1	0,8342	0,3261	0,578506
Interação (1Lx2L)	1,0561	1	1,0561	0,4129	0,532606
Modelo	820,9442	4,0000	205,2361	86,88388	0,000000
Resíduo	30,7084	13,0000	2,362188		
Falta de ajuste	0,0114	1	0,0114	0,0044	0,947926
Erro puro	30,6971	12	2,5581		
Total	851,6526	17			

$R^2 = 0,9639$; $R^2_{ajustado} = 0,9528$ (L) = linear; (Q) = quadrático

Fonte: A autora

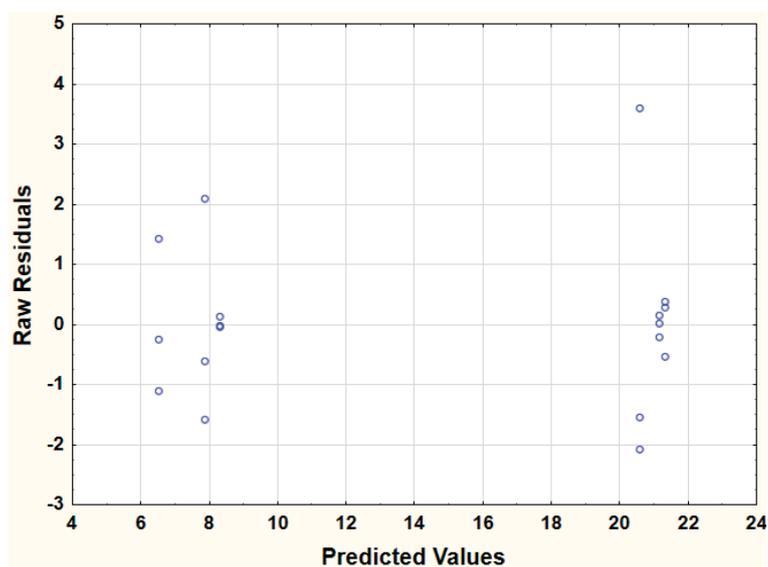
Graficamente, a Equação 7 é representada pela superfície de resposta ilustrada na Figura 19, a qual segue um formato plano visto que o termo quadrático do fator indutor não foi significativo. A autenticidade do modelo gerado é comprovada pela distribuição dos resíduos, os quais estão aleatoriamente distribuídos em torno do zero (Figura 20).

Figura 19 - Superfície de resposta da AL obtida no Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis.



Fonte: A autora

Figura 20 - Gráfico da distribuição dos resíduos vs valores preditos pelo modelo obtido no Planejamento experimental misto com fatores de 2 e 3 níveis.



Fonte: A autora

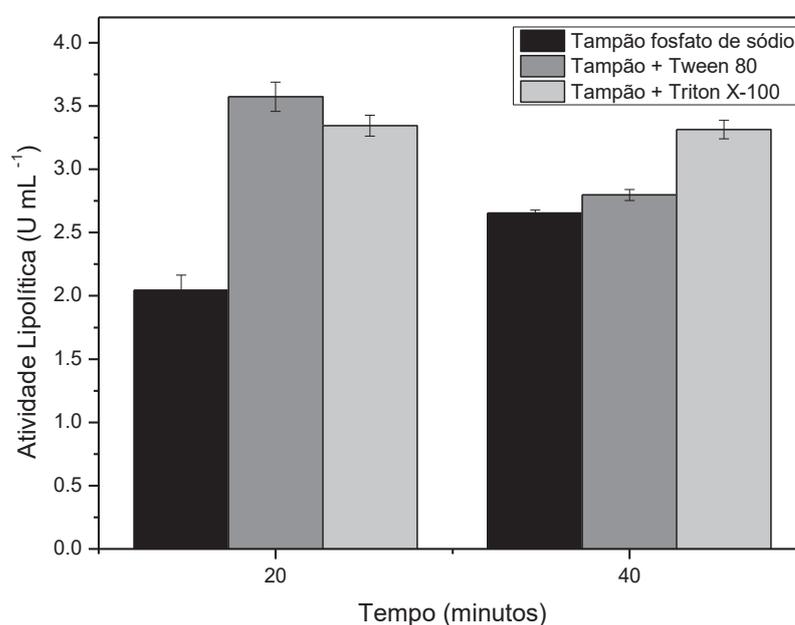
Após ajustar todos os parâmetros na FES, determinou-se que a melhor levedura para o processo foi a *W. osmotolerans* JC030, em 24 horas de FES, utilizando substrato combinado com resíduo agroindustrial (FSG/CA), sem indutor adicional, com uma umidade de 60%, sendo este o método mais viável de combinações. Com esses parâmetros otimizados, foram realizadas

as próximas etapas de extração e imobilização da lipase, visando obter maior rendimento e eficiência na AL.

4.5 EXTRAÇÃO DA ENZIMA DO SÓLIDO FERMENTADO

Para extração da enzima do sólido fermentado, foram utilizados dois diferentes surfactantes a 0,2% com tampão fosfato de sódio pH 7 50 mM, e somente tampão fosfato sódio, ambos à 20 e 40 minutos e foram obtidos os seguintes resultados na Figura 21.

Figura 21 - Avaliação da eficiência de extração da lipase através da otimização do tempo de contato entre as soluções extratoras e o sólido fermentado



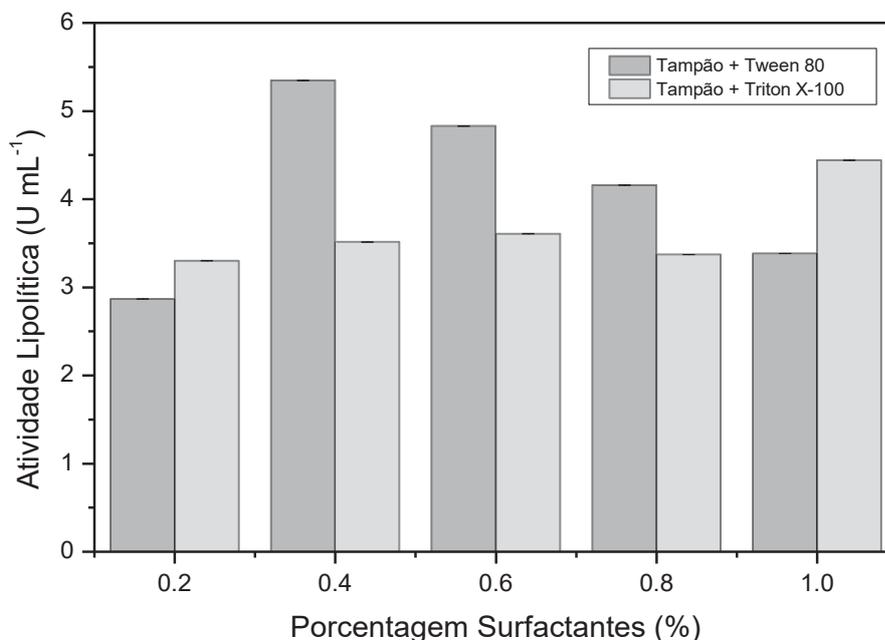
Fonte: A autora

Nota-se que o tempo teve influência direta na extração, obtendo-se melhores resultados em 83,33% dos casos no menor tempo de 20 minutos, além disso, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando Tampão + Tween 80 no tempo de 20 minutos (3,57 U mL⁻¹). O uso de surfactantes ajuda a melhorar o processo de extração da enzima, pois melhora a solubilidade, reduz a formação de emulsões, proporciona estabilidade a enzima, aumenta a eficiência na extração, pois os surfactantes não iônicos (surfactantes que não possuem carga negativa ou positiva em sua molécula), como no caso do Tween 80 e do Triton X-100, tem sido empregado a fim de solubilizar a proteína sem perder sua atividade biológica (NADAR *et al.*, 2017).

