

Imobilização celular da levedura termotolerante *Pichia kudriavzevii* SD5 em alginato de cálcio para descoloração do azo corante Vermelho Congo

¹ Camila Parente da Silva Alem Marinho, ¹ Talita Lopes Honorato, ² Marcia Luciana Cazetta

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil E-mails: mila.alem@gmail.com, talitahonorato@ufrb.edu.br

² Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil E-mail: malucz@ufrb.edu.br

Resumo: Este trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de imobilização celular (IC) da levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 em alginato de cálcio para descoloração do azo-corante Vermelho Congo. Para isso, foram produzidos imobilizados (*pellets*) com três concentrações de alginato (3, 4 e 5%). Após a imobilização celular, a taxa de descoloração foi estudada por meio de fermentação submersa contendo Meio Normal de Descoloração (MND) com Vermelho Congo a 200 ppm e inoculado com os *pellets* contendo a levedura imobilizada, agitação de 150 rpm, durante 48 horas a 43 °C. Os melhores resultados foram obtidos com os *pellets* de alginato de cálcio a 4%, atingindo uma taxa de descoloração de cerca de 90%. A estabilidade dos *pellets* foi testada em ciclos sucessivos de reutilização e mantiveram a taxa de descoloração acima de 80% durante 23 dias, até seu rompimento no 24º dia. A imobilização das células de *P. kudriavzevii* SD5 mostrou-se bastante promissora para aplicação em processos de degradação de corantes, não somente devido à elevada taxa de descoloração, mas também pela resiliência dos *pellets*, o que possibilitou sua reutilização por muitos ciclos de fermentação.

Palavras chave: Fungos, Biodegradação, Microencapsulação

Calcium alginate cellular immobilization of thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* SD5 for Red Congo dye discoloration

Abstract: This work aimed to use the cell immobilization (CI) technique of the yeast *Pichia kudriavzevii* SD5 in calcium alginate to decolorize the Congo Red azo dye. For this, pellets were produced with three concentrations of alginate (3, 4 and 5%). After cell immobilization, the discoloration rate was studied by submerged fermentation containing Normal Discoloration Medium (NDM) with Congo Red at 200 ppm and inoculated with the pellets containing the immobilized yeast, stirring at 150 rpm, for 48 hours at 43 °C. The best results were obtained with pellets of calcium alginate at 4%, reaching a discoloration rate of about 90%. The stability of the pellets was tested in successive reuse cycles and maintained the discoloration rate above 80% for 23 days, until their rupture on the 24th day. The immobilization of *P. kudriavzevii* SD5 cells proved to be very promising for application in dye degradation processes, not only due to the high rate of discoloration, but also due to the resilience of the pellets, which allowed their reuse for many fermentation cycles.

Keywords: Fungi, Biodegradation, Microencapsulation

Introdução

O processo tecnológico de biorremediação utiliza sistemas biológicos para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação ou adsorção de poluentes. A biorremediação microbiana consiste, basicamente, em um processo natural onde os microrganismos, e/ou suas enzimas, convertem os contaminantes ambientais em compostos menos tóxicos (Sharma et al., 2018 & Quintella et al., 2019).

Nas últimas décadas, a imobilização de células microbianas vem apresentando interesse crescente, inclusive no tratamento de resíduos industriais poluentes e sua conversão em nutrientes, biomassa e CO₂ (Martins et al., 2013). Em processos de biorremediação são descritas técnicas tanto de imobilização da biomassa microbiana, quanto de suas enzimas, utilizadas na adsorção de metais pesados e degradação de corantes industriais em diferentes suportes (Bilal, Asgher, 2015, Mahmoud & Mohamed, 2017, Dayi et al., 2018 & Vikrant et al., 2018). Entretanto, a técnica de imobilização celular (IC) é mais prática quando comparada à imobilização de enzimas, já que não requer métodos de extração, isolamento e purificação, além de ser uma alternativa para preservar a atividade catalítica dos microrganismos (Prasad et al., 2005 & Covizzi et al., 2007). De acordo com Freeman e Lilly (1998), essa técnica consiste no confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando sua reutilização.

