

VERÔNICA REGINA DE OLIVEIRA LOPES PECLAT

Variação Morfológica de *Yarrowia lipolytica* em Fermentação no Estado Sólido por Técnicas de Análise Digital de Imagens.

RIO DE JANEIRO

VERÔNICA REGINA DE OLIVEIRA LOPES PECLAT

Variação Morfológica de *Yarrowia lipolytica* em Fermentação no Estado Sólido por Técnicas de Análise Digital de Imagens.

Tese submetida ao corpo docente do curso de pósgraduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Zarur Coelho Co-orientadora: Profa. Dra. Isabel Maria Pires Belo

Co-orientadora: Dra. Marcelle Alves Farias

RIO DE JANEIRO 2015

VERÔNICA REGINA DE OLIVEIRA LOPES PECLAT

Variação Morfológica de *Yarrowia lipolytica* em Fermentação no Estado Sólido por Técnicas de Análise Digital de Imagens.

Tese submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 09 de outubr	o de 2015.	
Maria Alice Zarur Coelho,	D. Sc., DEB/EQ/UFRJ	-
Isabel Maria Pires Belo, D.	Sc., DEB/UMINHO - Portugal	-
Marcelle Alves Farias, D. S	Sc., LUBRIZOL	-
	Aline Machado de Castr	o, D. Sc., CENPES/PETROBRAS
	Eliana Flavia Campores	se Sérvulo, D. Sc., DEB/EQ/UFRJ
	Gizele Cardoso Fontes	Sant'Ana, D. Sc., DTPB/IQ/UERJ
	Leda Maria Fort	es Gottschalk, D. Sc., EMBRAPA
	Rodrigo Pires do N	ascimento, D. Sc., DEB/EQ/UFRJ

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo meu bem mais precioso, a vida. É dele que vem a minha força, a minha fé, a minha felicidade.

Agradeço à minha família, meu alicerce e meu norte. Meus pais Nilton e Noelia, que assim como eu, tiveram que conviver com a dor da saudade, sempre acreditando em mim e torcendo pelo meu sucesso. Minhas amadas irmãs Samia e Ana Letícia, obrigada por tudo!

À minha família do Rio, importantíssima para a minha adaptação. Sempre transbordando carinho e atenção, especialmente meus tios Nilo e Neuma, que se tornaram meus segundos pais. Obrigada primos e tios por tanto amor!

Ao meu esposo, Sergio Bruno, por ser um companheiro maravilhoso e atencioso. Obrigada por toda a ajuda e paciência nos momentos difíceis, que não foram poucos! Você faz de mim uma pessoa melhor a cada dia, e é a minha maior fonte de inspiração! Te amo infinitamente!

Aos meus amigos de Fortaleza, que fazem de cada retorno uma festa! Aos meus amigos do Rio de Janeiro pelas resenhas maravilhosas! Obrigada a todos pela amizade desinteressada!

Aos amigos para toda a vida que eu conquistei na Universidade Federal do Ceará, e aos meus grandes amigos do PET-Biologia-UFC! Vocês são muito especiais!

Ao Pesquisador Gustavo Saavedra Pinto, e a todos com quem convivi no Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, em especial Genilton, Mariza e Carol. Todos vocês fazem parte da minha caminhada pela vida acadêmica!

Aos amigos do BIOSE, que fazem de um dia de trabalho um dia de descontração, conversas e risadas. É muito bom poder contar com todos vocês, em especial àquelas que tornam tudo mais leve: Rose, Nanda, Etel e Arie.

À ilustre Professora Maria Helena, que abrilhanta o dia com seu bom humor e conhecimento.

À Professora Veronica Calado, por ter sido solícita e me ajudado no tratamento dos resultados.

Agradeço também à Marcelle, co-orientadora e acima de tudo uma pessoa admirável. Muito empenhada em tudo que faz, para mim foi sempre um estímulo! Muito obrigada!

Às pessoas maravilhosas que conheci em Braga durante meu estágio em Portugal. À Professora Isabel Belo pela orientação e receptividade, foi maravilhoso o período em que pude trabalhar no laboratório de Bioprocessos e Biossistemas! Aos amigos da Universidade do Minho que estarão sempre nas minhas melhores lembranças: Marlene, Patrícia e Felisbela. À Daniela Bernardino (Dani) e ao Professor Eugénio Ferreira por toda a orientação e ajuda no desenvolvimento do meu trabalho. Ao Professor Luís Amaral, que foi imprescindível no desenvolvimento do software para o processamento e análise de imagens.

À minha orientadora Maria Alice, que me recebeu com muito carinho e me integrou ao laboratório. Agradeço pelo incentivo e pelos puxões de orelha, sei que sempre tem a boa intenção de me tornar uma profissional melhor. Sou muito grata pela sua paciência e a sua ajuda, principalmente nos momentos complicados. A senhora foi muito importante para mim nesses últimos anos e para sempre serei grata! Muito obrigada!

À CAPES e ao PDSE pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

"É proibido chorar sem aprender,
Levantar-se um dia sem saber o que fazer
Ter medo de suas lembranças.
É proibido não rir dos problemas
Não lutar pelo que se quer,
Abandonar tudo por medo,
Não transformar sonhos em realidade.
É proibido não buscar a felicidade,
Não viver sua vida com uma atitude positiva,
Não pensar que podemos ser melhores,
Não sentir que sem você este mundo não seria igual".
(Pablo Neruda).

RESUMO

Peclat, Verônica R. O. L. Variação Morfológica de *Yarrowia lipolytica* em Fermentação no Estado Sólido por Técnicas de Análise Digital de Imagens. Rio de Janeiro, 2015. Resumo da tese apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D. Sc.).

A crescente preocupação com a conservação ambiental tem estimulado diversas pesquisas na busca de processos mais sustentáveis, tanto do ponto de vista econômico como ambiental. Neste cenário, a fermentação em estado sólido (FES) emerge como uma potencial tecnologia para a obtenção de produtos microbianos de alto valor agregado. As lipases são exemplos de metabólitos que podem ser obtidos utilizando substratos de baixo custo através da FES, sendo os micro-organismos lipolíticos, como a Yarrowia lipolytica, os principais biocatalisadores utilizados nesse tipo de processo. Apesar de vantagens como maior produtividade e contaminação baixa, a aplicação da FES em processos industriais ainda é bastante precária devido à dificuldade de monitoração e controle das variáveis envolvidas no processo. A medição da biomassa é um exemplo de parâmetro crítico, com medições diretas inexistentes por conta da íntima ligação entre o micro-organismo e a matriz sólida, o que dificulta a estimativa e o controle do crescimento celular. Desta maneira, o Processamento Digital de Imagens (PDI), que consiste na manipulação de imagens por meios computacionais com o propósito de extrair informações úteis sobre os objetos contidos na mesma, surge como uma potencial ferramenta para a obtenção de informações confiáveis sobre a biomassa, possibilitando uma adequada monitoração e um controle de processo mais eficiente. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a morfologia da levedura dimórfica Yarrowia lipolytica em fermentação no estado sólido por meio de ferramentas de Análise Digital de Imagens. O potencial para a produção de lipases em FES também foi avaliado utilizando diferentes matérias-primas de indústrias produtoras de óleos vegetais (macaúba, oliva). A metodologia desenvolvida para a aquisição de amostras de FES, assim como a metodologia desenvolvida para o PDI, além de terem possibilitado a integração entre as etapas de extração enzimática e aquisição de imagens, propiciaram também a aquisição de imagens mais limpas e objetos mais destacados. A análise conjunta dos parâmetros Área, Comprimento, Largura, Compacidade e Diâmetro Equivalente (D_{eq}) foi adequada para caracterizar o comportamento dimórfico da levedura quando empregada em FES, enquanto que os parâmetros Excentricidade e Robustez confirmaram a presença de células com bordas irregulares, característica de células filamentosas, corroborando o potencial do PDI como ferramenta para a monitoração da morfologia microbiana em FES. Paralelamente, a aplicação da Yarrowia lipolytica IMURJ 50682 em FES utilizando diferentes matérias-primas demonstrou a relevância desta levedura para a produção de lipases, mesmo quando em condições nutricionais limitadas. A produtividade de 7,8 U/g*h obtida em FES com o resíduo da indústria de azeite TPOMW (Two Phase Olive Mill Waste) e farelo de trigo destacou-se como uma produtividade elevada quando comparada às verificadas na literatura. A produtividade em FES de torta de macaúba, mesmo tendo sido menor do que a verificada com TPOMW e farelo de trigo, foi igualmente superior às produtividades reportadas na literatura (4.9 U/g*h).

ABSTRACT

Peclat, Verônica R. O. L. Morphological Variation of *Yarrowia lipolytica* in Solid State Fermentation by Digital Image Analysis Techniques. Rio de Janeiro, 2015. Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.).

The growing concern over the environmental conservation has stimulated several studies on the sustainable process development, both economically and environmentally. In this scenario, the solid state fermentation (SSF) emerges as a potential technology for the production of microbial products with high added value. The lipases are examples of metabolites that may be obtained using low cost substrates in SSF, and lipolytic organisms, such as Yarrowia lipolytica, are the main biocatalysts used in such processes. Despite advantages such as higher productivity and low contamination, the application of SSF in industrial processes is still negligible due to the difficulty in monitoring and controlling the variables involved. The biomass measurement is an example of critical parameter with no direct measurements because of the intimate connection between the micro-organism and the solid matrix, making it difficult the estimation and control of cell growth. Thus, the Digital Image Processing (PDI), which is the image manipulation by algorithms in order to extract useful information about the objects contained in it, appears as a potential tool to obtain reliable information on biomass, allowing adequate monitoring and a more efficient process control. Given the above, this study aimed to evaluate the morphology of the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica in solid state fermentation by Digital Image Analysis. The potential for lipase production was also evaluated in SSF using different raw materials from vegetable oil industries (macaúba, olive). The developed methodology for the acquisition of SSF samples, as well the PDI methodology, have made possible the integration between enzyme extraction and image acquisition steps, and also enabled the purchase of cleaner and more detached objects in the images. The analysis of the parameters area, length, width, compactness and diameter Equivalent (Deq) was adequate to characterize the dimorphic behavior of the yeast when used in SSF, while the eccentricity and Robustness parameters confirmed the presence of cells with irregular edges, characteristic of filamentous cells, confirming the potential of the PDI as a tool for microbial morphology monitoring in SSF. In addition, the application of Yarrowia lipolytica IMURJ 50682 in SSF using different raw materials demonstrated the relevance of this yeast for the lipases production, even when nutrient limited conditions. The productivity of 7,8 U/g*h obtained in SSF with the residue from the olive oil industry TPOMW (Two Phase Olive Mill Waste) and wheat bran stood out as a high productivity compared to those observed in the literature. Productivity in SSF with macaúba waste was lower than that seen with TPOMW and wheat bran, however, it was also higher than the yields reported in the literature (4.9 U/g*h).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1.	Modelo RGB4
Figura 3.2.	Componentes RGB : Imagem colorida (a); componente R (b); componente G (c); componente G (d)
Figura 3.3.	Imagem monocromática e suas coordenadas espaciais (x, y)
Figura 3.4.	Principais etapas no processamento de imagens
Figura 3.5.	Imagem binarizada. <i>Pixels</i> com diferentes níveis de cinza são substituídos por 0 (preto) ou 1 (branco)
Figura 4.1.	Biorreator de bancada utilizado para o desenvolvimento da FS33
Figura 4.2.	Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> (570 nm em espectrofotômetro <i>Bel Photonic SP2000-UV</i>)34
Figura 4.3.	Curva de correlação entre absorbância e número de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> (570 nm em espectrofotômetro <i>Bel Photonic SP2000-UV</i>)37
Figura 5.1.	Crescimento da <i>Y. lipolytica</i> em FES de torta de macaúba. Imagem obtida através de câmera digital comum
Figura 5.2.	Crescimento da <i>Y. lipolytica</i> em FES de torta de macaúba. Imagem obtida por meio de lupa estereoscópica (aumento de 8x)
Figura 5.3.	Células de <i>Y. lipolytica</i> envoltas por micelas de óleo após 3 horas de fermentação (aumento de 1000x)
Figura 5.4.	Processamento de imagem da FES com a etapa de pré-processamento. Em A: imagem original; B: objetos com realce manual das bordas; C: imagem binarizada
Figura 5.5.	Processamento de imagem da FES sem a etapa de pré-processamento. Em A: imagem original; B: imagem binarizada
Figura 5.6.	Imagem ilustrativa das células presentes nos pré-inóculos (72 horas de cultivo em meio YPD) (aumento de 1000x)
Figura 5.7.	Histogramas da distribuição das circularidades médias dos pré inóculos da fermentação em estado sólido de torta de macaúba e da fermentação submersa

	(FS). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição das circularidades médias
Figura 5.8.	Histogramas da distribuição dos diâmetros médios dos pré inóculos da fermentação em estado sólido de torta de macaúba e da fermentação submersa (FS). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição dos diâmetros médios
Figura 5.9.	Distribuição das circularidades médias nos diferentes tempos de fermentação (submersa e em estado sólido)
Figura 5.10.	Distribuição dos diâmetros médios nos diferentes tempos
Figura 5.11.	Histogramas da distribuição das circularidades médias em diferentes tempos da fermentação submersa (FS). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição das circularidades médias
Figura 5.12.	Células de <i>Y. lipolytica</i> em 6 horas de fermentação submersa (aumento de 1000x)
Figura 5.13.	Histogramas da distribuição das circularidades médias em diferentes tempos da Fermentação em estado sólido (FES). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição das circularidades médias 57
Figura 5.14.	Células de <i>Y. lipolytica</i> após 6 horas de fermentação em estado sólido (aumento de 1000x)
Figura 5.15.	Células de <i>Y. lipolytica</i> após 24 horas de fermentação em estado sólido (aumento de 1000x)
Figura 5.16.	Resultado da centrifugação da amostra de FES
Figura 5.17.	Amostra de FES após o processo de extração enzimática
Figura 5.18.	Separação das amostras: A - Extrato enzimático; B - Suspensão de células 61
Figura 5.19.	Amostras de células de Y. lipolytica coradas por safranina (Aumento de 40x).63
Figura 5.20.	Amostras de células de <i>Y. lipolytica</i> após 24 horas de fermentação coradas por alaranjado de acridina (Aumento de 40x)
Figura 5.21.	Amostras de células de <i>Y. lipolytica</i> após 96 horas de fermentação coradas por alaranjado de acridina (Aumento de 40x)

Figura 5.22.	Amostras de células de <i>Y.lipolytica</i> após 96 h de FES coradas por FUN-1 (Aumento de 40x)
Figura 5.23.	
rigura 3.23.	Interface do programa na opção Parâmetros
Figura 5.24.	Interface do programa na opção Tratamento
Figura 5.25.	Esquematização das principais etapas do processamento de imagens (*Opcional)
Figura 5.26.	Imagens resultantes do procedimento de processamento de imagens: a) Amostra de células de <i>Yarrowia lipolytica</i> ; b) Reconhecimento automático dos objetos contidos na imagem; c) Conversão da imagem colorida para a escala de cinza; d) Imagem binarizada
Figura 5.27.	Representação do processo automático de binarização, nas imagens células de <i>Y. lipolytica</i> após 72 de FES
Figura 5.28.	Avaliação das triplicatas utilizando a variação do parâmetro Comprimento (μm) nos tempos (horas) 24, 48 e 72
Figura 5.29.	Imagem das células de <i>Y. lipolytica</i> em FES de torta de macaúba no ponto de 48 horas. À direita: Imagem original; À esquerda: Imagem binarizada73
Figura 5.30.	Histogramas de distribuição dos comprimentos nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: comprimento em μm; Eixo vertical: número de observações (objetos).
Figura 5.31.	Avaliação das triplicatas utilizando a variação do parâmetro Largura (µm) nos tempos (horas) 24, 48 e 72
Figura 5.32.	Imagens de células de <i>Y. lipolytica</i> em FES de torta de macaúba no tempo de 72 horas
Figura 5.33.	Histogramas de distribuição das larguras nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: larguras em µm; Eixo vertical: número de observações (objetos)77
Figura 5.34.	Histogramas de distribuição das circularidades nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: circularidades; Eixo vertical: número de observações (objetos).