A fim de encontrar o melhor resultado utilizando os surfactantes Tween 80 e Triton X-100, foi realizada variação de porcentagem dos mesmos, utilizando como base o tampão fosfato

de sódio pH 7 50 mM. Verifica-se na Figura 22, que em 60% das análises os melhores resultados foram utilizando tampão + Tween 80 e dentre eles, destacou-se o uso de tampão + Tween 80 a 0,4% com um total de 5,35 U mL⁻¹.

Figura 22 - Avaliação da eficiência de extração da lipase através da otimização dos parâmetros de porcentagem dos surfactantes utilizados nas soluções extratoras



Fonte: A autora

O aumento da AL ao utilizar tampão + Tween 80 a 0,4% pode ser justificado pela capacidade do surfactante em promover a solubilização e a estabilização da enzima lipase. O Tween 80, por ser um surfactante não iônico, possui propriedades que facilitam a interação entre as moléculas de água e as moléculas de lipídeo presentes no meio, criando micelas e reduzindo a tensão superficial (KUNDU *et al.*, 2016).

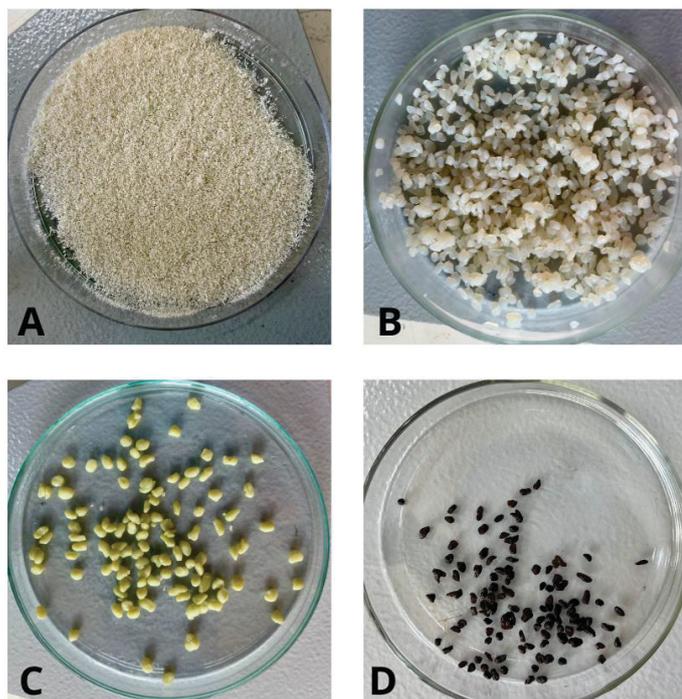
Além disso, o Tween 80 pode promover a desestabilização das interfaces hidrofóbicas, facilitando a adsorção das lipases em superfícies hidrofílicas, onde podem encontrar seus substratos de forma mais eficiente. Essa interação entre as lipases e as interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas é crucial para a atividade enzimática, uma vez que as lipases são conhecidas por atuar nesses ambientes, onde podem acessar e catalisar as moléculas de lipídeo presentes (SILVA *et al.*, 2014).

4.6 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM ESFERAS DE QUITOSANA

4.6.1 Síntese e funcionalização das esferas de quitosana

Para a caracterização macroscópica, nota-se que o pó de quitosana exibe uma coloração creme, mantendo-se inalterado na formação das esferas de quitosana. No entanto, ao ser reticulado com glutaraldeído, ocorreu uma mudança tanto na coloração, que se tornou mais amarelada, quanto na consistência das esferas, que adquiriram uma estrutura mais rígida ao toque. Por outro lado, nas esferas reticuladas e imobilizadas, ocorreu uma transformação mais significativa. Notavelmente, houve uma mudança abrupta na coloração, agora exibindo tonalidades pretas. Além disso, é perceptível uma redução no tamanho das esferas, que anteriormente apresentavam uma média de 1,5 mm e diminuíram para 1,00 mm. Na Figura 23, é possível visualizar a transformação da quitosana durante o processo.

Figura 23 - Transformação da quitosana da forma em pó à imobilização reticulada e imobilizada



Legenda: (A) quitosana em forma de pó, (B) esferas de quitosana, (C) esferas de quitosana reticulada com glutaraldeído, (D) esferas de quitosana reticulada com lipase imobilizada.

Fonte: A autora

No contexto da imobilização de lipase, a quitosana pode ser utilizada em diferentes formas, como pó, esferas reticuladas ou não, cada uma com suas próprias características e benefícios. A forma reticulada, por exemplo, pode proporcionar uma maior área superficial para

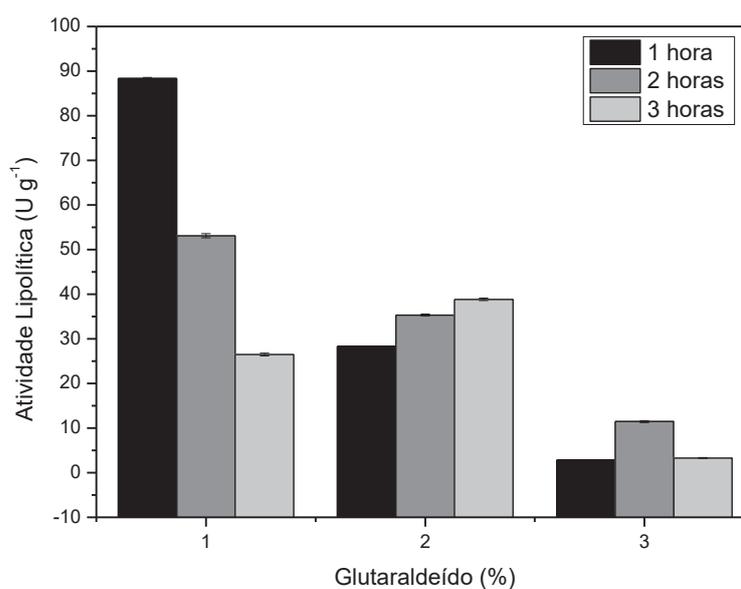
a ligação das enzimas, além de conferir às enzimas uma maior resistência a condições ambientais adversas, como altas temperaturas e pH extremos, permitindo sua utilização em reações repetidas (RAFIEE; REZAEI, 2021). O método de imobilização baseado na utilização de glutaraldeído como agente bifuncional para ligar a enzima ao polímero é uma abordagem amplamente reconhecida na área de biotecnologia, permitindo a fixação estável da lipase ao suporte de quitosana reticulada.

4.6.2 Imobilização de lipase em esferas de quitosana reticulada com glutaraldeído

Foram investigados diferentes concentrações de glutaraldeído (1, 2 e 3%) durante o processo de reticulação da quitosana, com o objetivo de avaliar o impacto dessa variável na eficiência da imobilização. A variação na concentração de glutaraldeído pode influenciar diretamente na densidade de ligações entre a enzima e o suporte, afetando assim a estabilidade e a atividade da lipase imobilizada (LI *et al.*, 2013).