Um dos microrganismos utilizados para biorremediação, especialmente em pH ácido, são as leveduras, cuja biomassa apresenta baixo custo e está prontamente disponível (Mahmoud & Mohamed, 2017). As leveduras possuem algumas vantagens biotecnológicas quando comparadas com outros microrganismos, pois crescem rapidamente como as bactérias e resistem a ambientes desfavoráveis, como pH ácidos, como fungos filamentosos (Yu & Wen, 2005). Estas características, dentre outras, tornam esses fungos bastante promissores para aplicação em sistemas de biorremediação, como a capacidade de crescer sob as condições de estresse ambiental que podem limitar o crescimento bacteriano (Chander, Arora & Bath, 2004).

Vários estudos vêm empregando células de leveduras imobilizadas em suportes orgânicos ou

inorgânicos para aplicação em diferentes processos industriais, como na produção de etanol, enzimas e açúcar invertido (Duarte et al., 2013, Taskin et al., 2016, Martínez et al., 2017, Stepanov & Efremenko, 2017). Sais de alginato são alguns dos suportes mais utilizados para imobilização. O alginato é um heteropolissacarídeo composto de ácido glicurônico e ácido manurônico em ligação β-1,4, extraído de algas marinhas ou obtido por meio da produção microbiana por bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas*. Esse polímero de baixo custo apresenta uma ampla aplicação devido à sua capacidade de formar géis na presença de cátions multivalentes como Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Co²⁺ e Ba (Müller et al., 2011, Mahmoud, Mohamed, 2017, Natarajan & Ponnaiah, 2017).

A imobilização é descrita como um método que ajuda a aumentar a estabilidade e a reutilização dos biocatalizadores (Vikrant et al., 2018). Nesse contexto, o presente trabalho estudou a técnica de imobilização celular da levedura termotolerante *P. kudriavzevii* SD5 na descoloração de corantes industriais, utilizando como modelo o azocorante Vermelho Congo.

Material e métodos

Microrganismo: foi utilizada a levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 do acervo de leveduras do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia [UFRB], isolada de moluscos coletados no município de São Francisco do Conde, na Baía de Todos os Santos. A levedura foi mantida a -80 °C em tubos criogênicos contendo meio GYMP líquido (glicose 2%; extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e fosfato de sódio 0,2%) adicionado de 10% de glicerol.

Corante: o corante modelo utilizado para avaliar a eficiência do método da Imobilização Celular (IC) foi o Vermelho Congo na concentração de 200 ppm.

Meio de cultivo: os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer contendo 150 mL de Meio Normal de Descoloração (MND) modificado, segundo Ramalho et al. (2004), contendo (g/L): extrato de levedura (2,5), KH₂PO₄ (5), MgSO₄·7H₂O (0,5), CaCl₂·2H₂O (0,13) e glicose (20). Ao meio de cultivo foi transferido um inóculo com densidade óptica de 0,8 a 550 nm (DO₅₅₀) e os frascos foram acomodados em

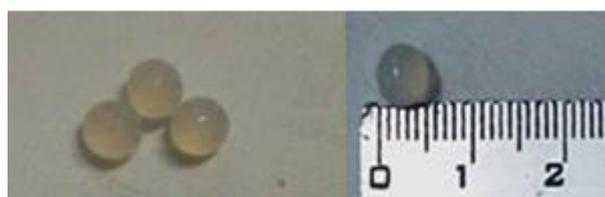
câmara agitadora a 150 rpm, 43 ± 2 °C, por 24 horas. Em seguida, foi realizado o processo de imobilização das células.

Imobilização das células da levedura *P. kudriavzevii* SD5: as células livres cultivadas em meio MND durante 24 horas foram transferidas para a solução estéril de alginato de sódio na proporção de 1:20 inóculo:alginato de sódio (v/v) em diferentes concentrações de alginato: 3, 4 e 5%. Para a imobilização celular, a mistura de alginato de sódio e células foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M para a formação das estruturas imobilizadas (*pellets*) de alginato de cálcio, uma vez que o alginato de sódio realiza ligações iônicas cruzadas com os

íons de cálcio, substituindo o íons de sódio pelos íons de cálcio. Os *pellets* foram submetidos a um período de cura em cloreto de cálcio a 0,2 M por 24 horas em temperatura de refrigeração para a fixação das estruturas celulares.