Figura 5.35.	Histogramas de distribuição dos Deq nos diferentes tempos da FES. Eixo
	horizontal: diâmetro equivalente (µm); Eixo vertical: número de observações (objetos)
Figura 5.36.	Imagem de células de <i>Y. lipolytica</i> em FES de torta de macaúba no tempo de 48 horas
Figura 5.37.	Histogramas de distribuição das excentricidades nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: excentricidade; Eixo vertical: número de observações (objetos)
Figura 5.38.	Histogramas de distribuição da robustez nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: robustez; Eixo vertical: número de observações (objetos)81
Figura 5.39.	Histogramas de distribuição da compacidade nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: compacidade; Eixo vertical: número de observações (objetos)
Figura 5.40.	Atividade de lipase nas três diferentes proporções entre os resíduos (TPOMW:Farelo de trigo)
Figura 5.41.	Influência da fonte de nitrogênio na produção de lipases
Figura 5.42.	Produtividade nos diferentes tempos de processo fermentativo nos meios suplementados com ureia e sulfato de amônio
Figura 5.43.	Atividade versus pH. A: Suplementação com ureia; B: Suplementação com sulfato de amônio
Figura 5.44.	Atividades de lipase em FES de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia
Figura 5.45.	Dados da quantificação de biomassa em FES de torta da polpa de macaúba (FARIAS, 2014) e atividades de lipase com as diferentes suplementações de nitrogênio
Figura 5.46.	Produtividade nos diferentes tempos de FES de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia
Figura 5.47.	Atividades de lipase em FES versus pH do novo lote de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia

Figura 5.48.	Produtividade nos diferentes tempos de FES do novo lote de torta de polpa d	le
	macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia	. 99
Figura 5.49.	Comparação entre o comprimento desenvolvido pela levedura em FES d	le
	torta de polpa de macaúba e a produção de lipases	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1.	Algumas lipases microbianas disponíveis comercialmente e suas aplicações
	industriais. Fonte: Singh & Mukhopadhyay (2012)22
Tabela 3.2.	Dados da literatura sobre produção de diferentes metabólitos em fermentação
	no estado sólido a partir de diferentes matérias-primas
Tabela 4.1.	Principais reagentes utilizados em meios de cultura e ensaios analíticos30
Tabela 4.2.	Principais equipamentos utilizados
Tabela 4.3.	Análises físico-químicas da torta residual da polpa de macaúba realizada pelo
	laboratório de controle bromatológico- LABCBROM/UFRJ35
Tabela 5.1.	Classes de circularidades/diâmetros médios com seus respectivos valores51
Tabela 5.2.	Principais características dos resíduos TPOMW e farelo de trigo (Fontes:
	Jang et al., 2000; Palmarola-Adrados et al., 2005; Seguin et al., 2012; Salgado
	et al., 2013a-b)
Tabela 5.3.	Comparação entre o pico de atividade lipolítica e produtividade de diferentes
	micro-organismos produtores de lipase89
Tabela 5.4.	Avaliação de diferentes extrações para recuperação de lipases96
Tabela 5.5.	Análises físico-químicas das tortas residuais da polpa de macaúba realizada
	pelo laboratório de controle bromatológico- LABCBROM/UFRJ100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIVS - Cylindrical Intravacuolar Structures

C/N – Relação carbono e nitrogênio

FES - Fermentação em Estado Sólido

FS – Fermentação Submersa

GRAS – Generally Regarded As Safe

Lip2 – Principal lipase extracelular da levedura Yarrowia lipolytica

LIP2 – Gene que codifica para a produção da lipase Lip2

PDI – Processamento Digital de Imagens

p-NFL – p-nitrofenil laurato

RGB - Red, Green, Blue

TAGs - Triacilgliceróis

TIFF – Tagged Image File Format

TPOMW – Two Phase Olive Mill Waste

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1.	ANÁLISE E PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS	4
3.1.1.	Aspectos gerais	4
3.1.2.	Aplicações biotecnológicas	10
3.2.	IMPORTÂNCIA DOS BIOCATALISADORES NOS BIOPROCESSOS	14
3.3.	Yarrowia lipolytica	17
3.3.1.	Dimorfismo em Yarrowia lipolytica	18
3.4.	LIPASES	20
3.4.1.	Lipases de Yarrowia lipolytica	23
3.5.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1.	MATERIAIS	30
4.1.1.	Reagentes	30
4.1.2.	Equipamentos	31
4.2.	MICRO-ORGANISMO	32
4.2.1.	Preservação do micro-organismo	32
4.2.2.	Cultivo do pré-inóculo	32
4.3.	ESTERILIZAÇÃO	32
4.4.	FERMENTAÇÃO SUBMERSA	32
4.4.1.	Meio de produção	33
4.4.2.	Inoculação do meio de produção	33
113	Riorregtor	33

4.4.4.	Amostragem	34
4.4.5.	Quantificação do crescimento celular	34
4.5.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	35
4.5.1.	Matérias primas	35
4.5.1.1.	Torta de macaúba	35
4.5.1.1.1.	Separação granulométrica	35
4.5.1.1.2.	Medição da umidade	36
4.5.1.2.	Two-phase olive mill waste (TPOMW)	36
4.5.1.3.	Farelo de trigo	36
4.5.2.	Preparo do meio de produção	36
4.5.3.	Inoculação do meio de produção	37
4.5.4.	Processo de extração da enzimática	38
4.5.5.	Medição de pH	38
4.5.6.	Amostragem	38
4.6.	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE	38
4.7.	ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS:	39
4.7.1.	Preparo das amostras obtidas a partir da fermentação submersa	40
4.7.2.	Preparo das amostras obtidas a partir da fermentação em estádo sólido	40
4.7.2.1.	Estudos preliminares	40
4.7.2.2.	Estudos avançados	40
4.7.2.2.1.	Utilização de corantes	40
4.7.2.2.2.	Utilização de detergente	41
4.7.3.	Aquisição das imagens	41
4.7.3.1	Imagens em lupa estereoscópica	41
4.7.3.2	Imagens em microscópio óptico	42
4.7.4.	Processamento das imagens obtidas em microscópio óptico	42

4.7.4.1.	Estudos preliminares	. 42
4.7.4.2.	Estudos avançados	.43
4.7.5.	Análise das imagens	.43
4.7.6.	Tratamento estatístico dos resultados	. 45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	.46
5.1.	RESULTADOS PRELIMINARES	.46
5.1.1.	Avaliação macroscópica da FES	.46
5.1.2.	Avaliação microscópica da FES	. 48
5.1.2.1.	Aquisição e processamento de imagens de FES	. 48
5.1.3.	Acompanhamento da morfologia de Y. lipolytica em diferentes sistemas de	
	produção através do processamento e análise de imagens	. 49
5.1.3.1.	Avaliação do pré-inóculo quanto à morfologia da levedura Y. lipolytica	. 49
5.1.3.2.	Avaliação dos processos fermentativos quanto à morfologia da levedura Y.	•
	lipolytica	. 53
5.2.	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA MONITORAÇÃO DE FES POR PDI	
5.2.1.	Aquisição de amostras de FES	
5.2.2.	Preparação das amostras para visualização em microscópio	
5.2.2.1.	Utilização de corantes	
5.2.3.	Desenvolvimento da nova rotina para o processamento de imagens de FES	
5.2.3.1.	Interface do programa LEV_HIFAS	
5.2.3.2.	Processamento de imagens com o programa LEV_HIFAS	. 68
5.3.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	.71
5.3.1.	Preparo das amostras	.71
5.3.2.	Aquisição e processamento de imagens de FES	.71
5.3.3.	Análise de imagens de FES	. 72

1.	REFERÊNCIAS 1	
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	05
6.	CONCLUSÕES	.03
5.4.2.3.	Produção de lipases em FES a partir da torta da polpa de macaúba	97
5.4.2.2.	Avaliação do melhor processo de extração	95
5.4.2.1.	Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases em meio contendo torta de macaúba	
5.4.2.	Valorização de torta de macaúba através da produção de lipases por Y. lipolytica	
5.4.1.2.	Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases	87
5.4.1.1.	Composição do meio de FES	84
5.4.1.	Valorização de TPOMW através da produção de lipases por Y. lipolytica	84
5.4.	SUBSTRATOSSUBSTRATOS	

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a conservação ambiental tem estimulado diversas pesquisas na busca de processos mais sustentáveis, tanto do ponto de vista econômico como ambiental. Neste cenário, a fermentação em estado sólido (FES) emerge como uma potencial tecnologia para a obtenção de produtos microbianos de alto valor agregado a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais, desempenhando um papel importante no desenvolvimento sustentável de toda a indústria química e biológica (PANDEY, 2003).

As lipases são exemplos de metabólitos que podem ser obtidos utilizando substratos de baixo custo através da FES. Essas enzimas podem ser obtidas a partir de animais, plantas e micro-organismos. Entretanto, são as lipases microbianas que possuem grande potencial para aplicações comerciais, devido à sua estabilidade e seletividade. Micro-organismos ditos lipolíticos, como a *Yarrowia lipolytica*, são os principais biocatalisadores utilizados nesse tipo de processo, possibilitando taxas mais elevadas de conversão e a obtenção de enzimas altamente específicas que podem ser aplicadas nas mais variadas indústrias (SINGH et al., 2012).

Apesar de vantagens como maior produtividade e menor demanda energética, a fermentação em estado sólido possui problemas que ainda precisam ser superados no que concerne o monitoramento de parâmetros. Nesse tipo de fermentação, o monitoramento da biomassa, por exemplo, é precário devido à íntima ligação entre o micro-organismo e a matriz sólida, que dificulta processos de separação e impossibilita à estimativa e o controle do crescimento celular em biorreatores de FES de maneira direta (DUBEY et al., 1998).

O controle do processo fermentativo é de extrema importância para sua otimização, e para atender às necessidades específicas de produção uma maior compreensão sobre o biocatalisador se faz necessária (CHEN, 2013). A aplicação de metodologias de estimativa de biomassa que permitam estabelecer uma relação entre a cinética de crescimento, a morfologia microbiana e o metabólito de interesse podem ser de grande auxílio no projeto e na operação de um processo. Contudo, melhorias baseadas nas informações morfológicas são difíceis de serem implementadas, uma vez que, do ponto de vista industrial, essas medições devem ser imparciais, objetivas e rápidas. (PINTO et al., 2004).

Neste sentido, o Processamento Digital de Imagens (PDI) surge como uma potencial ferramenta para a obtenção de informações confiáveis sobre a biomassa, possibilitando uma adequada monitoração e um controle de processo mais eficiente, especialmente na FES. O monitoramento da atividade microbiana é normalmente baseado em análises detalhadas das comunidades em termos de número de micro-organismos individuais, tamanho, volume e morfologia (OSMA et al., 2011), dados esses que podem ser obtidos através do PDI.

O Processamento Digital de Imagens é um processo de manipulação de imagens por meios computacionais com o propósito de extrair informações úteis sobre os objetos contidos na mesma. Constitui-se em uma área multidisciplinar envolvendo elementos de óptica, eletrônica, matemática e engenharia computacional (COX; PAUL; THOMAS, 1998). A análise digital de imagens combinada às técnicas estatísticas de análise multivariável tem sido implementada para efetuar o reconhecimento e a identificação de diferentes micro-organismos através de caracterização morfológica (PÉREZ, 2006).

O termo análise de imagens engloba não somente a análise da imagem propriamente dita, como também os processos prévios de captura e tratamento da imagem, que são de primordial importância. A análise de imagem possibilita o melhoramento das imagens, bem como a identificação e o isolamento automático de um objeto particular para o estudo do mesmo, sendo uma técnica que permite a obtenção de informação morfológica (RUSS, 1995). A utilização da técnica de análise digital de imagens tornou-se uma ferramenta inestimável para este tipo de tarefa, uma vez que reduz a subjetividade da contagem e permite automação da análise (MCINTYRE et al., 1998).

A aplicação do PDI como ferramenta no monitoramento de processos fermentativos é ainda muito discreta. Grande parte dos estudos existentes envolve a aplicação de fungos filamentosos (COURI et al., 2006; DUTRA et al., 2008; BARRY; WILLIAMS, 2011; PAPAGIANNI, 2014), sendo ainda poucos os trabalhos que, assim como presente estudo, buscam extrair dados morfológicos quantitativos a partir das suas imagens.

Com essa perspectiva o presente estudo visa à aplicação de técnicas de processamento e análise de imagens digitais em fermentação em estado sólido, buscando avaliar e quantificar as modificações morfológicas ocorridas na levedura *Y. lipolytica* quando empregada para a produção de lipases.

Capítulo 2 – Objetivos PECLAT, V. R. O. L.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O acompanhamento da biomassa microbiana durante a condução de um bioprocesso, seja por meio de medições diretas da concentração celular ou avaliação qualitativa da morfologia, é etapa essencial para o êxito do mesmo. Apesar disso muitos processos, inclusive industriais, são ainda conduzidos cegamente no que diz respeito à fisiologia e morfologia do biocatalisador. No caso da fermentação em estado sólido (FES) essa condição é agravada pela íntima ligação entre o micro-organismo e a matéria prima, que impossibilita a monitoração da biomassa microbiana por métodos diretos.

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma metodologia eficiente para o acompanhamento do micro-organismo, quando empregado em FES, por meio do processamento e análise de imagens digitais. Para alcançar o objetivo geral do projeto, este foi segmentado nas seguintes etapas:

- 1. Avaliação das diferentes morfologias desenvolvidas pela estirpe *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 quando empregada em duas formas de condução do processo, fermentação em estado sólido e fermentação submersa, utilizando um programa previamente desenvolvido para o processamento e análise de imagens digitais;
- 2. Desenvolvimento de metodologia para a separação da biomassa microbiana do meio de fermentação em estado sólido;
- 3. Desenvolvimento de metodologia para a preparação de amostras e aquisição de imagens em fermentação em estado sólido;
- 4. Desenvolvimento e aplicação de ferramentas de processamento e análise digital de imagens para a extração e quantificação de dados morfológicos da estirpe de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682;
- 5. Validação das metodologias desenvolvidas acompanhando o desenvolvimento morfológico da estirpe de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 por meio do processamento e análise de imagens durante fermentações em estado sólido, tendo como matéria prima a torta de macaúba para a produção de lipases.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ANÁLISE E PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS

3.1.1. Aspectos gerais

O advento de dispositivos de captura de imagens e computadores aliados à microscopia permitiu o rápido desenvolvimento da análise quantitativa de imagens nos mais diversos campos da ciência (PONS et al., 1998). Como uma ferramenta poderosa, o Processamento Digital de Imagem (PDI) permite o processamento de imagens digitais por algoritmos matemáticos através de programas computacionais, de modo a extrair informações antes negligenciadas. A transformação da imagem original é capaz de melhorar um detalhe desejado, contrastando o objeto de estudo do restante da imagem e de outros objetos que também estejam na imagem (COX; PAUL; THOMAS, 1998).

A imagem digital pode ser representada por uma matriz *M* por *N*, cujas linhas e colunas identificam um ponto (pixel) na imagem. As imagens coloridas, em linhas gerais, são uma representação tridimensional na qual cada cor é representada por um ponto no sistema de coordenadas 3-D. O modelo mais utilizado para representação por câmeras e monitores de vídeo é o *RGB* (*Red*, *Green*, *Blue*) (Figura 3.1), que pode ser visto como um cubo onde três de seus vértices são as cores primárias, outros três as cores secundárias, o vértice junto à origem é o preto e o mais afastado da origem corresponde à cor branca. Neste modelo, a escala de cinza se estende através da diagonal do cubo, que sai da origem (preto) até o vértice mais distante dela (branco) (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

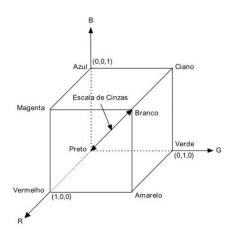


Figura 3.1. Modelo RGB (Fonte: MARQUES et al., 1999).

Imagens RGB são compostas por três matrizes separadas, cada qual contendo os valores dos componentes R, G e B (normalizados em uma faixa de 0 a 1) de cada pixel. A figura a seguir (Figura 3.2) exemplifica como uma imagem colorida pode ser decomposta nos seus componentes R, G e B:

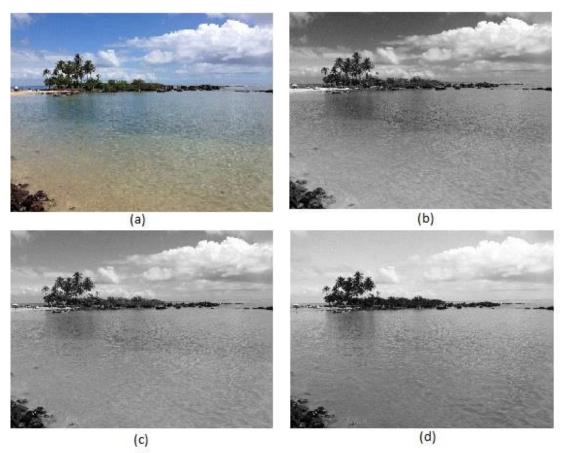


Figura 3.2. Componentes RGB: Imagem colorida (a); componente R (b); componente G (c); componente E (d).

Entretanto, as técnicas de processamento de imagens trabalham fundamentalmente com imagens monocromáticas, bidimensionais e estáticas, sendo então necessária a conversão das imagens coloridas para a escala de cinza (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999). A conversão de imagens coloridas em imagens monocromáticas se dá através da aplicação de funções matemáticas que eliminam as informações de cor e saturação da imagem, mantendo apenas as informações de luminância. Desta maneira a imagem deixa de possuir 3 componentes e passa a possuir apenas um.