Além disso, foram testados três diferentes tempos de incubação (1, 2, 3 horas), a fim de determinar o período ideal para promover a interação eficaz entre a enzima e o suporte. Essa abordagem busca identificar o tempo necessário para que ocorra a máxima eficiência na fixação da lipase à quitosana reticulada, garantindo assim uma imobilização eficaz e estável da enzima. Na Figura 24, é possível verificar a otimização do processo de imobilização e o melhor resultado dos parâmetros testados.

Figura 24 - Avaliação da atividade lipolítica em função da quantidade de glutaraldeído (%)



Fonte: A autora

Os dados da Tabela 12 fornecem uma visão detalhada do rendimento de imobilização e AL em U por g de esfera, para cada parâmetro testado. Essas análises são cruciais para avaliar a eficácia do processo de imobilização da lipase em suportes de quitosana. Ao examinar esses resultados, podemos determinar quais condições proporcionaram o rendimento mais satisfatório de imobilização.

Tabela 12. Otimização dos parâmetros de reticulação da quitosana com glutaraldeído e tempo de incubação no impacto na atividade lipolítica ($U\ g^{-1}$) e rendimento de imobilização

Glutaraldeído (%)	Tempo de incubação (horas)	Rendimento imobilização (%)	$U\ g^{-1}$ de esfera
1	1	57,76	88,36± 0,35
1	2	18,49	28,29± 0,46
1	3	1,83	2,80± 0,10
2	1	42,24	53,11± 0,10
2	2	28,09	35,32± 0,22
2	3	9,12	11,47± 0,29
3	1	17,50	26,51± 0,21
3	2	25,66	38,85± 0,07
3	3	2,18	3,30± 0,028

Fonte: A autora

Os dados apresentados revelam a influência tanto da concentração de glutaraldeído quanto do tempo de incubação na eficiência de rendimento de imobilização da lipase em esferas de quitosana. Utilizando glutaraldeído a 1% em 1 hora de incubação, alcançou-se o maior rendimento de imobilização (57,76%) imobilizando 88,36 $U\ g^{-1}$ (g de esfera), indicando que essa combinação específica de parâmetros foi mais eficaz para facilitar a ligação entre a enzima e o suporte, sugerindo que esse intervalo de tempo é crucial para garantir uma ligação adequada entre o suporte de quitosana e a lipase.

À medida em que aumentou a concentração de glutaraldeído ou o tempo de incubação, observou-se uma tendência de diminuição na eficiência da AL e no rendimento de imobilização, o que sugere que condições mais severas podem comprometer a interação entre a lipase e a quitosana. Durante o processo de ligação covalente, os grupos amino da quitosana foram ativados com glutaraldeído para formar ligação imina, seguido pelo acoplamento covalente da enzima aos sítios ativos, e embora concentrações mais altas de glutaraldeído possam aumentar o número de ligações cruzadas entre a enzima e o suporte, isso também pode resultar em uma

redução na porosidade do suporte e aumento da rigidez, afetando negativamente a eficácia da imobilização (DESAI *et al.*, 2006; SHENVI *et al.*, 2013). Essa diminuição na porosidade pode dificultar o acesso da enzima aos substratos e diminuir a eficiência da interação entre elas, explicando assim os resultados observados.

Esses resultados destacam a importância de otimizar tanto o tempo de incubação quanto a concentração de glutaraldeído para maximizar a eficiência da imobilização da lipase em suportes de quitosana. A compreensão desses fatores é fundamental para o desenvolvimento de processos de imobilização eficazes e aprimoramento das propriedades catalíticas dos biocatalisadores resultantes.

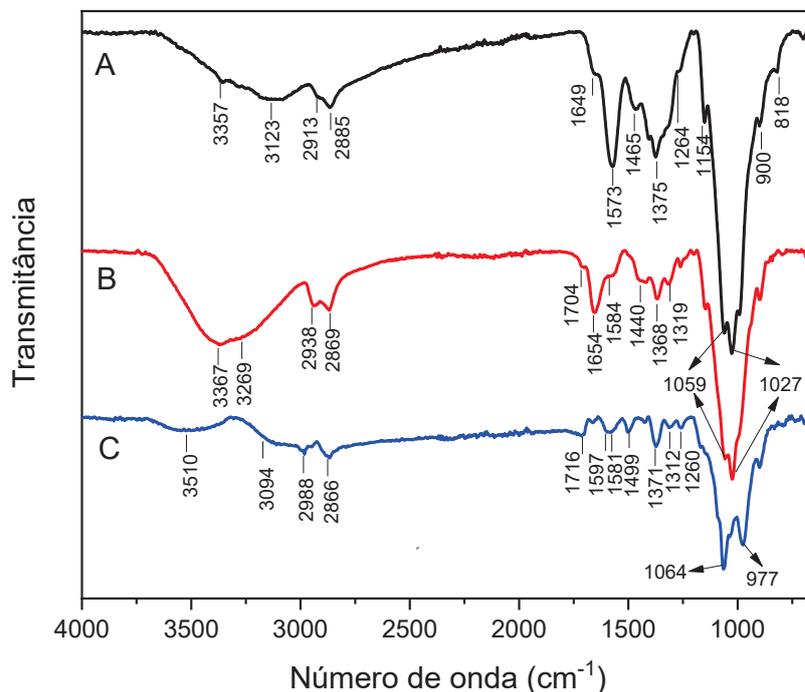
O rendimento de imobilização não ter alcançado 100% está em conformidade com diversos estudos anteriores que abordaram a imobilização de enzimas em suportes de quitosana reticulada com glutaraldeído. Por exemplo, Desai *et al.* (2016) relataram um rendimento variando de 31,2% a 39,6% ao imobilizar lipase pancreática suína em quitosana reticulada com glutaraldeído (CHI/GLUT) em concentrações de 0,01% a 5%. Da mesma forma, Osuna *et al.* (2015) alcançaram um rendimento de 90% ao imobilizar lipase de *Aspergillus niger* em nanopartículas magnéticas revestidas de CHI/GLUT 25%. Monteiro *et al.* (2021) obtiveram um rendimento de 80% ao utilizar CHI/GLU a 5% para imobilizar lipase comercial de *Candida antarctica*, com uma eficiência de carregamento de 46 U g⁻¹. Além disso, Pinheiro *et al.* 2019 relataram rendimentos de imobilização de 55,6% para CHI sem glutaraldeído e 94,7% para CHI/GLUT a 5% ao imobilizar lipase de *C. antarctica*.

Esses resultados corroboram com a variação observada no rendimento de imobilização em nosso estudo. A imobilização de enzimas em suportes de quitosana reticulada com glutaraldeído é influenciada por diversos fatores, como a concentração de glutaraldeído, o tempo de incubação e as características específicas da enzima e do suporte. Portanto, a obtenção de um rendimento não próximo de 100% é comum e esperado, considerando a complexidade do processo de imobilização e as interações envolvidas entre os componentes.

4.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de FTIR permite avaliar os grupos funcionais presentes nas amostras possibilitando identificar diferenças espectrais a fim de evidenciar ou confirmar a eficiência dos diferentes tratamentos. A Figura 25 apresenta espectros de três amostras: (A) esferas de quitosana, (B) esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 1% e (C) lipase imobilizada nas esferas ativadas.