Após o período de cura, os *pellets* foram lavados em tampão acetato de sódio 0,02 M (pH 5,0) por três vezes até que os resíduos de cloreto de cálcio fossem removidos. Em seguida, foram estocados em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M em temperatura de refrigeração até sua utilização. Os *pellets* formados a partir da técnica de IC apresentaram cor branca e forma esférica, com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro (Figura 1).

Figura 1 - *Pellets* de alginato de cálcio a 4% contendo as células imobilizadas de *P. kudriavzevii* SD5.



Fermentação submersa utilizando as células imobilizadas de *P. kudriavzevii* SD5: Os ensaios de fermentação submersa foram realizados a 150 rpm, pH 5,0 e temperatura de 43 ± 2 °C em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio MND acrescido do corante Vermelho Congo a 200 ppm. Para o inóculo, 10 g de *pellets* com as células imobilizadas da levedura *P. kudriavzevii* SD5 foram transferidas para o meio, correspondendo a 10% do volume final. O controle foi realizado sem os *pellets*, contendo apenas o meio MND acrescido do corante Vermelho Congo a 200 ppm. Os ensaios foram realizados em duplicata durante 48 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas e centrifugadas a 5000 rpm, 4 °C por 20 minutos para separação entre o sobrenadante e os *pellets*. A porcentagem de descoloração foi obtida por meio da leitura da absorbância do sobrenadante a 470 nm, utilizando seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração(\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Onde: (A) indica a absorbância do meio não inoculado (controle) e (B) indica a absorbância residual do meio.

Estabilidade do imobilizado: para avaliar a resistência e reutilização dos *pellets* com a levedura imobilizada, estes foram submetidos a sucessivas fermentações em meio MND contendo 200 ppm do corante, em duplicata, a 150 rpm, pH 5,0 e temperatura de 43 ± 2 °C. A cada 24 horas, os *pellets* foram filtrados e lavados com tampão acetato de sódio 0,02 M para a retirada de resíduos da fermentação e reutilizados, reiniciando-se um novo ciclo de fermentação. O sobrenadante, obtido após centrifugação a 5000 rpm a 4 °C por 20 minutos, foi utilizado para a determinação da taxa de descoloração.

Resultados e discussão

Efeito da concentração do alginato de cálcio na descoloração do corante Vermelho Congo

Dentre os *pellets* contendo células imobilizadas de *P. kudriavzevii* SD5, aqueles com concentração de 4% de alginato de cálcio

mostraram-se mais eficientes na descoloração, tornando o meio esbranquiçado após 24 horas de cultivo. Nos demais ensaios, com alginato de cálcio a 3% e 5%, não ocorreu descoloração

(Figura 2). Além disso, em alginato de cálcio a 3% foi observada maior adsorção do corante pelos *pellets*, que adquiriram coloração avermelhada.

Figura 2 - Efeito da concentração de alginato de cálcio na descoloração do corante Vermelho Congo por células imobilizadas da levedura *P. kudriavzevii* SD5: a) em alginato de cálcio a 4% após 24 h; b) em alginato de cálcio a 4% após 48 h; c) em alginato de cálcio a 3% e d) em alginato de cálcio a 5%.



Silva et al. (2006) afirmam que o tamanho do poro e o grau de hidrofobicidade da matriz dos *pellets* interferem no grau de adesão das substâncias. Isso pode explicar a aderência do corante ao *pellet* na concentração de 3%, já que nessa concentração a matriz fica mais porosa permitindo uma maior troca entre o meio de cultivo e os *pellets*. Por outro lado, Dias et al. (2001) observaram redução da taxa de assimilação de oxigênio em concentrações maiores de alginato de bário por células imobilizadas de *Candida guilhermondii* UFMG-Y65, o que reduziu a difusão do oxigênio para os *pellets*. Segundo esses autores, em geral, o suprimento de oxigênio diminui em células imobilizadas em alginato devido ao aumento da concentração celular, diâmetro do *pellet* e aumento na concentração de alginato. Isso pode explicar o decaimento na taxa de descoloração nos *pellets* formados por alginato de cálcio a 5% para *P. kudriavzevii* SD5. Segundo Seifan et al. (2017), a imobilização ideal é aquela que permite a transferência de massa, como nutrientes e oxigênio, para facilitar o bioprocessamento enquanto protege as células do ambiente ao redor.