Uma imagem monocromática pode ser definida como uma função bidimensional f(x, y), em que x e y são as coordenadas espaciais e, em qualquer par de coordenadas (x, y), a amplitude de f representa a intensidade ou nível cinza da imagem nesse ponto (Figura 3.3) (GONZALEZ; WOODS; EDDINS, 2008). Em outras palavras, a função f(x, y) representa o produto da interação entre a luminância e a refletância/transmitância em um determinado ponto da imagem. Para se obter uma imagem monocromática de qualidade são necessários 512 x 512 pixels e 128 níveis de cinza. Apesar disto, a maioria dos sistemas de visão artificial utiliza imagens com 256 níveis de cinza (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).



Figura 3.3. Imagem monocromática e suas coordenadas espaciais (x, y).

A análise e o processamento de imagens digitais são técnicas da microscopia ótica com grande aplicabilidade em estudos que envolvem micro-organismos, pois possibilitam uma classificação e quantificação de maneira não-subjetiva e automatizada. O termo análise de imagens engloba não somente a análise da imagem propriamente dita, mas também os processos prévios de captura e tratamento da imagem, que são de primordial importância. No caso do processamento de imagens, o mesmo pode ser subdividido em cinco etapas: visualização, melhoria, segmentação, morfologia matemática e medições, que estão esquematizadas na Figura 3.4.

A primeira etapa é a aquisição da imagem, considerada crucial para o sucesso do processamento posterior das imagens. Nesse primeiro momento do processamento, o sensor

converte a informação óptica em sinal elétrico, e o digitalizador transforma a imagem analógica em digital. O sucesso dessa etapa depende de aspectos como a qualidade do sensor, iluminação, digitalização, dentre outros.

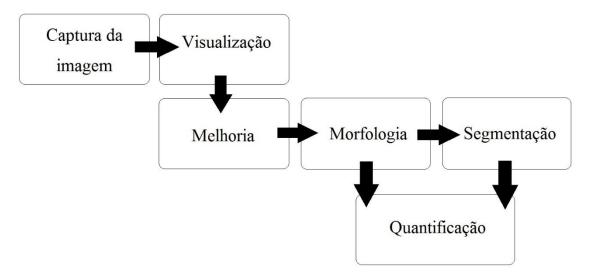


Figura 3.4. Principais etapas no processamento de imagens.

Câmeras de vídeo, analógicas ou digitais, são os elementos de aquisição de imagens mais comuns, podendo ser acopladas a microscópios estéreo, óptico ou eletrônico. Após aquisição, as imagens são armazenadas em formatos de arquivos de compressão, que podem reduzir o grau de qualidade da mesma dependendo dos requerimentos para armazenamento. Entretanto, para propósito de processamento posterior é necessário que as imagens estejam armazenadas com a melhor qualidade possível, sendo o formato de arquivo *TIFF* (*Tagged Image File Format*) o mais comum (GONZÁLEZ; WOOD, 1992).

A etapa seguinte trata do processamento das imagens armazenadas, e pode ser dividida em dois estágios: pré-processamento e segmentação. No pré-processamento, também conhecido como condicionamento ou melhoria da imagem, a qualidade da imagem é aprimorada para as etapas subsequentes. Nesta etapa são aplicadas operações de eliminação de ruídos, normalização de *background* e emprego de filtros que trabalham diretamente com os valores de intensidade dos *pixels* (ROERDINK, 1998). Ruídos podem ser causados pelos diferentes dispositivos de aquisição, e aparecem como variações discretas de *pixels* isolados. Em geral, esses *pixels* são diferentes dos *pixels* vizinhos, sendo esta a base de algoritmos de eliminação e atenuação de ruídos.

A modelagem morfológica se caracteriza pela manipulação de elementos estruturais de diversas formas e tamanhos sobre uma imagem plana. As relações entre a imagem e os elementos estruturais transladados são estudadas baseando-se na utilização de filtros lineares na vizinhança do objeto. As operações morfológicas são não-lineares e usualmente são sequenciais, sendo a sequência de operações escolhida de forma a obter medidas quantitativas da imagem (ROERDINK, 1998).

O objetivo das técnicas de segmentação de imagens é classificar os *pixels* de uma figura de forma significativa, permitindo a identificação de regiões semanticamente distintas. A forma mais simples de segmentação, que é frequentemente encontrada em imagens microscópicas, identifica *pixels* como sendo parte de um objeto (*foreground*) ou como o fundo da imagem (*background*). Formas mais complicadas assinalam *pixels* de diferentes classes, como é o caso de categorias de células, organelas diferentes e tipos de tecido. Portanto, a segmentação de imagens é um passo crucial no entendimento destas imagens. A qualidade e a interpretação das medidas de diferentes partes de uma imagem dependem de forma crítica da habilidade do método de segmentação em associar cada *pixel* a uma classe apropriada. Para medir, por exemplo, o volume de uma bactéria em uma imagem, devemos ser capazes de determinar quais *pixels* realmente pertencem àquele objeto (WILKINSON, 1998).

A segmentação mais simples se dá através da seleção do *threshold*, definido como o valor de nível de cinza que permite efetuar a divisão dos *pixels* que passarão a ter valores 0 (preto) e 1 (branco) a partir da binarização (Figura 3.5). Este processo conhecido como *Thresholding* é realizado *pixel* a *pixel* pela comparação do nível de cinza de cada ponto com o valor de *threshold* previamente estabelecido, podendo esse valor ser obtido de forma manual, automática e semiautomática. Os métodos de segmentação baseados em bordas requerem o uso prévio de filtros morfológicos para poderem distinguir entre os *pixels* que pertencem à borda dos que não pertencem (GONZÁLEZ; WOOD, 1992).

Na etapa de quantificação, ou interpretação dos dados, são realizadas as medições em função do tipo de imagem final obtida (binária ou em escala de cinza) bem como dos dados requeridos. Em imagens binárias são determinados parâmetros morfológicos euclidianos como Área, Diâmetro Equivalente, Perímetro, Comprimento, Largura, Excentricidade, Esfericidade, dentre outros (AMARAL, 2003).



Figura 3.5. Imagem binarizada. *Pixels* com diferentes níveis de cinza são substituídos por 0 (preto) ou 1 (branco).

O processamento de imagens tem sido amplamente difundido em pesquisas que envolvem micro-organismos com a finalidade de caracterizar, quantificar e obter propriedades geométricas de culturas com aplicações biotecnológicas (KUMAR; MITTAL, 2010). Os métodos tradicionais baseados em contagem manual, além de entediantes, possuem uma baixa taxa de análise das amostras, limitada por fadiga técnica. Os resultados obtidos através da contagem manual são geralmente qualitativos e também podem apresentar erro por conta da subjetividade do operador. Por estas razões, não é surpreendente que os métodos automatizados sejam muito utilizados para estudos com micro-organismos (SIERACKI; VILES, 1998).

Atualmente não existe uma solução universal para a segmentação de células ou faixas celulares a partir de um conjunto de imagens, o que torna o processo laborioso. Algoritmos que funcionam bem em um conjunto de imagens não funcionam necessariamente em outro conjunto, devido às diferenças na forma dos objetos, densidade, ruídos e da resolução. Nesses casos, o desenvolvimento de um *software* que seja capaz de fornecer um conjunto de ferramentas capazes de extrair dados de diferentes tipos de imagens dentro de um processo desejado é etapa essencial para a monitoração através de imagens (MEGASON; FRASER, 2007).

3.1.2. Aplicações biotecnológicas

Diversos pesquisadores têm reunido esforços para desenvolver rotinas que permitam a análise e o processamento de imagens, de forma rápida e automática, obtendo assim informações importantes para o sucesso dos seus processos. Em pesquisas que envolvem tecnologia microbiana é onde a análise e processamento de imagens encontram as suas principais aplicações, que incluem a detecção e enumeração de bactérias e leveduras, análise de texturas de colônias, caracterização morfológica de colônias e micélios de fungos, quantificação do crescimento de hifas (THOMAS; PAUL, 1996).

Em sistemas de lodo ativado, por exemplo, grandes concentrações de protozoários nos tanques de aeração podem ser indicação de um bom desempenho do mesmo. Buscando alternativas à contagem e identificação manual de espécies de protozoários e metazoários envolvidos na qualidade dos efluentes, Ginoris e colaboradores (2007) adequaram um procedimento de análise de imagens para o reconhecimento dessas espécies. Os pesquisadores demonstraram a eficiência do programa utilizado na análise das imagens, conseguindo uma taxa de 95% de acerto no reconhecimento global dos principais grupos de protozoários e metazoários.

Mesquita e colaboradores (2011), trabalhando igualmente com sistemas de lodo ativado, utilizaram a análise de imagens para obter avaliações mais acuradas do processo. Os autores foram capazes de quantificar e identificar a biomassa filamentosa, além de verificar a presença de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, viáveis e não viáveis. Segundo os pesquisadores, os parâmetros fornecidos pela análise de imagens não só elucidaram eventuais distúrbios do sistema de lodo ativado, como possibilitaram a medição de parâmetros operacionais importantes para a caracterização da biomassa.

Técnicas de análise de imagens também já foram aplicadas no monitoramento da biomassa granular presente em reatores anaeróbicos, utilizados no tratamento de águas residuais de indústrias. A eficiência destes biorreatores depende do crescimento e manutenção do lodo granular, que contém os grupos microbianos necessários à mineralização completa dos constituintes orgânicos dos efluentes. O monitoramento através da análise de imagens permitiu diagnosticar quantitativamente mudanças estruturais como a fragmentação/erosão e perda de filamentos dos grânulos (AMARAL et al., 2004; ABREU et al., 2007). O efeito da variação da carga orgânica nas propriedades morfológicas e fisiológicas dos grânulos

anaeróbios também foi objeto de estudo através da análise quantitativa de imagens. De maneira eficaz, essa ferramenta possibilitou o isolamento e visualização dos principais distúrbios causados pelas instabilidades no processo (COSTA et al., 2009).

O processamento de imagens abre possibilidades também para o desenvolvimento de técnicas não invasivas na quantificação de bactérias presentes em biofilmes. Biofilmes estão associados a diversos processos, benéficos e prejudicais, e a aplicação de técnicas que envolvem processamento e análise de imagens permitiu um maior conhecimento das populações celulares que os compõem, assim como suas respectivas concentrações (MA; BRYERS 2010).

O PDI torna possível não só a quantificação de células, mas também a obtenção da viabilidade celular das mesmas, que na maioria das vezes é determinada através da aplicação de corantes. Dependendo do micro-organismo estudado, existem componentes celulares que podem indicar o estado fisiológico do mesmo. Nas leveduras, por exemplo, a formação de vacúolos pode determinar o estado das mesmas sem necessidade de qualquer coloração, como demostraram Zalewski e Buchholzv (1996). Os pesquisadores acompanharam através de imagens mudanças morfológicas em uma estirpe da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e puderam identificar as diferentes fases do ciclo celular observando o comportamento das células. Segundo os autores, a diminuição da quantidade de células individuais com o aumento de grupos de quatro células era um forte indício de uma boa adaptação do microorganismo e do início da fase exponencial. Os vacúolos, por sua vez, foram importantes para determinar a jovialidade das células, que quando novas possuíam um vacúolo escuro não estruturado e quando mais velhas passavam a apresentar um vacúolo pálido.

De maneira semelhante, Suzuki e colaboradores (2006) desenvolveram um programa de análise de imagens capaz de reconhecer automaticamente a morfologia de uma célula de levedura com brotamento. O programa foi capaz de extrair quantitativamente dados morfológicos diretamente de imagens microscópicas da parede celular, de brotamentos e do núcleo das células de levedura e possibilitou ao grupo obter informações aproximadas sobre a progressão do ciclo celular de maneira eficiente.

Kawasse e colaboradores (2003) estudaram o efeito de condições de estresse celular (térmico e oxidativo) no dimorfismo de *Yarrowia lipolytica* em FS empregando técnicas de análise digital de imagens. Essa ferramenta permitiu a caracterização morfológica da levedura

e a quantificação do aumento no tamanho total da hifa (cerca de 25%), que foi observado nos sistemas sob estresse. De maneira semelhante, Coelho e colaboradores (2004) empregaram o processamento de imagens para classificação morfológica de células de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de estresse bárico. A análise de imagens confirmou de maneira eficiente a redução tanto do tamanho das gêmulas no decorrer do tempo, como também do tamanho médio total das células quando expostas a CO₂.

Nas últimas décadas muitos pesquisadores passaram a caracterizar principalmente micro-organismos filamentosos, desenvolvendo modelos matemáticos que pudessem compreender suas morfologias. Em casos como este, a análise de imagens pode exercer um papel importante na caracterização morfológica, automatizando e abrindo novos caminhos na investigação da engenharia e fisiologia das espécies microbianas. O crescimento de micélios fúngicos nas formas dispersa e em *pellet*, por exemplo, diferem muito quanto à morfologia, e embora o crescimento disperso seja o tipo preferido em fermentações industriais, o crescimento em forma de *pellets* tem sido foco de investigação através de técnicas de processamento e análise de imagens (PAUL; TOMAS, 1998). Essa forma de crescimento atrai a atenção especialmente pela produção de alguns metabólitos que não são produzidos por micélios dispersos. Esses aglomerados de micélio podem se comportar de maneira diferente dependendo do seu tamanho e localização nos biorreatores (KING, 1998).

A análise de imagens pode também ser muito útil na contagem de esporos. O método oferece muitas vantagens na determinação de viabilidade de esporos, pois é rápido e preciso, podendo discriminar esporos germinados e não germinados. A análise de imagens pode fornecer medições adequadas em preparações de esporos para a avaliação da qualidade de um pré-inóculo como parte da otimização dos processos fermentativos. Há relato na literatura demonstrando a influência da concentração inicial de esporos na morfologia apresentada pela cultura durante um processo fermentativo. Schutgerl e colaboradores (1998) perceberam que quando baixas concentrações de esporos eram utilizadas, grandes *pellets* se formavam durante a fermentação, e quando a concentração era alta, os respectivos tamanhos diminuíam.

Ronnest e colaboradores (2012), ao trabalharem com bactérias filamentosas, buscaram a melhor metodologia para acompanhar as mudanças na morfologia do micro-organismo durante o processo fermentativo. Os pesquisadores concluíram que a técnica de difração a laser era mais adequada do que a análise de imagens para o acompanhamento e

medição de aglomerados e *pellets*, alegando que a necessidade de aquisição de um grande número de imagens além do processamento das mesmas tornava o PDI muito demorado. No entanto, é importante ressaltar que o método da difração a laser só foi viável porque se tratava de um processo em submerso, onde a biomassa pode ser facilmente separada do meio, e porque a morfologia do micro-organismo foi considerada em todos os momentos próxima a uma esfera. Em qualquer cenário diferente, a metodologia já não poderia ter sido aplicada. A conclusão dos autores vai de encontro com diversas pesquisas que cada vez mais exaltam o PDI por fornecer ferramentas que já permitiram a quantificação rápida e precisa de parâmetros microscópicos, tais como o comprimento total de hifas, quantidade de extremidades e a unidade de crescimento de hifas (BARRY; WILLIAMS, 2011).

A análise de imagens proporcionou o estudo das diversas morfologias apresentadas pelo micro-organismo *Streptomyces hygroscopicus* em diferentes condições de cultivo. O diâmetro médio da morfologia tipo *pellet* foi monitorado em experimentações utilizando compostos tenso-ativos, esferas de vidro e diferentes concentrações de pré-inóculo (DOBSON et al., 2008). O procedimento de análise de imagens aplicado à quantificação e identificação da morfologia fúngica de duas estirpes industriais de *Penicillium chrysogenum* foi desenvolvido através de uma abordagem totalmente automatizada de microscopia aliada a uma rotina de avaliação desenvolvida na linguagem de programação computacional MATLAB. O método analítico desenvolvido permitiu a quantificação completa das mudanças morfológicas ocorridas durante o processo com medições rápidas, se tornando a chave para a compreensão da relação entre morfologia, fisiologia e parâmetros críticos do processo envolvido (POSCH et al., 2012).

A aplicação da análise de imagem na área de biotecnologia microbiana ganhou força na década de 90 e, desde então, tem permitido a extração de informações quantificadas e caracterizações detalhadas de diversas formas morfológicas. Em alguns campos, como em processos fermentativos, a análise de imagens já é indispensável para a caracterização do estado da cultura e estimação da biomassa produzida (THOMAS; PAUL, 1996; DUTRA et al., 2008).

3.2. IMPORTÂNCIA DOS BIOCATALISADORES NOS BIOPROCESSOS

Bioprocessos conduzidos por micro-organismos, tradicionalmente chamados de processos fermentativos, são de extrema importância para a obtenção de produtos de alto valor agregado utilizados nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia. Nas últimas décadas as indústrias de bioprodutos não só experimentaram grande aumento na sua produção, como também mudanças significativas visando à melhoria do seu desempenho. A necessidade de Bioprocessos "cost/effective" que atendam às crescentes exigências de confiabilidade e reprodutibilidade vem estimulando melhorias no monitoramento e no controle dos mesmos. Sem dúvida, esses progressos serão alcançados através de uma maior compreensão da fisiologia celular e da interação com o ambiente químico e físico dos processos. É esta combinação, o binômio célula (ou enzima) e condições reacionais que define o êxito de um Bioprocesso (PEREIRA Jr; BON; FERRARA, 2008).