Figura 25 - Espectros FTIR – ATR das esferas de quitosana (A), esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 1% (B) e da lipase imobilizada nas esferas ativadas (C).



Fonte: A autora

O espectro das esferas de quitosana (A) apresenta bandas características desse composto, conforme reportado na literatura. A banda larga na região de 3595- 3062 cm^{-1} corresponde ao estiramento das ligações O-H do grupo hidroxil (OH) sobreposta ao estiramento N-H. Adicionalmente, observam-se duas bandas de baixa intensidade aproximadamente em 2913 e 2885 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações C-H. O pico em 1573 cm^{-1} corresponde ao dobramento da amida (N-H). As bandas em aproximadamente 1465 e 1375 cm^{-1} representam as frequências de dobramento dos grupos CH_2 e de estiramento simétrico do grupo CH_3 , respectivamente. A absorção em 1154 cm^{-1} deve-se ao estiramento simétrico da ligação C-O-C. O estiramento das ligações C-O é representado pelas bandas em 1059 e 1027 cm^{-1} (SOBREIRA *et al.*, 2020; QUEIROZ *et al.*, 2015)

Quando se compara os espectros A (esferas de quitosana) e B (quitosana/glutaraldeído) percebem-se diferenças significativas, principalmente o aparecimento de uma banda em 1654 cm^{-1} geralmente atribuída à ligação imina (C=N) formada na reticulação da quitosana devido à presença do glutaraldeído (GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2018). Na reticulação ocorre o ataque nucleofílico do grupamento amino (NH_2) da quitosana ao grupo carbonila (C=O) do glutaraldeído, ocorrendo a perda de uma molécula de água e a formação da ligação C=N, (1690-1640 cm^{-1}) (COSTA JR, 2008). Portanto, este resultado demonstra a incorporação do agente reticulador nas esferas de quitosana.

As diferenças nos espectros B (esferas de quitosanas ativadas) e C (esferas ativadas/lipase) são facilmente perceptíveis ao longo de todo o espectro. Primeiramente, nota-se a diminuição e o deslocamento da banda em aproximadamente 3300 cm^{-1} , relacionada ao estiramento do grupo OH, para 3510 cm^{-1} . Esta alteração deve-se provavelmente à sobreposição das bandas do grupo OH da quitosana com a banda Amida A relativa ao estiramento do grupo N-H da enzima (3500 cm^{-1}) (MOREIRA *et al.*, 2022). Observa-se também o surgimento de uma banda em 3094 cm^{-1} que poderia ser atribuída à banda Amida B de proteínas (3100 cm^{-1}), também relativa ao estiramento do grupo N-H. Entretanto, as bandas Amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) e Amida II ($1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$) são as mais relevantes bandas vibracionais da cadeia principal das proteínas (KONG; YU, 2007). A banda Amida I é devida às vibrações do estiramento C=O das ligações peptídicas e a banda Amida II deriva do dobramento do grupo N-H e do estiramento do grupo C-N (COŞKUN *et al.*, 2021). As modificações destas regiões visualizadas no espectro C, como surgimento de bandas estiramento da amida (C=O) em 1716 , 1597 , 1581 e 1499 cm^{-1} provavelmente são oriundas da interferência das bandas amidas características das proteínas.

Desse modo, as bandas associadas à quitosana provavelmente foram suprimidas devido à adsorção superficial da lipase. Nesse caso, o formato esférico do suporte de quitosana associado à profundidade de penetração limitada da técnica FTIR – ATR, geralmente de poucos micrometros, dificultaria capturar com precisão a informação molecular relativas às bandas da quitosana após a adsorção da proteína (DARAS *et al.*, 2010).

A interferência das bandas de absorção vibracionais de compostos presentes numa amostra pode ocasionar surgimento de novas bandas, supressão ou deslocamento de bandas características. Desse modo, os resultados sugerem que a lipase foi de fato imobilizada nas esferas de quitosana, em concordância com os dados obtidos na atividade lipolítica.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que os catalisadores enzimáticos, como as lipases, representam uma alternativa promissora devido a suas vantagens de biodegradabilidade, contribuindo assim para a redução dos custos operacionais e para a promoção da sustentabilidade ambiental. A utilização do resíduo agroindustrial, como a casca de arroz, associado ao farelo de semente de girassol, demonstrou eficiência na produção de lipase fúngica em 24 horas ($24,14\text{ U g}^{-1}$) de *Wickerhamiella osmotolerans* JC030, demonstrando melhor custo benefício em comparação a

utilização de 100% farelo de semente de girassol, devido a redução de custos no processo de FES. Este avanço é significativo, especialmente considerando que essa espécie ainda não foi documentada na literatura em relação à sua capacidade enzimática, evidenciando a contribuição inovadora deste estudo. Além disso, complementando a produção de lipase, o estudo também aplicou com sucesso a etapa de extração e imobilização utilizando esferas de quitosana ativada com glutaraldeído a 1% em 1 hora de contato, resultando em um rendimento de imobilização de 57.76% (88,36 U g⁻¹) por g de esfera. As modificações estruturais do suporte podem ser comprovadas pelo resultado da análise espectroscópica, em que a adição de glutaraldeído resultou na formação de uma nova banda, indicativa da ligação C=N característica da ligação imina, demonstrando a reticulação da quitosana. A imobilização da lipase nas esferas ativadas foi confirmada pela análise dos espectros, com modificações nas regiões das bandas Amida I e II, sugerindo a presença da enzima. Esses resultados não apenas demonstram a viabilidade técnica dessa abordagem, mas também ressaltam seu potencial para futuras aplicações industriais e ambientais, contribuindo para a busca por soluções mais eficientes e sustentáveis na biotecnologia enzimática.

6 REFERÊNCIAS

- ABDULMALEK, S. A.; YAN, Y. Recent developments of lipase immobilization technology and application of immobilized lipase mixtures for biodiesel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 16, n. 4, p. 1062-1094, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.2349>
- AGUIEIRAS, E. C.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. Solid-state fermentation for the production of lipases for environmental and biodiesel applications. **Current developments in biotechnology and bioengineering**, p. 123-168, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00008-6>.
- AKPOR, O. B.; MUCHIE, B. Environmental and public health implications of wastewater quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2379-2387, 2011.
- ALAMI, N. H.; NASIHAH, L.; UMAR, R. L. A.; KUSWYASARI, N. D.; ZULAIKA, E.; SHOVI TRI, M. Lipase production in lipolytic yeast from Wonorejo mangrove area. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2017. p. 020001. Doi: <https://doi.org/10.1063/1.4985392>.

ALMEIDA, A. F.; DIAS, K. B.; DA SILVA, A. C. C.; TERRASAN, C. R. F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Agroindustrial wastes as alternative for lipase production by *Candida viswanathii* under solid-state cultivation: purification, biochemical properties, and its potential for poultry fat hydrolysis. **Enzyme research**, v. 2016, p. 1-15, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1353497>.

ANVISA. *Resolução da Diretoria Colegiada nº 360a: Aprova Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional*. Brasília, 23 de dezembro de 2003.

AOAC - *Official Methods of Analysis*. 20 ed. 2016.

APHA. *WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA (1995).

APHA, A. W.; GREENBERG, W. I. A.; CLESCERI, L.; EATON, A. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington DC American Public Health Association, 2012.