Durante o processo fermentativo foi observado, de um modo geral, um aumento do volume dos *pellets* quando comparado com os experimentos do controle devido à multiplicação celular da levedura dentro da matriz, além de ocorrer aumento da turbidez do meio. Isso ocorre porque, embora a imobilização resulte no aprisionamento das células microbianas no interior dos *pellets*, os poros da matriz do gel do polissacarídeo permitem o deslocamento das

células para o meio externo (Covizzi et al., 2007 & Seifan et al., 2017).

Para comprovar se a descoloração ocorreu devido ao processo de bioadsorção do corante pelos *pellets* ou por meio de biodegradação, foram realizados ensaios com meios de cultura contendo *pellets* de alginato de cálcio a 4% com as leveduras imobilizadas e *pellets* sem as leveduras (controle). O alginato de cálcio apresentou a capacidade de adsorver o corante devido à sua porosidade, pois os *pellets* adquiriram cor avermelhada, entretanto, isso não foi suficiente para promover a descoloração do meio. Por outro lado, o meio contendo os *pellets* com as células imobilizadas da levedura apresentou descoloração, ou seja, o desaparecimento da cor do meio de cultura. Além disso, após o final do processo, os próprios *pellets* contendo a biomassa imobilizada apresentaram coloração esbranquiçada, o que sugere que ocorreu biodegradação. Tan et al. (2014) também observaram a descoloração do meio de cultivo contendo azo corantes por células imobilizadas em alginato de cálcio da levedura *Magnosiomycetes ingens* LH-F1 e também atribuíram esse efeito à biodegradação do corante. Hameed & Ismail (2018) também demonstraram a eficiência do alginato de cálcio na imobilização de uma mistura de células não adaptadas na descoloração, biodegradação e detoxificação do corante azo Vermelho Reativo, mostrando que esta técnica é eficiente na remoção de corantes.

Enquanto a bioadsorção ocorre quando o soluto se liga à biomassa, viva ou morta, em um

processo no qual não há transporte de energia metabólica, a biodegradação é genericamente definida como a hidrólise de compostos químicos. No caso de fungos, essa hidrólise ocorre por meio de enzimas ligninolíticas inespecíficas capazes de hidrolisar uma grande variedade de compostos recalcitrantes, incluindo misturas complexas de poluentes, como os corantes (Kaushik & Malik, 2009). A hidrólise enzimática dos grupos cromóforos dos corantes é o que leva ao desaparecimento da cor do meio de cultivo.

Estabilidade e reutilização dos *pellets*

Para avaliar a capacidade de reutilização dos *pellets*, foram realizados sucessivos ciclos de cultivo. Os *pellets* contendo as células imobilizadas mantiveram-se íntegros durante 23 dias de reuso, sendo que neste período as taxas de descoloração permaneceram elevadas, entre 87% e 95%, e apenas no 24º dia ocorreu o rompimento da estrutura (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Porcentagem de descoloração com *pellets* reutilizados de alginato de cálcio a 4% contendo células imobilizadas de *P. kudrivzevii* SD5.