Embora os diversos aspectos dos bioprocessos sejam objetos de estudo desde meados da década de 50, no que concerne a morfologia microbiana e a sua influência sobre os mesmos, pouco avanço foi realizado (PAPAGIANNI; MATTEY, 2006). Segundo Tibayrenc e colaboradores (2010), a maioria dos processos industriais é executada cegamente no que diz respeito à fisiologia e morfologia do micro-organismo empregado. Apesar de crucial, a estimativa qualitativa e quantitativa da biomassa é por muitas vezes determinada através de métodos indiretos que não oferecem informações sobre a população e viabilidade celular da mesma. Na fermentação alcoólica realizada por leveduras, por exemplo, as taxas de produção de CO_2 ou de etanol são utilizadas para avaliar o estado da cultura e servem como indicadores de biomassa e de atividade metabólica. Embora não sejam indicadores confiáveis, acabam sendo utilizados para inferir valores que podem não demonstrar a realidade das culturas.

A ligação entre produtividade e morfologia também ainda não está totalmente elucidada, sendo difícil deduzir relações gerais entre esses fatores. É possível que ambas dependam de alguns aspectos fundamentais da fisiologia do micro-organismo, como, por exemplo, a diferenciação celular (SEBASTINE et al., 1999; PAPAGIANNI, 2014). Já existem trabalhos demonstrando a importância da morfologia micelial dos fungos filamentosos para o processo fermentativo, não somente pela forma das hifas e da formação de agregados microscópicos, mas também pelo crescimento em forma de *pellets*. As morfologias extremas (agregados microscópicos e *pellets*) afetam a produtividade e

consequentemente a economia dos processos, podendo ainda existir uma vasta gama de morfologias entre essas duas (PAPAGIANNI; MATTEY, 2006).

Os fungos filamentosos são bastante utilizados industrialmente por produzirem enzimas no meio aonde se encontram, sem a necessidade de rompimento celular (HALTRICH et al., 1996). Desde a introdução de técnicas de análise digital de imagens grandes avanços no conhecimento da morfologia de fungos foram alcançados, tornando evidentes suas relações com parâmetros dos processos e as produtividades de fermentações industrialmente relevantes. A informação quantitativa sobre a diferenciação do micélio tem sido usada na construção de modelos estruturados e preditivos, cuja compreensão pode ser utilizada na otimização e na concepção dos processos (PAPAGIANNI, 2014). Sabe-se que a morfologia de organismos filamentosos está estreitamente relacionada com as propriedades reológicas do meio de cultivo, afetando a transferência de calor e massa que, por sua vez, afetam a produtividade do processo.

Já são muitos os estudos relacionando a produtividade em processos biotecnológicos com a morfologia (DRIOUCH et al., 2010; POSCH et al., 2012). Tepwong e colaboradores (2011) demonstraram como a produção da ergotionina pelo fungo *Lentinula edodes* está fortemente associada à morfologia do *pellet*. Os estudos morfológicos, beneficiados pela utilização da técnica de análise de imagens, indicaram uma correspondência entre o aumento no acúmulo do composto bioativo e o aumento no tamanho dos *pellets*. Os resultados obtidos por esse grupo foram úteis para a produção em larga escala da ergotionina através da manipulação das condições do processo fermentativo submerso com *L. edodes*.

Pons e colaboradores (1998) conseguiram identificar e quantificar todas as mudanças morfológicas ocorridas nas hifas do micro-organismo *Streptomyces ambofaciens* durante a produção do antibiótico espiramicina. Eles puderam identificar que durante a fase exponencial os filamentos atingiram comprimento máximo, passando a diminuir com a estabilização da concentração da biomassa, quando o antibiótico passou a ser rapidamente produzido. Foi possível identificar também regiões vazias nas hifas que passam a surgir no fim do crescimento exponencial, tendo sido fortemente investigadas por estarem relacionadas às mudanças de permeabilidade na membrana celular, que induzem a liberação dos materiais intracelulares.

A produção de avermectina pela espécie *Streptomyces avermitilis* demonstrou ser fortemente afetada pela morfologia do micro-organismo. Através da análise de imagens por um *software* desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Yin (2008), foi possível verificar a relação entre a morfologia filamentosa e a produção do metabólito secundário durante a fermentação submersa. Segundo os pesquisadores, durante o processo a formação de *pellets* de área pequena e alta densidade favoreceram uma alta produtividade, demonstrando que o tamanho e a forma das estruturas biológicas influenciam fortemente a atividade metabólica do micro-organismo. A produção do metabólito secundário geldanamicina por *S. hygroscopicus* foi também indicada como fortemente influenciada pela morfologia, experimentando um aumento expressivo de 88% em consequência da diminuição do diâmetro médio dos *pellets*. Desta maneira é correto afirmar que para se promover o aumento na produtividade é necessário monitorar e limitar o tamanho médio dos *pellets* durante o processo fermentativo (DOBSON et al., 2008).

As leveduras também têm sido objeto de pesquisa em processos fermentativos, principalmente as linhagens que apresentam dimorfismo. Esses micro-organismos costumam apresentar formas unicelulares; entretanto, as linhagens ditas dimórficas têm a capacidade de formar estruturas semelhantes às hifas dos fungos filamentosos em algum momento do seu desenvolvimento. Sabe-se que a produção de pseudohifas pode ser induzida, e o potencial para a produção de compostos de interesse destas estruturas diferenciadas têm despertado grande interesse da comunidade científica (COX; PAUL; THOMAS, 1998). No caso da levedura *Aureobasidium pullulans*, que pode apresentar diferentes morfologias dependendo das condições reacionais, estudos têm evidenciado a predominância da morfologia leveduriforme nas condições de maior produção do polissacarídeo pululana (SUGUMARAN et al., 2014). O pH demonstra ser o principal fator que afeta tanto a morfologia quanto a produção do polissacarídeo. Em pH baixo, quando produção de pululana encontra seus menores níveis, a levedura apresenta morfologia filamentosa, diferente da morfologia leveduriforme que é apresentada na faixa de pH com maior produção, entre 5,5 e 7,5 (SUGUMARAN et al., 2013).

O conhecimento da morfologia microbiana demonstra ter uma influência importante sobre o metabolismo e a produtividade, e apesar de serem de difícil implementação, processos de melhorias baseados em informações morfológicas são cada vez mais necessários. Do ponto

de vista industrial essas medições devem ser imparciais, objetivas e rápidas (PINTO et al., 2004).

3.3. Yarrowia lipolytica

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia do filo Ascomycota que possui intensa atividade secretora e elevada capacidade de geração de produtos de alto valor agregado, tais como lipases, esterases, proteases, fosfatases, ácido cítrico, além de uma variedade de proteínas extracelulares (OLIVEIRA et al., 2010). Originalmente classificada como do gênero Candida, reclassificada como Endomycopsis lipolytica, Saccharomycopsis lipolytica e finalmente como Yarrowia lipolytica, é atualmente uma das espécies "não convencionais" mais intensivamente estudadas, sendo classificada como GRAS (Generally Regarded As Safe) pela Food and Drug Administration (FDA, EUA) (BARTH; GAILLARDIN, 1997; SWENNEN; BECKERICH, 2007).

Com um nome que faz referência a sua capacidade de degradar parafinas e óleos, a espécie *Y. lipolytica* é uma eficiente degradadora de substratos hidrofóbicos. Múltiplos genes estão envolvidos nas rotas metabólicas que permitem à *Y. lipolytica* fazer uso de uma gama de substratos lipídicos (BANKAR et al., 2009; BEOPOULOS et al., 2009). *Yarrowia lipolytica* é um excelente exemplo de micro-organismo com grande potencial biotecnológico, graças à possibilidade de produção de uma variedade de metabólitos, sendo a lipase um dos mais importantes. Em leveduras lipolíticas, a produção de lipases é induzida pelos ácidos graxos derivados da degradação de gorduras (TURKI et al., 2010; NAJJAR et al., 2011). No caso da levedura *Y. lipolytica*, a mesma é capaz de produzir várias lipases utilizando triglicerídeos como fonte de carbono, hidrolisando-os em ácidos graxos livres e glicerol (DARVISHI et al., 2011). Essa enzima desperta interesse devido às suas amplas aplicações tecnológicas em produtos alimentares, farmacêuticos e na área de produção de detergentes.

Adicionalmente, o potencial para produção e armazenamento de lipídios também tem sido alvo de interesse em diversas pesquisas. Na natureza existem micro-organismos capazes de acumular lipídios em quantidade substancial, podendo chegar a 70% da sua biomassa, e por esse motivo são considerados candidatos potenciais para o chamado biodiesel de segunda geração obtido através da transesterificação de compostos lipídicos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). Os lipídios são armazenados principalmente na forma de triglicerídeos e

estéril éster. Em *Y. lipolytica* a acumulação de lipídios é estimulada principalmente pelo esgotamento da fonte de nitrogênio do meio, que faz com que a levedura continue a assimilar a fonte de carbono, porém, direcionando-a para a síntese de lipídios (BEOPOULOS: CHARDOT; NICAUD, 2009).

Esta levedura é atualmente considerada um sistema confiável e versátil para a expressão de proteínas heterólogas, tanto para fins acadêmicos como para possíveis aplicações comerciais. A combinação de fatores como o aumento do conhecimento sobre o seu metabolismo, sequenciamento do seu genoma e o desenvolvimento de ferramentas genéticas cada vez mais eficientes têm permitido grandes avanços na área de engenharia metabólica (MADZAK, 2015). Além disso, a sua capacidade inerente de secretar uma variedade de proteínas via translocação co-translacional e bom rendimento de produto são características adicionais que tornam *Y. lipolytica* cada vez mais estudada (COELHO et al., 2010).

3.3.1. Dimorfismo em Yarrowia lipolytica

A capacidade de alternar reversivelmente a morfologia é uma característica predominante nos fungos, que o fazem de modo a se adaptar a novos ambientes. Denominado dimorfismo, esse fenômeno desperta interesse devido ao seu impacto sobre a virulência do micro-organismo, uma vez que os fungos dimórficos são responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas em seres humanos e outros mamíferos (HURTADO et al., 2000; MORALES-VARGAS et al., 2012). O dimorfismo em leveduras faz com que estas apresentem estruturas filamentosas, sendo uma forma de tolerância a possíveis estresses e envolve uma ampla modificação da maquinaria celular (ZINJARDE; PANT; DESHPANDE, 1998).

Existem evidências de que os sinais externos que influenciam no dimorfismo em fungos são detectados basicamente através da operação de dois mecanismos de transdução de sinal, a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a proteína quinase (PKA) dependente de AMP-cíclico (cAMP) (CERVANTES-CHÁVEZ et al., 2009). Em *Y. lipolytica* estas vias trabalham de maneira oposta, enquanto a via de sinalização MAPK é necessária para a formação de filamentos, a via PKA é requerida para o crescimento leveduriforme. Este mecanismo difere do encontrado em *C. albicans* e em outros fungos, onde essas vias

trabalham em conjunto na regulação da transição dimórfica (MORALES-VARGAS et al., 2012).

A levedura *Y. lipolytica* desperta muito interesse em diversos grupos de pesquisa devido a fácil reprodutibilidade em condições *in vitro* do seu dimorfismo, que pode ser induzido alterando-se fontes de carbono e nitrogênio, por exemplo (CERVANTES-CHÁVEZ; RUIZ-HERRERA, 2006). Bioquimicamente, o dimorfismo consiste em uma alteração extrema do padrão de biossíntese da parede celular, que é iniciada a partir de um aumento da polarização do citoesqueleto. Esta polarização resulta em um acúmulo de vesículas que carregam enzimas de biossíntese da parede celular para as extremidades da célula onde há o alongamento celular (HURTADO; RACHUBINSKI, 2002).

As células hifadas são caracterizadas por uma organização interna diferenciada e um volume significativamente maior quando comparadas à morfologia leveduriforme (SZABO; STOFANÍKOVÁ, 2002). Em leveduras a divisão mitótica, seja por brotamento ou por fissão, produz células-filhas independentes. Quando há a formação de pseudo-hifas as células geralmente alongadas permanecem aderidas umas às outras, produzindo cadeias ramificadas com constrições bem definidas entre as células. Já a hifa é caracterizada pela presença de septos verdadeiros e ausência de constrições entre as células (SANNA et al., 2012).

Y. lipolytica pode assumir diferentes morfologias dependendo das condições ambientais, sendo um modelo útil em estudos sobre dimorfismo (CERVANTES-CHÁVEZ E RUIZ-HERRERA, 2007). Estirpes selvagens de Yarrowia. lipolytica possuem capacidade de alterar sua morfologia em respostas às condições ambientais e nutricionais, exibindo formas de colônias variadas, sendo a morfologia determinada tanto pelas condições de crescimento quanto pela genética (ZINJARDE; PANT; DESHPANDE, 1998). Esta espécie é capaz de crescer nas formas haploide e diploide e pode mudar de um ciclo de vida leveduriforme para a forma filamentosa, formando pseudo-hifas e hifas septadas (SWENNEN; BECKERICH, 2007; MORÍN et al., 2007). Diferentes fatores já foram descritos como indutores no dimorfismo de Y. lipolytica, dentre eles estão a fonte de carbono, fonte de nitrogênio, presença de citrato e o pH, sendo este último o mais importante nas mudanças morfológicas na levedura (CERVANTES-CHÁVEZ; RUIZ-HERRERA, 2006; SZABO; STOFANÍKOVÁ, 2002).

Segundo Szabo e Stofaníková (2002), espécies dimórficas, como *Y. lipolytica*, crescem em forma de levedura em ambientes ácidos, ao passo que com o aumento do pH passam a induzir a formação de hifas. Cervantes e Herrera (2007) puderam verificar através de imagens que a sua estirpe de *Y. lipolytica* apresentava diferentes morfologias quando cultivada em meios de mesma composição, porém com diferentes pHs. Os pesquisadores confirmaram que quando o pH se encontrava perto da neutralidade a levedura passava apresentar hifas extensas, enquanto em pH igual a três a presença de células hifadas era praticamente nula.

A agitação também já demonstrou ser um parâmetro importante na formação de hifas, provavelmente devido ao fato desta levedura ser estritamente aeróbia, formando filamentos em situações de pouca disponibilidade de oxigênio (NUNES et al., 2013). Braga e colaboradores (2015), entretanto, verificaram diferenças na morfologia apresentada por uma estirpe de *Y lipolytica* quando aplicados dois tipos de agitação diferentes. Quando a levedura foi empregada em um processo em *STR* (Stirred Tank Reactor) houve a formação de células filamentosas e irregulares, o que não aconteceu quando a mesma foi empregada em outro processo em biorreator do tipo *airlift*. Segundo os autores, a agitação mecânica foi a maior responsável pelo estresse sofrido pela levedura.

3.4. LIPASES

Lipases são serina hidrolases denominadas triacilglicerol acilhidrolases (E.C. 3.1.1.3). Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações éster de tri, di e monoglicerídeos de cadeia longa em ácidos graxos e glicerol, diferindo das esterases que hidrolisam apenas ésteres solúveis de ácidos graxos de cadeia curta. Em determinadas condições, as lipases podem catalisar reações de esterificação e de transesterificação, sendo a quantidade de água no meio reacional um dos principais parâmetros para a determinação da reação a ser catalisada por essa enzima. A presença de água geralmente desloca o equilíbrio da reação para a hidrólise, limitando a síntese de ésteres, que é mais favorecida em solventes orgânicos anidros (BIGEY et al., 2003). Adicionalmente, as lipases são ainda capazes de catalisar reações de alcóolise, acidólise e aminólise.

As lipases podem ser classificadas quanto a sua especificidade, de acordo com o substrato, como regiosseletivas, tipo-seletivas e enantioseletivas. Lipases regiosseletivas

possuem habilidade de hidrolisar ésteres de ácido graxo primário ou secundário, sendo ainda subdivididas em lipases específicas (hidrolisam apenas ésteres de ácido graxo primário) e lipases não específicas (hidrolisam ésteres de ácido graxo primário ou secundário). Tiposeletivas são lipases com capacidade de hidrolisar um tipo particular de éster de glicerol. Já as lipases enantiosseletivas têm a habilidade de diferenciar enantiômeros em uma mistura racêmica (BORA et al., 2013).