ARORA, N. K.; MISHRA, J.; MISHRA, V. (Ed.). *Microbial enzymes: roles and applications in industries*. Springer Nature, v. 11. 331 p. 2020.

AYODEJI, A. A.; MODUPE, O. E.; RASHEED, B.; AYODELE, J. M. Data on CaO and eggshell catalysts used for biodiesel production. **Data in brief**, v. 19, p. 1466-1473, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.06.028>.

BASHIR, N.; SOOD, M.; BANDRAL, J. D. Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. **Int. J. Chem. Stud**, v. 8, p. 254-261, 2020. Doi: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2d.8779>.

BASITERE, M.; NJOYA, M.; RINQUEST, Z.; NTWAMPE, S. K. O.; SHELDON, M. S. Performance evaluation and kinetic parameter analysis for static granular bed reactor (SGBR) for treating poultry slaughterhouse wastewater at mesophilic condition. **Water Practice and Technology**, v. 14, n. 2, p. 259-268, 2019. Doi: <https://doi.org/10.2166/wpt.2019.010>.

BAYRAMOGLU, G.; CELIKBICAK, O.; KILIC, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130699, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130699>.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101368, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>.

BIALESKI, D. D.; TRIQUES, C. C.; CARVALHO, J. K.; RODRIGUES, M. L. F.; DALL'OGGIO, I. C.; SILVA-LUCCA, R. A.; FAGUNDES-KLEN, M. R. Natural Coagulant Functionalized with Magnetic Nanoparticles Better Treated Dairy Wastewater Compared to Bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-13, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12649-024-02585-2>.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66-80, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.

BRANDÃO, L. R.; LIBKIND, D.; VAZ, A. B.; ESPÍRITO SANTO, L. C.; MOLINÉ, M.; DE GARCÍA, V.; BROOCK, M. V.; ROSA, C. A. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 1, p. 1-13, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x>.

BUDŽAKI, S.; VELIĆ, N.; OSTOJČIĆ, M.; STJEPANOVIĆ, M.; RAJS, B. B.; ŠEREŠ, Z.; MARAVIĆ, N.; STANOJEV, J.; HESSEL, V.; STRELEC, I. Waste Management in the Agri-Food Industry: The Conversion of Eggshells, Spent Coffee Grounds, and Brown Onion Skins into Carriers for Lipase Immobilization. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 409, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/foods11030409>.

CAI, Y.D.; CHOU, K.C. Predicting enzyme subclass by functional domain composition and pseudo amino acid composition. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 3, p. 967-971, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1021/pr0500399>.

ÇAKMAK, M.; AYDOĞDU, H. Screening of microfungi for lipolytic activity and optimization of process parameters in lipase production by solid substrate fermentation using selected

microfungi (*Penicillium aurantiogriseum*). **Kuwait Journal of Science**, v. 48, n. 1, p. 98-105, 2021.

CAO, X.; PAN, Y.; WEI, W.; YUAN, T.; WANG, S.; XIANG, L.; YUAN, Y. Single cell oil production by *Trichosporon* sp. Effects of fermentation conditions on fatty acid composition and applications in synthesis of structured triacylglycerols. **LWT**, v. 148, p. 111691, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111691>.

CARPEN, A.; BONOMI, F.; IAMETTI, S.; MARENGO, M. Effects of starch addition on the activity and specificity of food-grade lipases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 607-616, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1002/bab.1761>.

CARTERET, C.; JACOBY, J.; BLIN, J. L. Using factorial experimental design to optimize biocatalytic biodiesel production from *Mucor Miehei* Lipase immobilized onto ordered mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 268, p. 39-45, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.04.004>.

CARVALHO, T.; PEREIRA, A. D. S.; BONOMO, R. C.; FRANCO, M.; FINOTELLI, P. V.; AMARAL, P. F. Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 889-902, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.174>.

CARVALHO, J. K.; PANATTA, A. A. S.; SILVEIRA, M. A. D.; TAV, C.; JOHANN, S.; RODRIGUES, M. L. F.; MARTINS, C. V. B. Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00630, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00630>.

CARVALHO, J. K., KRÜGER, C., SILVEIRA, M. A. D., PIANA, P. A., RODRIGUES, M. L. F., ROSADO, A. F., LUCCA, R. A. S; FAGUNDES-KLEIN, M. R.; SILVA, E. A.; BIZANELLO, C. V.; TELEKEN, J. G.; ZANELLA, R. A. Lipolytic production from solid-state fermentation of the filamentous fungus *Penicillium polonicum* and its applicability as biocatalyst in the synthesis of ethyl oleate. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33007-4>.

CARVALHO, J. K.; KRÜGER, C.; SILVEIRA, M. A. D.; PIANA, P. A.; RODRIGUES, M. L. F.; ROSADO, A. F.; DE LUCCA, R. A. S.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; DA SILVA, E. A.; BUZANELLO, C. V.; TELEKEN, J. G.; ZANELLA, R. A. Lipolytic production from solid-state fermentation of the filamentous fungus *Penicillium polonicum* and its applicability as biocatalyst in the synthesis of ethyl oleate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 19, p. 28632-28643, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33007-4>.

CHANDRA, P.; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-42, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.

CHEN, K.; ARNOLD, F. H. Engineering new catalytic activities in enzymes. **Nature Catalysis**, v. 3, n. 3, p. 203-213, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0385-5>.

COSTA JR, E. S.; MANSUR, H. Sander. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, p. 1460-1466, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000600034>.

COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F.; SOUZA, C. R. F.; DE CASTRO, H. F.; BACHMANN, L.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. 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, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217>.

COŞKUN, G.; ÇIPLAK, Z.; YILDIZ, N.; MEHMETOĞLU, Ü. Immobilization of *Candida antarctica* lipase on nanomaterials and investigation of the enzyme activity and enantioselectivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 430-445, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03443-2>.

CZAJA, R. Cluster-Screening–eine effiziente Methode zur Identifizierung neuer Enzyme. **BioSpektrum**, v. 21, n. 3, p. 344-346, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12268-015-0580-0>.

DARRAS, V.; NELEA, M.; WINNIK, F. M.; BUSCHMANN, M. D. Chitosan modified with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance imaging of DNA/chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 4, p. 1137-1146, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.035>.

DE MOURA DICKEL, J. D.; CARVALHO, J. K.; SILVEIRA, M. A. D.; MENEGOTTO DOS SANTOS, P.; RODRIGUES, M. L. F.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; DA ROSA, M. F. *Aspergillus sclerotiorum* lipolytic activity and its application in bioremediation of high-fat dairy wastewater environments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 13, p. 35517-35527. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24669-z>.

DE SOUZA, C. E. C.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. 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**, v. 189, n. 3, p. 933-959, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03047-5>.

DESAI, P. D.; DAVE, A. M.; DEVI, S. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food chemistry**, v. 95, n. 2, p. 193-199, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.030>.

DIVYA, K.; PADMA, P. Naga. Psychrophilic yeast isolates for cold-active lipase production. **Int. J. Sci. Prog. Res**, v. 10, p. 93-97, 2015.

DLANGAMANDLA, C.; DYANTYI, S. A.; MPENTSHU, Y. P.; NTWAMPE, S. K. O. Optimisation of bioflocculant production by a biofilm forming microorganism from poultry slaughterhouse wastewater for use in poultry wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 8, p. 1963-1968, 2016. Doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2016.047>.