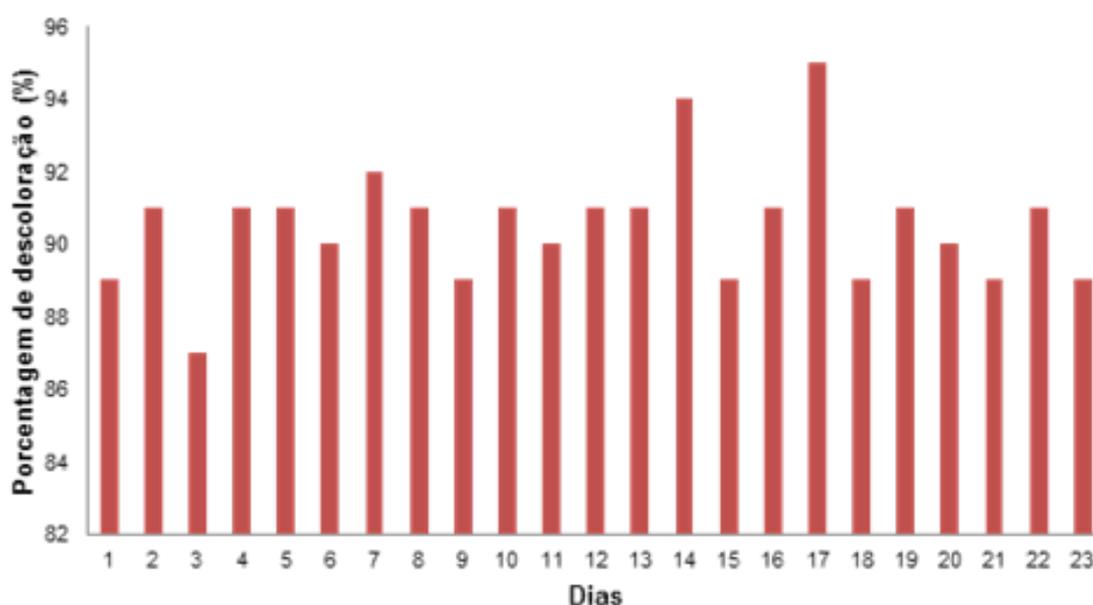


Figura 4 - *Pellets* de alginato de cálcio a 4% rompidos após 24 dias de sucessivas fermentações.



De acordo com Dias et al. (2001), a resistência na transferência de massa oferecida pela matriz dos *pellets* e o crescimento das células imobilizadas provocam um gradiente de

nutrientes através do gel e, com isso, uma distribuição heterogênea da biomassa, que progressivamente aumenta a densidade celular dentro da matriz. Essa distribuição não uniforme

pode ocasionar migrações dos microrganismos da matriz para o meio, fazendo com que a matriz fique instável e, finalmente, resulte no rompimento do imobilizado (Covizzi et al., 2007).

Canilha et al. (2006) e Couto (2009) já haviam descrito que uma das vantagens no uso de microrganismos imobilizados é o favorecimento de processos fermentativos contínuos e repetidos que eliminam a necessidade de adaptação em bateladas sucessivas de fermentação. Além disso, há diminuição do risco de contaminação, principalmente quando os suportes escolhidos para imobilização apresentam elevada resistência (Couto et al., 2000). Tan et al. (2014) também descreveram que células de *Magnusiomyces ingens* LH-F1 imobilizadas em alginato de cálcio mantiveram uma elevada eficiência de descoloração do corante Ácido Vermelho B durante 15 ciclos de tratamento. Além disso, estes autores ainda descreveram que as células imobilizadas apresentaram maior estabilidade e adaptabilidade em uma faixa maior de condições ambientais como agitação, pH e temperatura. Bilal e Asgher (2015) descreveram a possibilidade de reuso da enzima manganês peroxidase imobilizada do fungo *Ganoderma lucidum* IBL-05, mantendo atividade acima de 60% após 5 ciclos de reuso.

Esses resultados comprovam as diversas vantagens da técnica de IC como o aumento da estabilidade e da tolerância diante de condições adversas do meio, como a presença de compostos tóxicos, pois cria uma barreira protetora ao redor das células imobilizadas, o que prolonga a viabilidade celular (Covizzi et al. 2007 & Martins et al., 2013). Além disso, a imobilização provoca alterações na membrana celular, como o aumento da concentração de lipídeos e proteínas, conferindo maior resistência às células (Dias et al., 2001). Talha et al. (2018) comprovaram que as células imobilizadas da bactéria *Brevibacillus parabrevis* em material a base de casca de coco foram mais eficientes na remoção do Vermelho Congo do que as células livres.

Conclusão

A técnica de imobilização celular da levedura *P. kudriavzevii* SD5 demonstrou elevada eficiência na descoloração do corante Vermelho Congo. Os *pellets* de alginato de cálcio apresentaram boa durabilidade, podendo ser reutilizados em vários ciclos fermentativos, o que

pode permitir o desenvolvimento de produtos estáveis para a aplicação em processos de biorremediação.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq] pelos recursos financeiros para realização deste trabalho.