As lipases constituem o grupo mais importante de biocatalisadores, tanto sob o ponto de vista fisiológico quanto biotecnológico, com comprovado potencial para aplicações industriais diversas. Estabilidade em solventes orgânicos, não requerimento de cofatores e atuação em um amplo espectro de substratos, são características que atraem atenção para estas enzimas. As lipases já são aplicadas satisfatoriamente na síntese de biopolímeros, produção de biodiesel, produtos farmacêuticos, agroquímicos, flavorizantes, indústria de detergentes dentre outros (BUSSAMARA et al., 2010; CONTESINI et al., 2010). Essas enzimas podem ser produzidas por animais, plantas e micro-organismos, sendo as lipases microbianas as mais amplamente estudadas (BORA et al., 2013). A Tabela 3.1 traz alguns exemplos de lipases microbianas com aplicações industriais comercializadas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Lipases microbianas catalisam tanto hidrólise quanto reações de síntese e despertam muito interesse devido à sua seletividade, alta especificidade de substrato e estabilidade em temperaturas extremas, pH e solventes orgânicos (DOMÍNGUEZ et al., 2010). A capacidade de catalisar reações em solventes não aquosos tem colocado as lipases em posição de destaque. Quando esses biocatalisadores são utilizados em solventes orgânicos com baixo teor de água eles têm a sua estabilidade aumentada e as reações de síntese são favorecidas. Apesar do grande número de lipases já descritas na literatura, poucas demonstraram ter estabilidade adequada e capacidade biossintética para serem utilizadas em reações orgânicas. Este fato estimula de maneira crescente pesquisas que têm por objetivo a identificação e a produção de lipases por diversos micro-organismos (DUTRA et al., 2008; RIGO et al., 2010).

Atualmente, o biodiesel é sem dúvida o produto que mais tem atraído atenção dentro do universo de aplicações das lipases microbianas. Combustível de fonte renovável, definido como mono-alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, o biodiesel produzido por via enzimática tornou-se promissor devido às vantagens oferecidas, como condições suaves de

processamento, ser semi-intensivo em energia e de menor agressividade ao meio ambiente, quando comparado ao combustível obtido através da síntese química (ZHONG et al., 2013).

Tabela 3.1. Algumas lipases microbianas disponíveis comercialmente e suas aplicações industriais. Fonte: Singh; Mukhopadhyay (2012).

Micro-organismo	Nome comercial	Empresa	Aplicação
Candida antarctica	Chirazyme®L-5 SP526	Boehringer Mannheim	Síntese
Candida antarctica	Chirazyme®L-2	Boehringer Mannheim	orgânica
Candida antarctica	SP526	Novo Nordisk	
Candida antarctica	SP 525 or Novozym 435b	Novo Nordisk	
Candida cylindracea	ChiroCLEC-CR	Atlus Biologics	Alimentos
Candida cylindracea	Lipase AY	Amano	
Candida cylindracea	Lipase MY, Lipase OF-	Meito Sangyo	
Candida cylindracea	360 Chirazyme® L-3	Boehringer Mannheim	
Candida cylindracea	Lipomod™ 34P-L034P	Biocatalysts	
Candida rugosa	Lipase AY "Amano" 30 Amano		Síntese
Candida rugosa	Resinase® Novozyme		orgânica
Penicillium roquefortii	Lipomod™ 338P-L338P	Lipomod™ 338P-L338P Biocatalysts	
Penicillium	Lipase G "Amano" 50	Amano	Alimentos,
camemberti			Oleoquimica
Aspergillus niger	Lipase A "Amano" 6	Amano	Alimentos
Aspergillus niger	Lypolyve NA	Lyven	
Thermomyces	Lipolase®	Novozymes	Detergente
lanuginosus	Lipolase® Ultra	Novozymes	
	Lipo Prime TM	Novozymes	
	Lipex®	Novozymes	
Mucor javanicus	Lipase M "Amano" 10	Amano	Alimentos, Oleoquimica
Geotrichum candidum	Chirazyme®L-8	Boehringer Mannheim	Oleoquimica
	SP 524,	Novo Nordisk	-
	Lipolase	Novo Nordisk	
Humicola lanuginose	Lipolase TM	Novo Nordisk	Detergente

3.4.1. Lipases de Yarrowia lipolytica

A produção de enzimas lipolíticas permite que muitos micro-organismos possam assimilar compostos de triacilgliceróis (TAGs) como fonte de carbono, uma vez que esses compostos não atravessam a membrana celular de maneira passiva e precisam ser decompostos em ácidos graxos livres (FFAs) e glicerol para serem absorvidos (NAJJAR et al., 2011). A levedura *Yarrowia lipolytica* é um exemplo de micro-organismo capaz de utilizar TAGs como fonte de carbono graças à produção de lipases, servindo inclusive de modelo para estudos sobre lipólise extracelular e absorção de gordura (KAMOUN et al., 2015).

A principal lipase extracelular da espécie *Y. lipolytica*, denominada Lip2, é produzida em grandes quantidades, sendo uma das poucas enzimas dentre as lipases que hidrolisam TAGs de cadeia longa mais rápido do que hidrolisam tributirina. Uma estirpe mutante (LgX64.81), por exemplo, foi capaz de produzir 1.000 U/ml de atividade de lipase em um biorreator de 15 L e 1.118 U/mL em um biorreator de 2.000 L. Muitos estudos reportam uma elevada produção desta enzima a partir da indução por substratos lipídicos, o que aumenta cada vez mais o interesse sobre a Lip2. Diversas pesquisas têm buscado aplicar essa enzima na substituição de enzimas pancreáticas para casos de insuficiência. A lipase Lip2 mostrou-se ativa nas condições do trato gastrointestinal humano, como as lipases gástricas e pancreáticas (ALOULOU et al., 2007a). Além disso, em valores de pH próximo ao encontrado no trato intestinal, a adsorção dessa enzima na interface óleo-água não foi inibida pelos sais biliares, o oposto do que acontece com outras lipases microbianas (ALOULOU et al., 2007b).

A lipase Lip2 possui massa molar de aproximadamente 38 kDa, sendo estruturalmente homóloga a muitas lipases fúngicas (YAN et al., 2013). Uma das características é a presença de um subdomínio móvel chamado de tampa, de natureza hidrofóbica, que facilita a ligação à interface lipídeo-água e controla o acesso de moléculas de substrato ao centro catalítico (CUI et al., 2013). No que concerne à obtenção dessa enzima, grande parte dos esforços está centrada na modificação genética de estirpes de *Y. lipolytica*, visando à construção de estirpes superprodutoras, seja por mutagênese clássica, amplificação do gene *LIP2* ou até mesmo a combinação dessas duas técnicas (PIGNÈDE et al., 2000; JOLIVET et al., 2007). Embora a utilização de micro-organismos geneticamente modificados

(MGM) possa suscitar dúvidas acerca da segurança, *Y. lipolytica* é listada por muitos países como aceitável para a construção de MGM, desde que as instalações para produção em larga escala respeitem as Boas Práticas da Fabricação Industrial em Grande Escala (GILSP) em nível de confinamento físico (MADZAK, 2015).

Pignèd e colaboradores (2000) mostraram a importância de estudos sobre a amplificação de genes utilizando a levedura *Y. lipolytica*. Eles relataram o isolamento e a caracterização do gene *LIP2*, que codifica para a produção da lipase Lip2. Ao superexpressarem esse gene na estirpe modificada, por eles denominada LIP2A, obtiveram um aumento de 100 vezes na produção de lipase. De maneira semelhante, Nicaud e colaboradores (2002) testaram uma estirpe mutante que continha múltiplas cópias do gene *LIP2* integradas seu ao genoma. A produção de lipase por esta estirpe atingiu 2.000 U/mL em condições não otimizadas e 90.500 U/mL em um processo de batelada alimentada otimizado.

Existem ainda pesquisas que utilizam outros micro-organismos como hospedeiros para a expressão heteróloga de proteínas, no caso a lipase Lip2. As leveduras aparentam ser os hospedeiros mais atraentes por serem capazes de crescer em meios de baixo custo e terem níveis de expressão de proteínas elevados. Além disso, tanto a secreção de proteínas como as modificações pós-translacionais cruciais, tais como a formação de pontes dissulfeto e a glicosilação, são eficazes (WANG et al., 2012; NARS et al., 2014; ZHOU et al., 2015).

Além da lipase Lip2, na literatura também estão descritas outras lipases produzidas por *Y. lipolytica*. São conhecidas pelo menos 25 lipases putativas, dentre elas estão as lipases Lip2, Lip7, Lip8, Lip9, Lip11, Lip12, Lip14 e Lip18. As lipases Lip7 e Lip8, diferentemente da Lip2, não são produzidas em grandes quantidades, existindo ainda divergências sobre as mesmas serem extracelulares ou intracelulares (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2010; FICKERS et al., 2011). As lipases Lip11 e Lip12 possuem atividade mais elevada em óleos, seguido por triacilgliceróis e ésteres. No entanto, no que diz respeito a ésteres de ácidos graxos, a lipase Lip11 tem especificidade para cadeias medias e longas, enquanto a Lip12 tem especificidade apenas para cadeias médias (KUMARI; VERMA; GUPTA, 2012). As lipases Lip8, Lip9, Lip11, Lip12, Lip14 e Lip18 têm pH ótimo próximo 7,0. Adicionalmente, a Lip18 demonstrou ser a lipase com a maior termoestabilidade, característica importante para a aplicação em reações de síntese livres de solventes (ZAO et al., 2011; KUMARI & GUPTA, 2012).

3.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como um processo de fermentação que envolve uma matriz sólida e é realizada na ausência, ou quase ausência, de água livre (SINGHANIA et al., 2009), sendo uma alternativa à fermentação submersa na obtenção de produtos com alto valor agregado (BHARGAV et al., 2008). O método de transformar substratos sólidos utilizando-se de micro-organismos é, provavelmente, um dos mais antigos já desenvolvidos pelo homem. Como exemplos de fermentações tradicionais podem ser citados o arroz japonês do tipo "Koji", que utiliza o arroz como substrato sólido com estirpes de *Aspergillus oryzae*, e o "Queijo Azul" francês, que utiliza queijo fresco como substrato e *Penicillium roquefortii* como inoculante (VINIEGRA-GONZALEZ, 1988).

Aproximadamente 90% de todos os biocatalisadores industriais são produzidos por fermentação submersa (FS) utilizando micro-organismos geneticamente modificados (CONTESINI et al., 2010). As lipases são um exemplo desses catalisadores, tradicionalmente produzidos por fermentação submersa. A fermentação submersa proporciona tanto uma melhor recuperação das enzimas extracelulares quanto um monitoramento eficaz da biomassa microbiana, seja por filtração ou centrifugação. Em contrapartida, a fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado uma técnica promissora no desenvolvimento de diversos bioprocessos (Tabela 3.2) (BHARGAV et al., 2008). Isso se deve principalmente à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos, além das vantagens inerentes a esse tipo de fermentação, conforme descritas a seguir no texto (CORADI et al., 2012).

Tabela 3.2. Dados da literatura sobre produção de diferentes metabólitos em fermentação no estado sólido a partir de diferentes matérias-primas.

Micro-organismo	Matéria Prima	Metabólito	Referencia
Rhizomucor pusillus, R. rhizopodiformis	Bagaço de cana de açucar, torta de oliva	Lipases	Cordova et al., (2008)
Rhizopus chinensis	Farinha e farelo de trigo	Lipases	Sun &Xu (2008)
Pleurotus ostreatus	Casca de arroz, palha de trigo	Enzimas lignocelulolíticas	Mansti et al., (2012)
Candida rugosa	Tortas de amendoim, gergelim, coco	Lipases	Rajendran et al., (2012)

Aspergillus niger	Bagaço de maçã e casca de arroz	Ácido cítrico	Dhillon et al., (2013)
A. niger, A. ibericus, A. uvarum	Resíduos das indústrias de vinho e azeite	Enzimas lignocelulolíticas	Salgado et al., (2013a)
A. niger, A. ibericus, A. uvarum	Resíduos das indústrias de vinho e azeite	Lipases	Salgado et al., (2013b)
Rhizopus oryzae	Bagaço de cana de açúcar	Lipases	Vaseghi et al., (2013)
S. cerevisiae, Kluyveromyces marxianus, kefir	Resíduos diversos da indústria alimentícia	Lipídios microbianos, compostos orgânicos	Aggelopoulos et al., (2014)
Aspergillus oryzae	Torta de canola	Proteases	Freitas et al., (2015)
S. cerevisiae	Casca de laranja	Flavorizantes	Mantzouridou et al., (2015)
Pleurotus ostreatus	Cascas de semente de girassol	Biossurfactantes	Velioğlu & Ürek (2015)

O interesse na FES se renovou nas últimas décadas frente à constante preocupação com a conservação de energia e biomassa, além do crescente interesse no tratamento de resíduos sólidos. As atuais práticas agrícolas e industriais geram grandes quantidades de materiais de baixo custo ou até mesmo de valor negativo, que podem ser prontamente aplicados na FES. Os materiais que compõem os substratos são normalmente a base de lignocelulose ou amido, e permitem o crescimento dos micro-organismos de maneira natural (PANDEY, 2003). Eles são selecionados de acordo com o produto desejado, podendo ainda haver a utilização de indutores, principalmente quando o produto final são enzimas (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Além de agregar valor aos resíduos, a FES oferece ainda uma série de vantagens quando comparada à fermentação submersa, intensificando cada vez mais a sua aplicação em bioprocessos. Dentre as vantagens, podem ser citadas a maior produtividade volumétrica, contaminação reduzida, tempo de fermentação geralmente mais curto e baixo consumo de água e energia (FERNÁNDEZ; CORREA, 2007). Ainda segundo Holker e colaboradores

(2004), enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH.

Os resíduos utilizados na FES podem servir tanto como substrato quanto como suporte para a síntese de metabólitos com alto valor de mercado, como por exemplo, lipídios microbianos, ácidos orgânicos, biossurfactantes, células ricas em proteína e enzimas (MAFAKHER et al., 2010). Esses resíduos podem diferir em diversos aspectos quanto a sua composição, como por exemplo, natureza química, tamanho de partícula, capacidade de retenção de água, dentre outros. Esse fato justifica o aumento de pesquisas em FES envolvendo a utilização de dois ou mais resíduos simultaneamente.

Estudos mostram que as carências nutricionais de um resíduo podem ser compensadas com adição de um outro com características complementares. Babu e Rao (2007) ao trabalharem com diversos resíduos verificaram que a produção da lipase foi bastante favorecida na FES com substrato misto, contendo bagaço de cana e farelo de trigo, quando comparada às fermentações contendo os resíduos separadamente. Além da compensação nutricional, a integração de resíduos pode também superar problemas como toxicidade e capacidade de retenção de água, atuando sinergicamente na produção de enzimas (CORDOVA et al., 1998; SUN & XU, 2008; SANTIS-NAVARRO et al., 2011; CORADI et al., 2012; SALGADO et al., 2013a).

Farias e colaboradores (2014) avaliaram o potencial de diferentes resíduos para a produção de enzimas lipolíticas através da FES utilizando uma estirpe selvagem de *Y. lipolytica*. Os pesquisadores testaram farelo e borra provenientes do processamento da soja e torta de algodão. A torta de algodão proporcionou tanto um bom crescimento do microorganismo como uma boa produção de enzimas sem a necessidade de qualquer suplementação, servindo como fonte de carbono e nitrogênio para a levedura. A borra da soja, rica em triacilgliceróis e ácidos graxos, foi utilizada juntamente com o farelo, agindo como indutor para produção de lipases. Quando utilizado sozinho, o farelo de soja não foi capaz de propiciar a produção de lipases pela levedura, provavelmente pela baixa concentração de óleo remanescente. Os resultados obtidos nesse estudo demostram o potencial da FES, uma vez que resíduos da indústria de processamento de óleo puderam ser efetivamente empregados na obtenção de lipases.

Em se tratando da produção de lipases, a utilização da FES pode ser ainda mais vantajosa por conta da possibilidade de utilização da enzima produzida sem qualquer extração ou imobilização prévia. Enzimas produzidas desta maneira reduzem os custos por estarem naturalmente imobilizadas, podendo ser prontamente utilizadas em processos biossintéticos que não exijam biocatalisadores com alto grau de pureza (RIGO et al., 2010). A utilização direta do substrato fermentado contendo enzimas extracelulares evita etapas financeiramente dispendiosas como purificação, concentração e imobilização enzimática (CORADI et al., 2012; AGUIEIRAS et al., 2014).

Apesar dessas vantagens, a aplicação da FES em processos industriais ainda é bastante precária devido à dificuldade de monitoração e controle das variáveis envolvidas no processo. Enquanto a fermentação submersa é considerada homogênea, na fermentação em estado sólido podem existir vários gradientes de temperatura e umidade que afetam negativamente a produção de metabolitos, principalmente quando se trabalha com grandes volumes (FARINAS et al., 2010). As técnicas convencionais para controle da temperatura em fermentações submersas não são facilmente adaptáveis para a fermentação em estado sólido. Convencionalmente, o controle da temperatura em FES é realizada principalmente através do ajuste da aeração do meio.

Segundo Raghavarao e colaboradores (2003), no início da fermentação em estado sólido a concentração de oxigênio e a temperatura são as mesmas em todos os locais do leito. Com o desenvolvimento do processo, entretanto, ocorre a depleção gradativa do oxigênio e as reações ali existentes passam a liberar calor que não é facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica dos substratos. Com o aumento no tempo da fermentação ocorre ainda uma diminuição da porosidade do substrato, que acaba por dificultar ainda mais o processo de transferência de massa e calor. Sob estas circunstâncias acabam se formando os gradientes na FES.