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DOBREVA, V.; STRINSKA, H.; DOYKINA, P.; KRASTANOV, A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.011>.

ELDIN, A. M.; KAMEL, Z.; HOSSAM, N. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 309-314, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.020>.

ELEGADO, F.; LEGASPI, C. L.; PAET, J. M.; QUERUBIN, F.; TOLENTINO, J. E.; VILELA, J.; PAGUIO JR, A.; MALOLES, J.; ZARATE, J. Screening, identification and optimization of extracellular lipase production of yeast (*Cryptococcus flavescens*) isolated from a tree canopy

fern in the Mount Makiling Forest Reserve, Philippines. In: **AIP Conference Proceedings**. **AIP Publishing LLC**, 2019. p. 020029. Doi: <https://doi.org/10.1063/1.5125533>.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273-277, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>.

FATIMA, S.; FARYAD, A.; ATAA, A.; JOYIA, F. A.; PARVAIZ, A. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 445-458, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1002/bab.2019>.

FATIMA, F.; DU, H.; KOMMALAPATI, R. R. Treatment of poultry slaughterhouse wastewater with membrane technologies: a review. **Water**, v. 13, n. 14, p. 1905, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/w13141905>.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.08.004>.

FIBRIANA, F.; UPAICHIT, A.; CHEIRSILP, B. Low-cost production of cell-bound lipases by pure and co-culture of yeast and bacteria in palm oil mill effluent and the applications in bioremediation and biodiesel synthesis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-22, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02070-z>.

FONSECA, J. M.; TELEKEN, J. G.; DE CINQUE ALMEIDA, V.; DA SILVA, C. Biodiesel from waste frying oils: Methods of production and purification. **Energy Conversion and Management**, v. 184, p. 205-218, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.01.061>.

GAO, B.; XU, T.; LIN, J.; ZHANG, L.; SU, E.; JIANG, Z.; WEI, D. Improving the catalytic activity of lipase LipK107 from *Proteus* sp. by site-directed mutagenesis in the lid domain

based on computer simulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 3-4, p. 286-291, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.12.001>.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, p. 125368, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>.

GUISAN, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; BOLIVAR, J. M.; ROCHA-MARTÍN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G. The science of enzyme immobilization. **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols**, p. 1-26, 2020.

GÜR, S. D.; İDİL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of enzyme co-immobilization with sodium alginate and glutaraldehyde-activated chitosan beads. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, p. 538-552, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2566-5>.

GOLLAKOTA, A. R. K.; VOLLI, V.; SHU, C. M. Transesterification of waste cooking oil using pyrolysis residue supported eggshell catalyst. **Science of the Total Environment**, v. 661, p. 316-325, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.165>.

GRAJALES-HERNÁNDEZ, D. A.; VELASCO-LOZANO, S.; ARMENDÁRIZ-RUIZ, M. A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J. A.; CAMACHO-RUÍZ, R. M.; ASAFF-TORRES, A.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; MATEOS-DÍAZ, J. C. Carrier-bound and carrier-free immobilization of type A feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: Searching for an operationally stable heterogeneous biocatalyst for the synthesis of butyl hydroxycinnamates J. Biotechnol., v. 316, p. 6-16, 2020. Doi: [10.1016/j.jbiotec.2020.04.004](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.004).

GUO, Y.; YANG, D. P.; LIU, M.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; HUANG, J.; LI, Q.; LUQUE, R. Enhanced catalytic benzene oxidation over a novel waste-derived Ag/eggshell catalyst. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 7, n. 15, p. 8832-8844, 2019.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975. Doi: <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019782>.

HELAL, S. E.; ABDELHADY, H. M.; ABOU-TALEB, K. A.; HASSAN, M. G.; AMER, M. M. Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00094-y>.

HERMANSYAH, H.; MARESYA, A.; PUTRI, D. N.; SAHLAN, M.; MEYER, M. Production of dry extract lipase from *Pseudomonas aeruginosa* by the submerged fermentation method in palm oil mill effluent. **International Journal of Technology**, v. 9, n. 2, p. 325-334, 2018.

HILARES, R. T.; ATOCHE-GARAY, D. F.; PAGAZA, D. A. P.; AHMED, M. A.; ANDRADE, G. J. C.; SANTOS, J. C. Promising physicochemical technologies for poultry slaughterhouse wastewater treatment: a critical review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105174, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105174>.

HISHAM, F.; AKMAL, M. M.; AHMAD, F. B.; AHMAD, K. Facile extraction of chitin and chitosan from shrimp shell. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 2369-2373, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.329>.

ILESANMI, O. I.; ADEKUNLE, A. E.; OMOLAIYE, J. A.; OLORODE, E. M.; OGUNKANMI, A. L. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. **Scientific African**, v. 8, p. e00279, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00279>.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 23-34, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.

KARIMI, A.; SHOJAOSADATI, S. A.; HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; HASHEMI, M. Porosity changes during packed bed solid-state fermentation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 4022-4027, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.01.001>.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, T.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for

the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

KARTAL, F. Enhanced esterification activity through interfacial activation and cross-linked immobilization mechanism of *Rhizopus oryzae* lipase in a nonaqueous medium. **Biotechnology progress**, v. 32, n. 4, p. 899-904, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.2288>.

KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG, Y. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 16, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>.

KONG, J; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007. Doi: DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.

KUHLMANN, J.; KRETSCHMANN, A. C.; BESTER, K.; BOLLMANN, U. E.; DALHOFF, K.; CEDERGREEN, N. Enantioselective mixture toxicity of the azole fungicide imazalil with the insecticide α -cypermethrin in *Chironomus riparius*: investigating the importance of toxicokinetics and enzyme interactions. **Chemosphere**, v. 225, p. 166-173, 2019. Doi: 166-173, 10.1016/j.chemosphere.2019.03.023.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 13-27, 2012.

KUMAR, L.; NAGAR, S.; MITTAL, A.; GARG, N.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. **Journal of food science and technology**, v. 51, p. 1737-1749, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1268-z>.

KUMAR, A.; GUPTA, R. Functional characterization of a novel aspartic acid rich lipase, TALipC, from *Trichosporon asahii* MSR54: solvent-dependent enantio inversion during esterification of 1-phenylethanol. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 1, p. 121-130, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1648-5>.

KUMAR, L.; BHARADVAJA, N. Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight environmental pollutants. In: Smart Bioremediation Technologies. **Academic Press**, 2019. p. 99-118. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00006-8>

KUMAR, A.; THAKUR, I. S. Biodiesel production from transesterification of *Serratia* sp. ISTD04 lipids using immobilised lipase on biocomposite materials of biomineralized products of carbon dioxide sequestrating bacterium. **Bioresource technology**, v. 307, p. 123193, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123193>.

KUNDU, K.; DAS, A.; BARDHAN, S.; CHAKRABORTY, G.; GHOSH, D., KAR, B.; PAUL, B. K. The mixing behaviour of anionic and nonionic surfactant blends in aqueous environment correlates in fatty acid ester medium. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 504, p. 331-342, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.078>.

LAN, D.; QU, M.; YANG, B.; WANG, Y. Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces* sp. strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 62-67, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.06.003>.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products (A) the upgrading concept (B) practical implementations. **Bioresource technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LI, Y.; LIU, T.; ZHENG, J.; XU, X. Glutaraldehyde-crosslinked chitosan/hydroxyapatite bone repair scaffold and its application as drug carrier for icariin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 3, p. 1539-1547, 2013. Doi: 10.1002/app.39339.