Referências

- Bilal, M., & Asgher, M. (2015). Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. *BMC Biotechnology*, 15 (111), 2-14.
- Canilha, L., Carvalho, W., & Silva, S. S. (2006). Biocatalisadores imobilizados. *Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 9 (36), 48-57.
- Chander, M., Arora, D. S., & Bath, H. K. (2004). Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31 (2) 94-97.
- Couto, S. R., Rivera, I., Muñoz, M. R., & Sanromán, A. (2000). Lignolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packedbed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 23 (3), 287-293.
- Couto, S.R. (2009). Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*, 27 (3), 227-235.
- Covizzi, L. G., Giese, E. C., Gomes, E., Dekker, R. F. H., & Silva, R. (2007). Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 28(2), 143-160.
- Dayi, B., et al. (2018). Investigation of the ability of immobilized cells to different carriers in removal of selected dye and characterization of environmentally friendly laccase of *Morchella esculenta*. *Dyes and Pigments*, 151, 15-21.
- Dias, J.C.T., Rezende, R.P., & Linardi, V.R. (2001). Effects of immobilization in Ba-alginate on

- nitrile-dependent oxygen uptake rates of *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (3), 221-224.
- Duarte, J.C., et al. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3(1), 2-8.
- Freeman, A. & Lilly, M. D. (1998). Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (5), 335-345.
- Hameed, B.B., & Ismail, Z.Z. (2018). Decolorization, biodegradation and detoxification of reactive red azo dye using non-adapted immobilized mixed cells. *Biochemical Engineering Journal*, 137 (20), 71-77.
- Kaushik, P., & Malik, A. (2009). Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International*, 35 (1), 127-141.
- Mahmoud, M.S., & Mohamed, S.A. (2017). Calcium alginate as an eco-friendly supporting material for Baker's yeast strain in chromium bioremediation. *Housing and Building National Research Center*, 13 (3), 245-254.
- Martins, S.C.S., Martins, C.M., Fiuzal, L.M.C.G, & Santarella, S.T. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12 (28), 4412-4418.
- Martínez, D., et al. (2017). Scaling-up batch conditions for efficient sucrose hydrolysis catalyzed by an immobilized recombinant *Pichia pastoris* cells in a stirrer tank reactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 39-42.
- Müller, J.M., Santos, R.L., & Brigido, R.V. (2011). Produção de alginato por microrganismos. *Polímeros*, 21 (4), 305-310.
- Natarajan, E. & Ponnaiah, G.P. (2017). Optimization of process parameters for the decolorization of Reactive Blue 235 dye by barium alginate immobilized iron nanoparticle synthesized from aluminum industry waste. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 7, 73-88.
- Prasad, K. K., Mohan, S.V., Bhaskar, Y. V., & Ramanaiah, P. N. (2005). Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (3), 301-307.
- Quintella, C.M., Mata, A.M.T., & Lima, L.C.P. (2019). Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of Environment Management*, 241, 156-166.
- Ramvalho, P. A., et al. (2004). Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4), 2279-2288.
- Seifan, M., Samani, A.K., Hewitt, S., & Rerenjian, A. (2017). The effect of cell immobilization by calcium alginate on bacterially induced calcium carbonate precipitation. *Fermentation* 3 (57), 2-10.
- Sharma, B., Dangi, A.K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review, *Journal of environmental Management*, 210, 10-22.
- Silva, A. J., et al. (2006). Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe*, 12 (2), 93-98.
- Stepanov, N., & Efremenko, E. (2017). Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. *New Biotechnology*, 34, 54-58.
- Talha, M. A., et al. (2018). Bioremediation of Congo Red dye in immobilized batch and continuous packed bed bioreactor by *Brevibacillus parabrevis* using coconut Shell bio-char, *Bioresource Technology*, 252, 37-43.
- Tan, L. Li, H., Ning, S., & Xu, B. (2014). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Technology*, 158, 321-328.
- Taskin, M., et al. (2016). Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast

Rhodotorula glutinis HL25. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 97-103.

Vikrant, K., et al. (2018). Recent advancements in bioremediation of dye: current status and challenges. *Bioresource Technology*, 253, 355-367.

Yu, Z., & Wen, X. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56 (2), 109-114.

Recebido em: 27/06/2019
Aceito em: 14/05/2020