A medição da biomassa na FES também é um parâmetro crítico, com medições diretas inexistentes. Por esse motivo, as medições *off-line* se tornam mais comuns nesse tipo de processo, permitindo a aquisição de informações importantes, porém com um grande atraso (JIANG et al., 2012). Na FES, a biomassa fica geralmente ligada à superfície sólida do meio, de maneira a dificultar a sua medição. Medidas indiretas de biomassa são utilizadas nesses casos, como por exemplo, medição da taxa de respiração do micro-organismo (OSMA)

et al., 2011). Existem poucos trabalhos disponíveis sobre a caracterização morfológica e a cinética da biomassa em FES, principalmente por causa da complexidade da medição das principais variáveis do processo (COURI et al., 2006).

Algumas metodologias têm sido propostas como medidas indiretas de quantificação da biomassa, na maioria dos casos a metodologia proposta é comparada com o método de glicosamina, que é considerado um método clássico para a quantificação. Entretanto, este método pode apresentar erros devido à variação no conteúdo de glicosamina em diferentes estágios de crescimento do micro-organismo e à baixa especificidade da quantificação. Isso significa que diferentes açúcares de seis carbonos, como os presentes no tecido vegetal do substrato utilizado na FES, também podem ser medidos por esse método (DUTRA et al., 2008).

4. MATÉRIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Reagentes

Os principais reagentes utilizados para a composição dos meios de cultura e ensaios analíticos estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Principais reagentes utilizados em meios de cultura e ensaios analíticos.

Reagente	Fabricante		
Ágar	Vetec		
Alaranjado de acridina	-		
Azul de metileno	-		
Extrato de levedura	Oxoid		
FUN 1 (LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit)	Thermo Fisher Scientific		
DMSO (Dimetil Sulfóxido)	Vetec		
Glicose	Reagen		
Peptona	Oxoid		
Uréia	Vetec		
NaCl	Vetec		
NaOH	Vetec		
p-nitrofenil laurato	Fluka		
Safranina	Vetec		
Sulfato de Amônio	Vetec		
Triton X-100	-		
Tween – 80	Sigma-Aldrich		

4.1.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Principais equipamentos utilizados.

Equipamento	Fabricante	Modelo		
Analisador de umidade (balança)	AND	MX-50		
Balança analítica	Mettler	AE260		
Biorreator de bancada	Multigen	-		
Câmara de fluxo laminar com UV	Labconco	BioFlux II		
Câmera digital	MediaCybernetics	Evolution VF		
Centrífuga	Fanem	204-NR		
Espectrofotômetro	Bell Photonic	SP2000-UV		
Estufa para incubação com umidade saturada	Tecnal	BOD		
Incubador com agitação e controle de temperatura	Certomat	BS-1		
Leitor de Microplaca	SpectraMax M2e	Molecular Devices		
Lupa estereoscópica	-	-		
Microcentrífuga	Eppendorf	5804R		
Microscópio	Nikkon Eclipse	E200		
Programa computacional	MatlabWorks	Matlab R2011b		
Programa computacional	QImaging	Qcapture-Pro		
Peneirador e peneiras	GranuTest	-		

4.2. MICRO-ORGANISMO

Em todos os experimentos, o micro-organismo utilizado foi a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, estirpe selvagem isolada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2.1. Preservação do micro-organismo

A levedura foi conservada a 4 °C após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio contendo ágar YPD, com composição (em m/v): extrato de lêvedo 1 %, peptona 2 %, glicose 2 % e Agar-agar 2 %.

4.2.2. Cultivo do pré-inóculo

As células, inicialmente preservadas em tubos contendo YPD ágar, foram inoculadas de maneira estéril em frascos contendo 200 mL de meio líquido YPD (extrato de lêvedo 1 % m/v, peptona 2 % m/v e glicose 2 % m/v). Após a inoculação os frascos foram incubados com agitação orbital (*shaker*) por 72 horas a 28 °C e 160 rpm.

4.3. ESTERILIZAÇÃO

Todos os materiais e meios utilizados que exigiram condições assépticas, passaram por esterilização em autoclave. Os meios de composição orgânica foram esterilizados a 0,5 atm por 22 minutos, enquanto materiais em geral foram esterilizados a 1,0 atm por 22 minutos.

4.4. FERMENTAÇÃO SUBMERSA

As fermentações submersas foram conduzidas para os estudos preliminares de PDI.

4.4.1. Meio de produção

O meio de cultivo utilizado em biorreator foi o meio YPD modificado. A quantidade de peptona foi reduzida para 0,64 % (m/v) enquanto os outros componentes tiveram suas quantidades mantidas (AMARAL, 2007).

4.4.2. Inoculação do meio de produção

Após as 72 horas de cultivo do pré-inóculo, uma alíquota foi retirada para determinação da absorbância a 570 nm e cálculo da biomassa (ver item 4.4.5). Após isso, as células foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e suspensas em 10 mL do meio de produção, para posterior inoculação do biorreator. O volume de pré-inóculo centrifugado foi calculado de modo a se obter, aproximadamente, uma concentração inicial de células de 1,0 mg m.s. cel. mL⁻¹.

4.4.3. Biorreator

O biorreator utilizado foi do modelo *Multigen* (New Brunswick Scientific Co., EUA), com capacidade nominal de 2 litros. Esse modelo é composto de agitação magnética, aeração e controle de temperatura simultâneos, apresentando duas chicanas e duas turbinas (turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais), conforme mostra a Figura 4.1.



Figura 4.1. Biorreator de bancada utilizado para o desenvolvimento da FS.

Para esse experimento foram adotados os seguintes parâmetros: concentração inicial de células de 1,0 g.L⁻¹, temperatura de cultivo de 28 °C, vazão de oxigênio de 1,5 L.min⁻¹ e volume de trabalho de 1,5 L.

4.4.4. Amostragem

Durante as 48 horas de processo, amostras de 5 mL foram retiradas, de modo asséptico, em intervalos de três horas. Parte desse volume foi separado para quantificação celular, enquanto a outra parte foi direcionada para a aquisição de imagens, sempre em triplicata.

4.4.5. Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorbância em espectrofotômetro *Bel Photonic SP2000-UV* a 570 nm. Os valores de cada leitura foram convertidos para mg m.s. cel.mL⁻¹ utilizando-se o fator obtido através de uma curva padrão (Figura 4.2) de peso seco de *Y. lipolytica* previamente elaborada, conforme metodologia descrita por Amaral (2007).

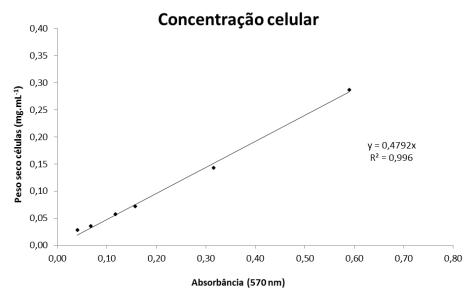


Figura 4.2. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* (570 nm em espectrofotômetro *Bel Photonic SP2000-UV*).

4.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As fermentações em estado sólido foram conduzidas tanto para os estudos de PDI quanto para os estudos envolvendo a produção de lipases pela estirpe de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

4.5.1. Matérias primas

4.5.1.1. Torta de macaúba

A torta de macaúba utilizada na FES foi obtida a partir da prensagem à frio da polpa e casca da macaúba (cedida pela PETROBRAS - CENPES). Esse material foi estocado a temperatura de 5 °C e foi utilizado sem nenhum tratamento químico prévio. A Tabela 4.3 mostra as análises físico-químicas da torta da polpa e casca de macaúba.

Tabela 4.3. Análises físico-químicas da torta residual da polpa de macaúba realizada pelo laboratório de controle bromatológico-LABCBROM/UFRJ.

Análises físico- químicas	Composição centesimal base seca (%) da torta de macaúba– Polpa e casca.		
Cinzas	$2,3\pm0,1$		
Proteínas	$4,6\pm0,2$		
Extrato etéreo	$5,8\pm0,3$		
Carboidratos totais Nifext	16.2 ± 1.6		
Fibras totais	$71,2 \pm 1,6$		

4.5.1.1.1. Separação granulométrica

A torta de macaúba foi submetida a um processo de separação granulométrica utilizando peneiras com aberturas de 1,18 mm.

4.5.1.1.2. Medição da umidade

O teor de umidade da torta foi medido através da análise de amostras de aproximadamente 0,5 g de material fermentado diretamente no analisador de umidade.

4.5.1.2. Two-phase olive mil waste (TPOMW)

TPOMW é um resíduo da indústria de óleo de oliva, resultante do sistema de centrifugação de duas fases, que contém cerca de 60 % de água e 2,5-3,5 % de óleo residual. Esse subproduto tem alta umidade e viscosidade devido à ausência da etapa de separação das fases sólida e líquida durante o processo de extração do óleo (DARVISHI, 2012).

O TPOMW utilizado nesse estudo foi obtido a partir de indústrias de azeite da região norte de Portugal. Devido à alta umidade, o resíduo precisou ser completamente seco em estufa. Após a secagem, o mesmo foi moído até um tamanho de partícula inferior a 2 mm.

4.5.1.3. Farelo de trigo

O farelo de trigo, um subproduto da moagem do trigo para a confecção da farinha branca, é reconhecido por ser uma fonte de carbono de baixo custo. O resíduo utilizado neste estudo foi coletado a partir de indústrias de beneficiamento de trigo da região norte de Portugal. Apesar da baixa umidade, o farelo de trigo foi seco em estufa para um maior controle de umidade do processo.

4.5.2. Preparo do meio de produção

Em todos os processos fermentativos foram utilizados reatores contendo 10 g de matéria prima. Soluções nitrogenadas com 0,5 % de concentração (ureia e sulfato de amônio foram avaliados) foram adicionadas de modo a deixar a umidade da FES torno de 53 % (base úmida). O volume a ser adicionado a cada fermentação foi calculado através da seguinte fórmula:

Umidade (%) =
$$\left(\frac{mliq}{mliq+msol}\right) \times 100$$

Onde *mlíq* é a massa de água e *msol* é igual a massa do sólido seco.

Os reatores foram incubados em estufa com temperatura controlada a 28 °C e umidade saturada (99 %), de forma a manter a umidade do meio. Parâmetros como quantidade de matéria prima, umidade e concentração da solução nitrogenada foram baseados nos estudos realizados por Farias (2014).

4.5.3. Inoculação do meio de produção

Após as 72 horas de cultivo do pré-inóculo em meio YPD, a densidade celular foi analisada em espectrofotômetro a 570 nm. O valor de cada leitura foi convertido em número de células por mililitro (cel.mL⁻¹), utilizando-se o fator obtido através de uma curva padrão (Figura 4.3). O meio de produção foi então inoculado com volume equivalente a 10⁸ cel.mL⁻¹.

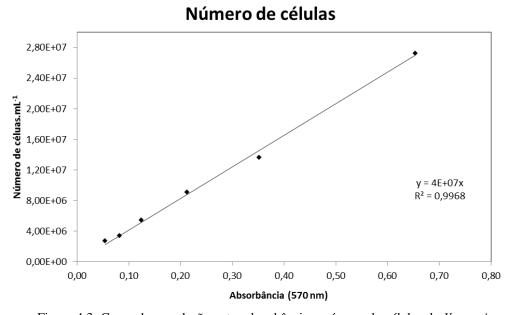


Figura 4.3. Curva de correlação entre absorbância e número de células de *Yarrowia lipolytica* (570 nm em espectrofotômetro *Bel Photonic SP2000-UV*).

4.5.4. Processo de extração enzimática

Nos estudos aplicando os resíduos TPOMW e farelo de trigo as extrações foram realizadas adicionando-se, ao final de cada tempo de processo fermentativo, 5 mL por grama de torta fermentada de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) adicionado de NaCl (1 %) e Triton-X100 (0,5 %) (MOREIRA, 2012). Nos estudos com torta de macaúba, inicialmente, as extrações foram realizadas adicionando-se 5 mL por grama de torta fermentada de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0). A influência da adição de cloreto de sódio (NaCl) e Triton-X100 na extração das FES de torta de macaúba foi avaliada.

A extração enzimática foi realizada em um agitador rotatório a 35 °C e 200 rpm por 20 min. Posteriormente, o fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 8.000 rpm por 15 min para remoção de sólidos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade da lipase.

4.5.5. Medição de pH

O pH dos extratos enzimáticos foi medido em potenciômetro previamente calibrado com soluções padrão de 4,0 e 7,0.

4.5.6. Amostragem

Os biorreatores foram retirados em intervalos regulares, sempre em duplicata para cada ponto de amostragem, para a realização da extração enzimática e separação das amostras para aquisição de imagens.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE

A atividade da lipase foi estimada através da variação de absorbância a 410 nm em leitor de microplacas (*Molecular Devices*, *SpectraMax M2e*) devido à hidrólise do p-nitrofenil laurato (p-NFL) a p-nitrofenol, com uma concentração de 0,162 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 7,0 (PEREIRA-MEIRELLES et al., 1997).

O substrato (p-NFL) foi preparado solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, essa alíquota foi diluída 100 vezes em tampão fosfato de potássio. A cinética enzimática foi realizada em leitor de microplaca onde, em cada poço, 180 μL de substrato previamente preparado foi aclimatado a 37 °C por, aproximadamente, 15 min. Após esse tempo, foram adicionados 20 μL do extrato enzimático e a variação da absorbância foi acompanhada durante 110 segundos, contra o branco de reação (20 μL de tampão fosfato de potássio adicionados a 180 μL de substrato). O cálculo da atividade foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$A = \frac{(\Delta Abs)x D x f x Vr}{\Delta t x Vs}$$

Onde A é a atividade da enzima (U/L) e 1 unidade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima capaz de produzir 1µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio; Δ **Abs**/ Δ t é a variação de absorbância no intervalo de tempo Δ t (em min) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorbância; D é a diluição da solução enzimática; Vr igual ao volume reacional, que é o volume da solução de p-NPL em tampão e o volume da amostra, em litros; Vs refere-se ao volume da solução enzimática utilizada no ensaio, em litros; f é o fator de conversão, obtido através da construção de uma curva padrão de p-NFL.

A atividade lipolítica por grama de sólido seco (U/g) foi calculada através da multiplicação da atividade em U/mL pelo volume de tampão utilizado na extração dividido pelo peso seco da amostra inicial.

4.7. ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS

Os processos fermentativos foram acompanhados através da aquisição e do tratamento de imagens, realizados a cada ponto analisado, conforme os subitens a seguir.

4.7.1. Preparo das amostras obtidas a partir da fermentação submersa

As amostras obtidas a partir da fermentação submersa foram diluídas em água destilada para a etapa de aquisição das imagens.

4.7.2. Preparo das amostras obtidas a partir da fermentação em estado sólido

No que tange a fermentação em estado sólido, diversas formas para separar a biomassa microbiana do meio fermentado foram testadas no decorrer da pesquisa. Nesta seção estão descritos tanto o primeiro método utilizado quanto o método desenvolvido. Entretanto, como a elaboração de um método eficiente de separação de biomassa para a aquisição de imagens de FES fez parte dos objetivos deste trabalho, maiores detalhes estão descritos no Capítulo 5 (resultados e discussão).

4.7.2.1. Estudos preliminares

Nos estudos preliminares as alíquotas obtidas a partir da fermentação em estado sólido eram diluídas em 1 mL de solução fisiológica e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação alíquotas contendo as células da levedura eram separadas para a etapa de aquisição de imagens.

4.7.2.2. Estudos avançados

As amostras contendo as células passaram a ser obtidas juntamente com o processo de extração enzimática. As células centrifugadas da levedura, aproximadamente 0,4 g, foram cuidadosamente transferidas para um tubo *Falcon* contendo 10 mL de solução fisiológica. A suspensão celular foi então diluída três vezes para a etapa de aquisição de imagens.

4.7.2.2.1. Utilização de corantes

A aplicação de corantes foi avaliada visando à melhoria na visualização dos objetos contidos nas imagens, no caso as células de *Yarrowia lipolytica*. Nesse estudo foram utilizados os seguintes corantes:

- Azul de metileno Adicionou-se 0,5 mL de uma solução de azul de metileno com concentração 1g/L a 0,5 mL de amostra e incubou-se por 5 minutos. As amostras foram visualizadas em microscopia de campo claro.
- Safranina Adicionou-se 0,5 mL de uma solução de safranina (0,25 % v/v,) a 0,5 mL e amostra e incubou-se por 5 minutos. As amostras foram visualizadas em microscopia de campo claro.
- Alaranjado de acridina Adicionou-se uma solução de alaranjado de acridina (4 g/L) à amostra de modo a se obter uma concentração final de 0,5 g/L, e incubou-se por 15 minutos no escuro. As amostras foram visualizadas em microscopia de fluorescência com o filtro apropriado de 450 nm-490 nm.
- FUN-1 Adicionou-se uma solução de FUN-1 (10 mM) à amostra de modo a se obter uma concentração final de 5 μM, e incubou-se por 30 minutos no escuro. As amostras foram visualizadas em microscopia de fluorescência com o filtro apropriado de 470 nm-590 nm.