LIU, J.; MA, R. T.; SHI, Y. P. "Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods"- A review. **Analytica Chimica Acta**, 1101, 9-22. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.073>.

LIU, Y.; GUO, Z. Small functional hydrogels with big engineering applications. **Materials Today Physics**, p. 101397, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtphys.2024.1013>.

LONDOÑO-HERNANDEZ, L.; RUIZ, H. A.; RAMÍREZ, T. C.; ASCACIO, J. A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Fungal detoxification of coffee pulp by solid-

state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101467, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101467>.

LOPES, V. R. O.; FARIAS, M. A.; BELO, I. M. P.; COELHO, M. A. Z. Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 261-270, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160332s20150146>.

LUTZ, Instituto Adolfo. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. *São Paulo: ANVISA*, 2008.

MADZAK, C. Engineering *Yarrowia lipolytica* for use in biotechnological applications: a review of major achievements and recent innovations. **Molecular biotechnology**, v. 60, n. 8, p. 621-635, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0093-4>.

MAHARANA, A. K.; SINGH, S. M. A cold and organic solvent tolerant lipase produced by Antarctic strain *Rhodotorula* sp. Y-23. **Journal of basic microbiology**, v. 58, n. 4, p. 331-342, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.201700638>.

MAHMOUD, G. A.; KOUTB, M. M.; MORSY, F. M.; BAGY, M. M. Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. **European Journal of Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 70-77, 2015.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **J Appl Biotechnol Bioeng**, v. 4, n. 1, p. 91, 2017.

MANTZOURIDOU, F. Th; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. **Biochemical engineering journal**, v. 101, p. 1-8, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.013>.

MASSOUD, R.; HADIANI, M. R.; HAMZEHLU, P.; KHOSRAVI-DARANI, K. Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 56-60, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.003>.

MEDEIROS, A. O.; MISSAGIA, B. S.; BRANDÃO, L. R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F. A.; ROSA, C. A. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the

Rio Doce basin in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1582-1594, 2012.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143-158, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>.

MENEGASSI, L. C.; ROSSI, F.; DOMINICAL, L. D.; TOMMASO, G.; MONTES, C. R.; GOMIDE, C. A.; GOMES, T. M. Reuse in the agro-industrial: Irrigation with treated slaughterhouse effluent in grass. **Journal of Cleaner Production**, v. 251, p. 119698, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119698>.

MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 348-364, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9429-2>.

MONTEIRO, R. R.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; BERENQUER-MURCIA, A.; DA ROCHA, T. N.; DOS SANTOS, J. C.; ALCANTARA, A. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141-154, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends microbial lipases”. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1163-1196, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9849-7>.

NAGHDI, M.; TAHERAN, M.; BRAR, S. K.; KERMANSHAHI-POUR, A.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. **Environmental pollution**, v. 234, p. 190-213, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.060>.

NEMA, A.; PATNALA, S. H.; MANDARI, V.; KOTA, S.; DEVARAI, S. K. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0125-7>.

NIGAM, S.; MEHROTRA, S.; VANI, B.; MEHROTRA, R. Lipase immobilization techniques for biodiesel production: an overview. *Int. J. Renew. Energy Biofuels*, v. 2014, p. 664708, 2014. Doi: 10.5171/2014.664708.

NUC, Z; DOBRZYCKA-KRAHEL, A. From chitin to chitosana potential natural antimicrobial agent. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 26, p. 23-40, 2021. Doi: <https://doi.org/10.15259/PCACD.26.003>.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.; RODRIGUES, M.L.F.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B. Lipase production by endophytic yeast through factorial design. **Academia Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 16–21, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.15413/ajmr.2013.0005>.

OMAR, B. A.; ELMASRY, R., EITA, A.; SOLIMAN, M. M.; EL-TAHAN, A. M.; SITOHY, M. Upgrading the preparation of high-quality chitosan from *Procambarus clarkii* wastes over the traditional isolation of shrimp chitosan. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 911-919, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.014>

OKURA, N. S; SABI, G. J; CRIVELLENTI, M. C; GOMES, R. A; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 550-561, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021>.

OSUNA, Y.; SANDOVAL, J.; SAADE, H.; LÓPEZ, R. G.; MARTINEZ, J. L.; COLUNGA, E. M.; ILYINA, A. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, p. 1437-1445, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1385-8>.

PALUZAR, H.; TUNCAY, D.; AYDOGDU, H. Production and characterization of lipase from *Penicillium aurantiogriseum* under solid-state fermentation using sunflower pulp. **Biocatalysis**

and Biotransformation, v. 39, n. 4, p. 333-342, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1901888>.

PEKCAN, V.; YILMAZ, M. I.; EVCI, G.; CIL, A. N.; SAHIN, V.; GUNDUZ, O.; KOC, H.; KAYA, Y. Oil content determination on sunflower seeds in drought conditions. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. e15481, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15481>.

PETER, S.; LYCZKO, N.; GOPAKUMAR, D.; MARIA, H. J.; NZIHOU, A.; THOMAS, S. Chitin and chitosan based composites for energy and environmental applications: a review. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 4777-4804, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01244-6>.

PINHEIRO, B. B.; RIOS, N. S.; AGUADO, E. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, T. M.; FECHINE, P. B.; GONÇALVES, L. R. 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**, v. 130, p. 798-809, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>.

PITA-LÓPEZ, M. L.; FLETES-VARGAS, G.; ESPINOSA-ANDREWS, H.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. Physically cross-linked chitosan-based hydrogels for tissue engineering applications: A state-of-the-art review. **European Polymer Journal**, v. 145, p. 110176, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110176>.

PRASAD, S.; ROY, I. Converting enzymes into tools of industrial importance. **Recent patents on biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 33-56, 2018. Doi: <https://doi.org/10.2174/1872208311666170612113303>.

PRIYANKA, P.; TAN, Y.; KINSELLA, G. K.; HENEHAN, G. T.; RYAN, B. J. Solvent stable microbial lipases: current understanding and biotechnological applications. **Biotechnology letters**, v. 41, n. 2, p. 203-220, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02633-7>.

POLETTI, P.; POLIDORO, T. A.; ZENI, M.; DA SILVEIRA, M. M. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 92-101, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>.

PUNEKAR, N. S. *Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms*. Springer, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0>.

PUTRI, D. N.; KHOOTAMA, A.; PERDANI, M. S.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v. 6, p. 331-335, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064>.

QUEIROZ, M. F.; TEODOSIO MELO, K. R.; SABRY, D. A.; SASSAKI, G. L.; ROCHA, H. A. O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. **Marine drugs**, v. 13, n. 1, p. 141-158, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3390/md13010141>.

QU, B; LUO, Y. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 437-448, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.240>.

RAFIEE, F.; REZAEI, M. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 170-195, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198>.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1, 2015. Doi: 10.1042/bse0590001.

RODRIGUES, R. C; VIRGEN-ORTÍZ, J. J; DOS SANTOS, J. C; BERENQUER-MURCIA, Á.; ALCÂNTARA, A. R; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>.

SAHOO, R. K.; DAS, A.; GAUR, M.; SAHU, A.; SAHOO, S.; DEY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SUBUDHI, E. Parameter optimization for thermostable lipase production and performance

evaluation as prospective detergent additive. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 6, p. 578-584, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1719513>

SALES, J. C. S.; DE CASTRO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Z.; COELHO, M. A. Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly (ethylene terephthalate) (PET) depolymerization reactions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 6, p. 457-468, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1782387>.