4.7.2.2.2. Utilização de detergente

Com o objetivo de diminuir a interação entre as células de *Y. lipolytica* na etapa de aquisição de imagens, que tendem a ficar aderidas umas às outras, avaliou-se a aplicação de Tween-80 (1 %) às amostras.

4.7.3. Aquisição das imagens

4.7.3.1. Imagens em lupa estereoscópica

Para a aquisição de imagens macroscópicas, amostras de FES foram colocadas diretamente em placas de *Petri* e analisadas em lupa estereoscópica equipada com câmera digital.

7.7.3.2. Imagens em microscópio óptico

Para a visualização no microscópio, 20 µL da amostra foram depositados em uma lâmina e cobertos por uma lamínula. Para cada amostra duas lâminas foram preparadas e imagens foram obtidas, totalizando aproximadamente 150 imagens por amostra.

As aquisições foram realizadas em microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon®) usando as ferramentas disponíveis no *software* comercial Image-Pro Plus® 5.0 (Media Cybernetics, Inc.). Um micrometro e o *software* Image-Pro Plus® 5.0 foram utilizados para calibrar o tamanho das células para cada objetiva utilizada (40x e 100x), convertendo a área dos objetos (em *pixels*) em µm.

O microscópio utilizado possui câmera digital (Evolution VF fast cooled color, Media Cybernetics®) acoplada e ligada a um computador. A captura das imagens foi realizada em matriz *RGB* com 24 *bits* (16 milhões de cores aproximadamente), e as mesmas foram armazenadas no formato *TIFF*. As imagens digitais foram processadas e tiveram diversos parâmetros fundamentais determinados através de sub-rotinas desenvolvidas em ambiente MATLAB.

4.7.4. Processamento das imagens obtidas em microscópio óptico

4.7.4.1. Estudos preliminares

Nos estudos preliminares uma rotina simples de processamento foi utilizada em ambiente MATLAB para o processamento das imagens. A rotina semiautomática, desenvolvida seguindo a metodologia desenvolvida por Freire e colaboradores (2005) foi adaptada de uma rotina utilizada no estudo de estabilidade de emulsões.

Os objetos contidos nas imagens, adquiridas durante os estudos preliminares, precisaram ter seus contornos realçados. A cada amostra, uma imagem sem objetos foi adquirida para ser utilizada no processo de subtração de *background*.

Na rotina utilizada nesta etapa, as imagens coloridas eram primeiramente convertidas para a escala de cinza. Após a determinação do critério de binarização, por parte do operador, as imagens passavam pela etapa de eliminação de objetos de fronteira. Em seguida, eram

aplicadas operações morfológicas tais como a erosão (remoção de pequenos resíduos), reconstrução e preenchimento, produzindo a imagem binária final.

4.7.4.2. Estudos avançados

Assim como a metodologia para o preparo de amostras de FES, o desenvolvimento de uma nova rotina para o processamento de imagens foi também um dos objetivos desse trabalho.

A nova rotina foi desenvolvida de modo a processar eficientemente as amostras de FES adquiridas utilizando a nova metodologia de aquisição e preparo das amostras. Os detalhes da nova rotina para o processamento de imagens estão descritos no Capítulo 5 (resultados e discussão).

4.7.5. Análise das imagens

Após o tratamento das imagens seguiu-se para etapa de análise das mesmas, na qual se efetuou a quantificação dos objetos e o cálculo de parâmetros morfológicos. Para isso, outra sub-rotina desenvolvida em ambiente MATLAB foi aplicada. O programa, desenvolvido por Amaral (2003), permite o estudo em nível de características estruturais das células microbianas baseadas na geometria Euclidiana e na determinação das dimensões fractais.

Nesta etapa foram analisados os seguintes parâmetros para posterior análise: Área, Comprimento, Largura, Compacidade, Excentricidade, Robustez, Circularidade e Diâmetro Equivalente (D_{eq}).

• Área (A): A Área é calculada como a superfície do objeto projetada e é definida como o número de *pixels* que pertencem a um objeto convertido a unidades métricas:

$$A=N_{obj}\times F_{cal}$$

Em que N_{obj} é a soma dos *pixels* de cada objeto e F_{cal} é o fator de calibração métrico.

- Comprimento ($F_{m\acute{a}x}$): O Comprimento de um objeto é dado pelo Diâmetro de Feret Máximo convertido a unidades métricas. O Diâmetro de Feret de um objeto é a distância máxima entre duas tangentes paralelas tocando as bordas opostas de um objeto (GLASBEY & HORGAN, 1995).
- Largura (L): A Largura de um objeto é definida como o Diâmetro de Feret Mínimo (Fmín) convertido a unidades métricas (RUSS, 1995).
- Compacidade (Comp): A Compacidade é expressa pela seguinte equação (RUSS, 1995):

$$Comp = \frac{\sqrt{\frac{4}{\pi}A}}{F_{m\acute{a}x}}$$

• Excentricidade (Exc): A Excentricidade é determinada pelos momentos de segunda ordem do objeto (GLASBEY & HORGAN, 1995).

$$Exc = \frac{(4\pi^2)(M_{2x} - M_{2y})^2 + 4M_{2xy}^2}{A^2}$$

Onde M_{2xy} é o momento de segunda ordem horizontal e vertical.

• *Robustez (Rob):* Este parâmetro é expresso pela seguinte equação (PONS et al., 1997):

$$Rob = \frac{2er_{obj}}{\sqrt{A}}$$

Onde er_{obj} é o número de erosões necessárias para apagar o objeto.

• *Circularidade (Circ):* Este parâmetro é expresso pela razão entre o *Comprimento (Fmáx)* e a *Largura (Fmín)*.

$$Circ = \frac{Fm\acute{a}x}{Fm\acute{n}}$$

• Diâmetro Equivalente (D_{eq}): O Diâmetro Equivalente de um objeto é expresso como o diâmetro do círculo de superfície igual à do objeto convertido a unidades métricas (RUSS, 1995):

$$D_{eq} = 2\sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

É importante assegurar que o programa detecte todos os tamanhos de células de maneira aleatória, sem a detecção preferencial. Quando nenhum erro sistemático está presente, a população de todas imagens analisadas segue uma distribuição Gaussiana (TRINDADE et al., 2008). Os dois parâmetros da distribuição gaussiana são a média e o desvio padrão, parâmetros de uma curva normal, uma vez que são suficientes para defini-la completamente. A média é o parâmetro de tendência central ou de posição, indicando em que ponto da reta real a curva está centrada; o desvio-padrão é o parâmetro de dispersão ou variabilidade, e informa sobre a forma, se mais larga ou estreita, da distribuição (CALLEGARI-JAQUES, 2008).

Após essa etapa os parâmetros morfológicos estimados foram registrados em formato xls.

4.7.6. Tratamento estatístico dos resultados

Os parâmetros morfológicos obtidos após o processamento e análise digital das imagens de FES foram analisados aplicando o *software* estatístico de análise de dados *Statistica 12 (StatSoft®)*. Os parâmetros morfológicos calculados através da análise digital de imagens foram tratados aplicando análise de variância univariada (ANOVA). Adicionalmente, o *software* foi utilizado para gerar histogramas dos parâmetros morfológicos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS PRELIMINARES

5.1.1. Avaliação macroscópica da FES

Com o objetivo de desenvolver técnicas para o acompanhamento de FES através da análise de imagens, o primeiro estudo proposto envolveu a avaliação de imagens macroscópicas da torta de macaúba fermentada utilizando uma lupa estereoscópica. Para esse experimento, fermentações foram conduzidas durante 24 horas, com retiradas em intervalos de três horas para a aquisição de imagens. Entretanto, após alguns experimentos verificou-se que a aquisição de imagens através da lupa não era efetiva.

As imagens obtidas desta maneira não se mostraram próprias para qualquer tratamento posterior. Os principais problemas encontrados estavam relacionados tanto à lupa em si, quanto às características do processo. Em relação à lupa, o primeiro problema encontrado foi a impossibilidade de padronização da iluminação, uma vez que a iluminação partia de luzes na extremidade de hastes flexíveis que se moviam constantemente. Além disso, o próprio mecanismo de iluminação era ineficiente e não permitia uma iluminação homogênea da superfície do leito sólido, produzindo áreas escuras e áreas muito brilhosas que dificultariam o processamento da imagem.

O segundo problema encontrado estava relacionado aos aumentos possíveis de serem trabalhados. Mesmo diante do menor aumento, que era de oito vezes, não foi possível tirar uma foto única que abrangesse todo o leito de fermentação. Foi necessário dividir o leito, que era circular, em quadrantes para se obter uma imagem da amostra por inteiro. Desta maneira, a natureza dimórfica da levedura não pôde ser contemplada através das imagens macroscópicas. A levedura Y. lipolytica mesmo tendo a capacidade de apresentar, sob certas circunstâncias, aspecto filamentoso. apresentou crescimento identificável não macroscopicamente. Observando-se as Figuras 5.1 e 5.2 é possível identificar apenas uma discreta camada recobrindo o substrato após 24 horas de fermentação, correspondente à biomassa da levedura.



Figura 5.1. Crescimento da *Y. lipolytica* em FES de torta de macaúba. Imagem obtida através de câmera digital comum.

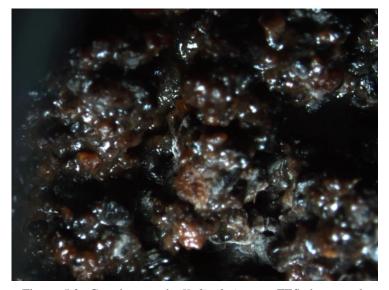


Figura 5.2. Crescimento da *Y. lipolytica* em FES de torta de macaúba. Imagem obtida por meio de lupa estereoscópica (aumento de 8x).

O processamento de imagens macroscópicas adquiridas com o auxílio de lupa em FES já foi descrito na literatura (COURI et al., 2006; DUTRA et al., 2008; DUAN et al., 2012). Nos estudos essa técnica foi utilizada para extrair informações úteis e monitorar a biomassa microbiana nos processos fermentativos. O êxito alcançado por esses autores na

utilização de imagens macroscópicas deveu-se a utilização de fungos filamentosos, que apresentaram um crescimento fácil de ser detectado mesmo a olho nu. As espécies de fungos filamentosos utilizadas apresentaram micélios facilmente diferenciáveis do meio de fermentação, de modo que o processamento de imagens utilizado por eles permitiu o reconhecimento da biomassa microbiana.

5.1.2. Avaliação microscópica da FES

5.1.2.1. Aquisição e processamento de imagens de FES

Amostras da FES foram então acompanhadas através do microscópio. As amostras foram processadas de maneira a evitar a presença de resíduos nas imagens, mesmo assim em algumas delas foi possível notar a existência de células aderidas não só às gotículas de óleo, como também às partículas da matéria-prima (Figura 5.3). As imagens serviram para reforçar mais uma vez o que já é citado na literatura, a forte interação micro-organismo/substrato durante o processo de fermentação em estado sólido, além da afinidade desta levedura por substratos hidrofóbicos (CHEN, 2013; AMARAL et al., 2006).

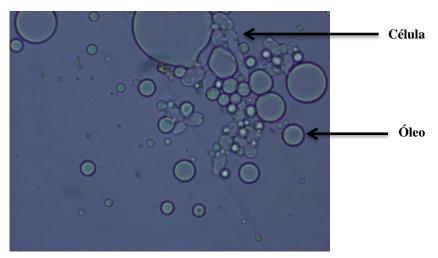


Figura 5.3. Células de *Y. lipolytica* envoltas por micelas de óleo após 3 horas de fermentação (aumento de 1000x).

Devido à dificuldade no processamento das imagens adquiridas na FES, muitas delas tiveram que passar por uma etapa de pré-processamento, que consistiu no realce manual das

bordas dos objetos (Figura 5.4). Essa etapa manual foi essencial pois sem ela a binarização das imagens seria inviabilizada (Figura 5.5).



Figura 5.4. Processamento de imagem da FES com a etapa de pré-processamento. Em A: imagem original; B: objetos com realce manual das bordas; C: imagem binarizada.

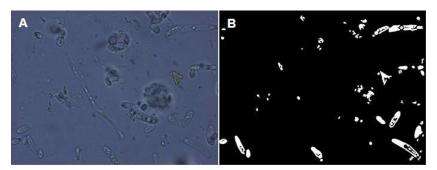


Figura 5.5. Processamento de imagem da FES sem a etapa de préprocessamento. Em A: imagem original; B: imagem binarizada.

5.1.3. Acompanhamento da morfologia de *Y. lipolytica* em diferentes sistemas de produção através do processamento e análise de imagens

A levedura *Yarrowia lipolytica*, como já mencionado anteriormente, é capaz de sofrer uma transição da morfologia de levedura para a filamentosa dependendo das condições de cultivo. Para avaliar as diferentes morfologias apresentadas pela levedura, dois tipos de fermentação foram conduzidos e monitorados através de imagens (fermentação em estado sólido e fermentação em submerso).

5.1.3.1. Avaliação do pré-inóculo quanto à morfologia da levedura Y. lipolytica

Para ambas as fermentações o preparo do pré-inóculo seguiu a mesma elaboração, e o mesmo foi avaliado através de imagens visando a confirmação de que não haveria

diferenças entre as culturas. No chamado "tempo zero", a morfologia leveduriforme foi dominante para todos os pré-inóculos (Figura 5.6). Vale ressaltar que os pré-inóculos foram cultivados em submerso utilizando um meio rico em nitrogênio e carbono.

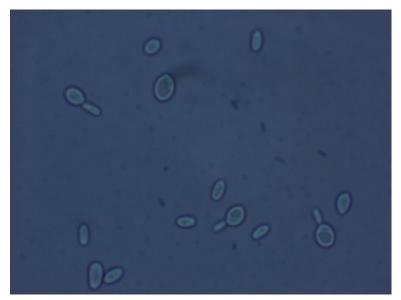


Figura 5.6. Imagem ilustrativa das células presentes nos préinóculos (72 horas de cultivo em meio YPD) (aumento de 1000x).

A rotina utilizada para a análise das imagens é capaz de gerar histogramas de diferentes parâmetros a partir das imagens binarizadas, incluindo circularidade e diâmetro médio. O histograma é a representação gráfica de uma distribuição de frequências, as quais são representadas pelas áreas de retângulos verticais adjacentes que mostram quantos pontos do conjunto de dados estão em cada intervalo (GILAT, 2006).

O parâmetro *Circularidade* é calculado através da razão entre os valores do eixo máximo ($F_{m\acute{a}x}$) e do eixo mínimo ($F_{m\acute{n}n}$), mensurado para cada objeto obtido na imagem. Isso significa dizer que quanto mais circular for o objeto, mais próximo de 1 (um) será esta razão. Nos estudos preliminares esse parâmetro foi considerado como o mais relevante para a avaliação das mudanças morfológicas da levedura Y. lipolytica, uma vez que a distribuição das circularidades médias permitiu identificar aumentos no comprimento dos objetos, neste caso o processo de formação de hifas. O programa utilizado faz a distribuição das circularidades médias em 40 diferentes classes (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Classes de circularidades/diâmetros médios com seus respectivos valores.

Classes	Circularidade/	Classes	Circularidade/	Classes	Circularidade/
	Diâmetro		Diâmetro		Diâmetro
0-5	< 0,5	17	1,6 - < 1,7	29	2,8 - < 2,9
6	0,5 - < 0,6	18	1,7 - < 1,8	30	2,9 - < 3,0
7	0,6 - < 0,7	19	1,8 - < 1,9	31	3,0 - < 3,1
8	0,7 - < 0,8	20	1,9 - < 2,0	32	3,1 - < 3,2
9	0,8 - < 0,9	21	2,0 - < 2,1	33	3,2 - < 3,3
10	0,9 - < 1,0	22	2,1 - < 2,2	34	3,3 - < 3,4
11	1,0 - < 1,1	23	2,2 - < 2,3	35	3,4 - < 3,5
12	1,1 - < 1,2	24	2,3 - < 2,4	36	3,5 - < 3,6
13	1,2 - < 1,3	25	2,4 - < 2,5	37	3,6 - < 3,7
14	1,3 - < 1,4	26	2,5 - < 2,6	38	3,7 - < 3,8
15	1,4 - < 1,5	27	2,6 - < 2,7	39	3,8 - < 3,9
16	1,5 - < 1,6	28	2,7 - < 2,8	40	> 4,0

O histograma das circularidades médias dos pré-inóculos foi utilizado para avaliar a similaridade entre as populações iniciais usadas em cada sistema de cultivo (Figura 5.7). Nos histogramas o eixo vertical representa a quantidade de objetos em porcentagem e o eixo horizontal representa a distribuição nas 40 classes. Como é possível verificar, o perfil dos dois pré-inóculos é similar, estando a maior parte das células entre os grupos 11 e 25, que representam as circularidades que variam entre 1 e 1,5, totalizando 93 % para o inóculo da FES e 92 % para o da FS. Tal informação de circularidade reforça ainda mais o estado morfológico do micro-organismo, indicando a presença de células ovais, morfologia leveduriforme típica da estirpe *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 quando cultivada em meio rico. Pode-se dizer que ambas as populações são morfologicamente "idênticas" quando do início do processo fermentativo.