SALGADO, V.; FONSECA, C.; LOPES DA SILVA, T.; ROSEIRO, J. C.; EUSÉBIO, A. Isolation and identification of *Magnusiomyces capitatus* as a lipase-producing yeast from olive mill wastewater. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 7, p. 3207-3221, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00725-7>.

SANDHYA, A.; SRIDEVI, A.; SUARNALATHA, D.; NARASIMHA, G. Production and optimization of phytase by *Aspergillus niger*. **Pharm. Lett**, v. 7, p. 148-153, 2015.

SCHMIDT, C. G.; FURLONG, E. B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36-41, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.081>.

SEPTIANA, I.; SIAMI, L.; TAZKIATURRIZKI, T.; HADISOEBROTO, R.; RATNANINGSIH, R. Analysis of load variation on chicken slaughterhouse waste water treatment using GAS-SBR. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 022109. Doi: [doi:10.1088/1742-6596/1402/2/022109](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/2/022109).

SHAHEDI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; A.S. HABI; M. A. Co-immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase and *Candida antarctica* lipase B and optimization of biocatalytic biodiesel production from palm oil using response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 141, p. 847-857, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.042>.

SHAKERIAN, F.; ZHAO, J.; LI, S. P. Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants A review. **Chemosphere**, v. 239, p. 124716, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124716>.

SHENVI, S. S.; RASHID, S. A.; ISMAIL, A. F.; KASSIM, M. A.; ISLOOR, A. M. Preparation and characterization of PPEES/chitosan composite nanofiltration membrane. **Desalination**, v. 315, p. 135-141, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.09.009>.

SILVA, J. N.; GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G. Impact of Extraction Parameters on the Recovery of Lipolytic Activity from Fermented Babassu Cake. **PLoS One**, v. 9, p. e103176–e103179, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103176>.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>.

SOBREIRA, T. G.; SILVA, L. A. D.; MENEZES, F. D. D.; FRANÇA, E. J.; AQUINO, K. A. D. S. Aspectos estruturais de esferas de quitosana/PVA reticuladas com glutaraldeído submetidos a diferentes tratamentos térmicos. **Química Nova**, v. 43, p. 1251-1257, 2020. Doi: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170613>.

SOCCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>.

SOUZA, C. E. C.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. 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**, v. 189, n. 3, p. 933-959, 2019.

STEUDLER, S.; WERNER, A.; WALTHER, T. It is the mix that matters: Substrate-specific enzyme production from filamentous fungi and bacteria through solid-state fermentation. **Solid State Fermentation**, p. 51-81, 2019. Doi: https://doi.org/10.1007/10_2019_85.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 168, n. 3, p. 1070-1074, 1986. Doi: <https://doi.org/10.1128/jb.168.3.1070-1074.1986>.

SU, Y.; LIU, C.; FANG, H.; ZHANG, D. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>.

SUBROTO, E.; INDIARTO, R.; PANGAWIKAN, A. D.; HUDA, S.; YARLINA, V. P. Characteristics, immobilization, and application of *Candida rugosa* lipase. **Food Research**, v. 4, n. 5, p. 1391-1401, 2020. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(5\).060](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(5).060).

SUKMA, A.; JOS, B.; SUMARDIONO, S. Kinetic of biomass growth and protein formation on rice bran fermentation using *Rhizopus oryzae*. In: **MATEC Web of Conferences**. EDP Sciences, 2018. p. 01023.

TAHERI-KAFRANI, A.; KHARAZMI, S.; NASROLLAHZADEH, M.; SOOZANIPOUR, A.; EJEIAN, F.; ETEDALI, P.; MANSOURI-TEHRANI, HA.; RAZMJOU, A.; YEK, S. MG.; VARMA, R. S. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 19, p. 3160-3196, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793726>.

TAMBUNAN, U. S. F.; RANDY, A.; PARIKESIT, A. A. Design of *Candida antarctica* lipase B thermostability improvement by introducing extra disulfide bond into the enzyme. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 2, p. 108-118, 2014.

TAO, Z.; DONG, B.; TENG, Z.; ZHAO, Y. The classification of enzymes by deep learning. **IEEE Access**, v. 8, p. 89802-89811, 2020. Doi: 10.1109/ACCESS.2020.2992468.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. **Int J Sci Eng Res**, v. 3, n. 7, p. 1-29, 2012.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R.; MUNIYANDI, B.; RANGANATHAN, S.; LIN, L. Catalysis in biodiesel production a review. **Clean Energy**, v. 3, n. 1, p. 2-23, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1093/ce/zky020>

THAPA, S.; LI, H.; OHAIR, J.; BHATTI, S.; CHEN, F. C.; NASR, K. A.; JOHNSON, T.; ZHOU, S. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. **Molecular biotechnology**, v. 61, n. 8, p. 579-601, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>.

TONG, X.; BUSK, P. K.; LANGE, L. Characterization of a new sn-1, 3-regioselective triacylglycerol lipase from *Malbranchea cinnamomea*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 4, p. 471-478, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/bab.1394>.

VAKIL, M. M. A.; MENDHULKAR, V. D. Salicylic acid and chitosan mediated abiotic stress in cell suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. for andrographolide synthesis. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 9, p. 3453, 2013.

VANDENBERGHE, L. P.; PANDEY, A.; CARVALHO, J. C.; LETTI, L. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; KARP, S. G.; THOMAZ-SOCCOL, S.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. J.; PENHA, R. O.; HERMANN, L. W.; SOCCOL, C. R. Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 1, n. 2, p. 142-165, 2021.

VERMA, M. L.; KUMAR, S.; DAS, A.; RANDHAWA, J. S.; CHAMUNDEESWARI, M. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 315-323, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00942-5>

VIKRANT, K.; KIM, K. H.; DONG, F.; HEYNDERICKX, P. M.; BOUKHVALOV, D. W. Low-temperature oxidative removal of gaseous formaldehyde by an eggshell waste supported silver-manganese dioxide bimetallic catalyst with ultralow noble metal content. **Journal of Hazardous Materials**, v. 434, p. 128857, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128857>.

VYAS, S.; CHHABRA, M. Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: a cellulase and lipase producing oleaginous yeast. **Bioresource technology**, v. 223, p. 250-258, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.039>.

YAAKOB, M. A.; MOHAMED, R. M. S. R.; AL-GHEETHI, A. A. S.; KASSIM, A. H. M. Characteristics of chicken slaughterhouse wastewater. **Chemical Engineering Transactions**, v. 63, p. 637-642, 2018. Doi: [10.3303/CET1863107](https://doi.org/10.3303/CET1863107).

YAŞAR, F. Biodiesel production via waste eggshell as a low-cost heterogeneous catalyst: Its effects on some critical fuel properties and comparison with CaO. **Fuel**, v. 255, p. 115828, 2019.

WANG, J; CHEN, C. Chitosan-based biosorbents: modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. **Bioresource technology**, v. 160, p. 129-141, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.110>.

ZHANG, Y.; HE, S.; SIMPSON; B. K. Enzymes in food bioprocessing Novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current opinion in food science**, V. 19, P. 30-35, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015. Doi: <https://doi.org/10.3390/md13031133>.