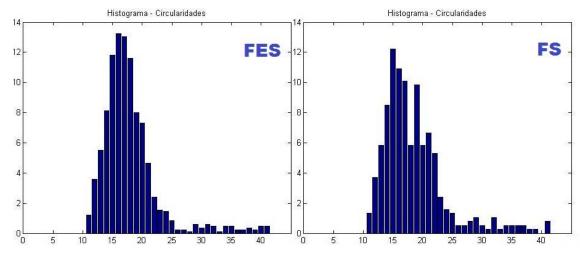


Figura 5.7. Histogramas da distribuição das circularidades médias dos pré inóculos da fermentação em estado sólido de torta de macaúba e da fermentação submersa (FS). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição das circularidades médias.

A distribuição dos diâmetros médios das células no tempo zero (Figura 5.8) também seguiu o mesmo perfil. Nos dois pré-inóculos, o diâmetro médio foi de aproximadamente 5 µm (dados calculados e fornecidos pelo programa, através de correlação entre os *pixels* medidos e as distâncias relativas em um micrometro). A avaliação dos pré-inóculos foi necessária para confirmação de que qualquer alteração posterior na morfologia da levedura seria devido ao sistema de cultivo no qual o mesmo foi empregado, sem nenhuma influência do estado morfológico inicial do micro-organismo.

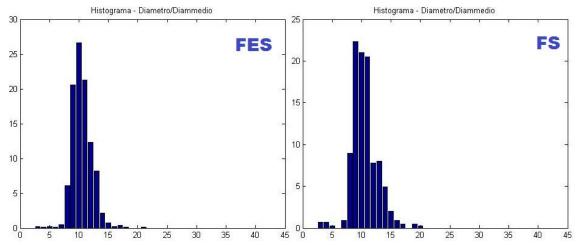


Figura 5.8. Histogramas da distribuição dos diâmetros médios dos pré inóculos da fermentação em estado sólido de torta de macaúba e da fermentação submersa (FS). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição dos diâmetros médios.

5.1.3.2. Avaliação dos sistemas de cultivo quanto à morfologia da levedura Y. lipolytica

O acompanhamento das fermentações submersa e em estado sólido através de imagens possibilitou uma melhor visualização do comportamento da levedura *Y. lipolytica* em relação a sua morfologia. Durante as 48 horas de fermentação submersa, a levedura não apresentou em nenhum momento mudanças na sua morfologia. Durante todo o processo, a morfologia se manteve equiparável à morfologia do pré-inóculo, com células leveduriformes, o que não aconteceu durante as 48 horas da fermentação em estado sólido. Na a FES, a levedura comprovou o seu comportamento dimórfico, passando a formar extensas hifas, que puderam ser confirmadas através da análise das suas circularidades médias (Figura 5.9).

Devido à forte tendência do micro-organismo em desenvolver característica filamentosa, formando hifas e pseudo-hifas dos mais diversos comprimentos, o desvio padrão intrínseco é muito grande para cada tempo analisado. Com o progresso da fermentação, as células passaram a aumentar cada vez mais o seu comprimento médio, o que proporcionou um aumento no desvio padrão de tal maneira que no tempo 48 horas o mesmo chegou a corresponder a 65 % do valor da média.

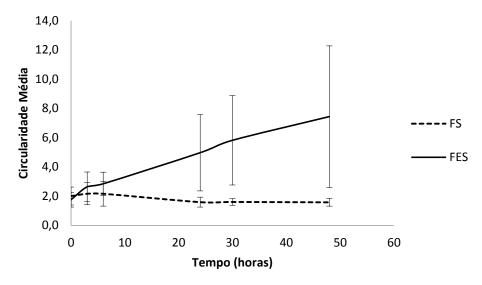


Figura 5.9. Distribuição das circularidades médias nos diferentes tempos de fermentação (submersa e em estado sólido).

Pode-se perceber que esse desvio padrão está relacionado ao comprimento dos filamentos durante a FES, uma vez que ao se observar o desenvolvimento da FS, onde não ocorre alteração na morfologia, os desvios padrão são consideravelmente menores.

No que concerne à distribuição dos diâmetros, pode ser observado na Figura 5.10 que com o progresso da FS os diâmetros médios se mantiveram quase sem variação dentro da faixa de 5 μm. Para a FES, o comportamento foi similar, entretanto nas primeiras 6 horas ocorreu um aumento significativo do diâmetro médio, de aproximadamente 34% do valor inicial. Após esse aumento abrupto, os diâmetros médios passaram a se manter sem grandes variações dentro da faixa de 7 μm. Essa mudança no diâmetro médio nas 6 primeiras horas está provavelmente ligada à transição morfológica do micro-organismo, que muda de células ovóides para células filamentosas. Sabe-se que o processo de mudança morfológica consiste basicamente em uma alteração drástica no padrão de biossíntese da parede celular, tendo como principal consequência o aumento constante na concentração de vesículas que carregam enzimas biossintéticas (HURTADO; RACHUBINSKI, 2002). Desta maneira, toda a preparação celular necessária para transição morfológica pode ter acarretado primeiramente no aumento no diâmetro da célula.

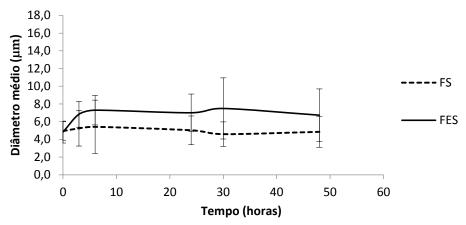


Figura 5.10. Distribuição dos diâmetros médios nos diferentes tempos.

Comparando-se as Figuras 5.9 e 5.10, pode-se perceber que o aumento na circularidade média das células aconteceu principalmente a partir das 6 horas de fermentação, de maneira aparentemente complementar ao aumento no diâmetro médio nas 6 primeiras horas. Apesar de esses resultados serem promissores no que tange o estudo do dimorfismo de

Y. lipolytica utilizando a técnica de análise de imagens, outros experimentos serão necessários para investigar essa relação mais profundamente e obter resultados definitivos.

No contexto geral, a circularidade foi o parâmetro mais importante para a identificação da transição morfológica por parte da espécie *Y. lipolytica*. Os histogramas gerados pelo programa demonstraram ser de grande auxílio para uma visualização rápida do comportamento do micro-organismo quando empregado em um processo fermentativo.

Ao se observar a evolução dos histogramas em diferentes tempos, tanto para FS quanto para FES, pode-se confirmar as mudanças na morfologia da levedura. É possível perceber que ao longo do curso da FS (Figura 5.11) ocorre uma variação nas circularidades médias até 6 horas de processo. Essas variações estão identificadas pelas diferentes classes listadas no eixo horizontal, enquanto a porcentagem de células em cada classe está listada no eixo vertical. Para uma melhor compreensão dos histogramas é necessário saber que quanto maior for a numeração da classe, maior são as circularidades médias das células nela contidas.

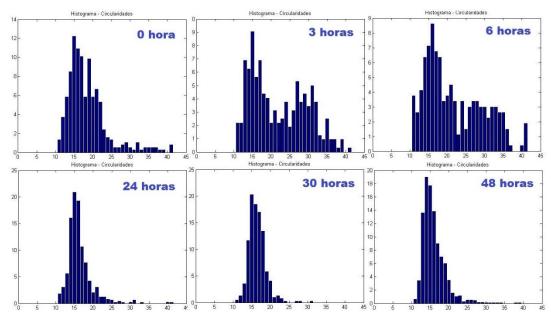


Figura 5.11. Histogramas da distribuição das circularidades médias em diferentes tempos da fermentação submersa (FS). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição das circularidades médias.

O aumento na circularidade média durante a FS, facilmente observado em 3 horas e 6 horas de fermentação, é decorrente do processo de divisão e crescimento celular. Muito provavelmente nesses tempos estão contabilizadas células germinadas, que no processo de

binarização e quantificação acabam sendo interpretadas como uma única célula (Figura 5.12). Esse fato é corroborado ao se analisar os tempos subsequentes, onde a partir das 24 horas de fermentação já não se pode identificar a presença de células nas classes que identificam as maiores circularidades, estando concentradas entre os grupos 10 e 20, que indicam circularidades médias entre 1,0 e 2,0. Isso significa dizer que em tal ponto as células que antes se encontravam germinadas já se destacaram das células-mãe e, nesse momento, se encontram como células individuais.

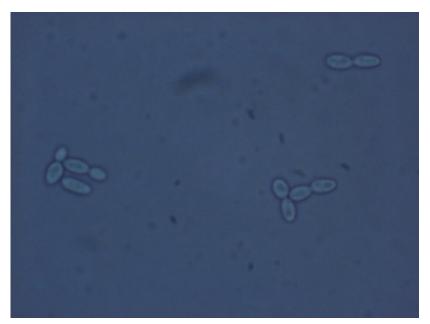


Figura 5.12. Células de *Y. lipolytica* em 6 horas de fermentação submersa (aumento de 1000x).

Conforme mostra a Figura 5.13, o perfil dos histogramas da FES difere muito do perfil dos histogramas da FS, com exceção do tempo 0 horas. Na FES, a partir da terceira hora do processo já é possível identificar a existência de células em classes crescentes de circularidade.

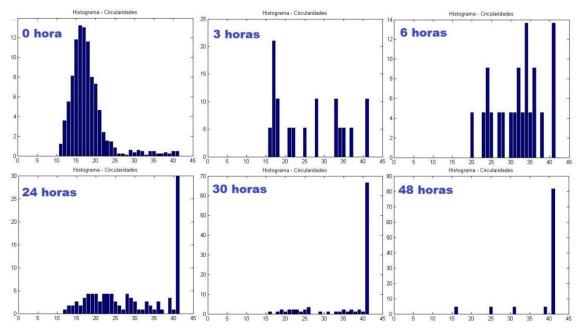


Figura 5.13. Histogramas da distribuição das circularidades médias em diferentes tempos da Fermentação em estado sólido (FES). Eixo vertical: porcentagem de objetos; Eixo horizontal: classes de distribuição das circularidades médias.

Assim como na FS, esse resultado também é influenciado pela existência de células germinadas, principalmente nas primeiras horas (Figura 5.14). Entretanto, como já foi mencionado, na FES a levedura *Y. lipolytica* experimenta mudanças na sua morfologia, passando a apresentar aspecto filamentoso (Figura 5.15), e essa característica pode ser visualizada no histograma.



Figura 5.14. Células de *Y. lipolytica* após 6 horas de fermentação em estado sólido (aumento de 1000x).



Figura 5.15. Células de *Y. lipolytica* após 24 horas de fermentação em estado sólido (aumento de 1000x).

É notável que com o decorrer do processo as células vão aumentando a sua circularidade média, de maneira tal que ao final das 48 horas de processo quase 90 % das células estão localizadas na classe 40, que agrupa células com circularidade maior do que 4. As células que se encontram em classes de menor circularidade correspondem às células individuais jovens, que ao final da FES já se encontram em menores proporções.

Os resultados preliminares demonstraram o potencial da utilização de técnicas de processamento e análise de imagens no monitoramento de processos fermentativos. Entretanto, a necessidade de aprimoramento da rotina para o processamento foi imperativa. Além das dificuldades inerentes à fermentação em estado sólido, a rotina utilizada mostrou-se limitada no que diz respeito ao reconhecimento automático de objetos contidos nas imagens. A capacidade de reconhecimento e segmentação correta foi praticamente nula para as células mais alongadas, forçando a uma delimitação manual de objetos que tornou o processo laborioso, fato que levou ao desenvolvimento de nova metodologia conforme os resultados descritos a seguir nesse trabalho.

5.2. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA MONITORAÇÃO DE FES POR PDI

Visando a melhoria do processo de monitoração por PDI, uma nova metodologia foi desenvolvida. Modificações foram realizadas desde o processo de aquisição de amostras de FES, tratamento das amostras para aquisição de imagens e rotina para o processamento e análise das imagens, como estão descritas a seguir:

5.2.1. Aquisição de amostras de FES

Inicialmente alíquotas eram retiradas dos biorreatores de maneira aleatória (triplicata) e diluídas em 1 mL de solução fisiológica utilizando *eppendorf*. Essa suspensão de sólidos e células passava então por um ciclo de centrifugação, conforme descrito nos Materiais e Métodos. Ao fim da centrifugação, a amostra ficava dividida em três fases visíveis: partículas grandes, partículas pequenas e sobrenadante (Figura 5.16).



Figura 5.16. Resultado da centrifugação da amostra de FES.

Verificou-se que, após a centrifugação, as células da levedura ficavam retidas na região intermediária, junto com as partículas menores. Dessa maneira o sobrenadante era descartado. Com o auxílio de uma espátula, a região contendo as células era transferida para outro *eppendorf* e ressuspensa em solução fisiológica, para então serem preparadas as lâminas para a aquisição de imagens. Este processo, no entanto, não era suficiente para a aquisição de imagens livres de resíduos. As partículas mais finas acabavam sendo carregadas junto com as

células, dificultando o processamento posterior das imagens adquiridas, uma vez que no processo de segmentação esses resíduos acabavam sendo reconhecidos como objetos de interesse.

Visando amostras com menos resíduos, foram realizadas centrifugações seriadas. As alíquotas da FES foram diluídas em solução fisiológica e centrifugadas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a região contendo células e sólidos leves foi transferida para outro *eppendorf* contendo solução fisiológica. Esse processo foi repetido por mais duas vezes para que então as amostras da etapa de aquisição de imagens fossem adquiridas. As centrifugações seriadas proporcionaram imagens mais limpas, porém com baixa concentração celular. A diminuição na quantidade de células já era esperada, uma vez que a cada transferência para um novo *eppendorf* células acabavam sendo perdidas junto com o resíduo descartado.

A solução encontrada foi utilizar todo o resíduo fermentado no processo de centrifugação. Entretanto, como parte da pesquisa dedica-se também à produção de lipase, o processo para obtenção de amostra para aquisição de imagens teve de ser unido ao processo de extração enzimática. Desta maneira as amostras passaram a ser obtidas após a etapa de centrifugação do processo de extração enzimática. O protocolo original para extração enzimática teve que ser modificado no que tange a centrifugação, que após alguns testes passou de 3.000 rpm por 5 minutos para 8.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante (extrato enzimático) era reservado para estudos de atividade, restando a fase sólida da FES, que assim como nos experimentos com *eppendorfs*, ficou visivelmente dividida em duas fases (Figura 5.17).

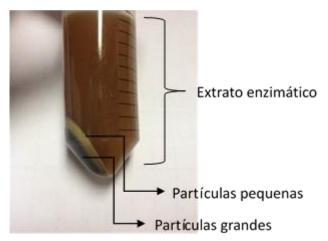


Figura 5.17. Amostra de FES após o processo de extração enzimática.

Após verter o extrato enzimático para outro frasco, a região contendo as partículas leves foi transferido com o auxílio de uma espátula (aproximadamente 0,4 g) para um tubo *Falcon* contendo 10 mL de solução fisiológica. Após a homogeneização dessa suspensão, alíquotas foram retiradas para a aquisição de imagens (Figura 5.18).

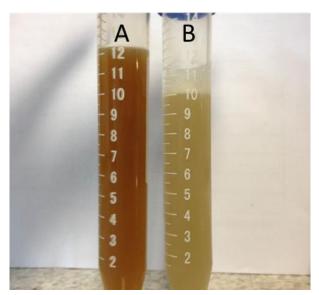


Figura 5.18. Separação das amostras: ${\bf A}$ - Extrato enzimático; ${\bf B}$ - Suspensão de células.

5.2.2. Preparação das amostras para visualização em microscópio

5.2.2.1. Utilização de corantes

Nos estudos preliminares, as amostras de FES eram visualizadas no microscópio com os objetos (células) desfocados, para então terem as imagens adquiridas. Esse desfoque dado aos objetos nas imagens era necessário para o realce das bordas dos mesmos, que por sua vez era necessário para o processamento posterior das imagens. Como já foi discutido, mesmo com esse procedimento de desfocagem, o processamento das imagens nem sempre era efetivo, principalmente quando as células da levedura se tornavam filamentosas.

Buscando uma solução para esse problema, estudou-se o emprego de corantes que pudessem aumentar o contraste dos objetos contidos nas imagens. Corantes indicadores de viabilidade celular também foram avaliados nesse estudo. Primeiramente foi realizado um levantamento dos corantes possíveis de serem aplicados nas amostras, tendo sido escolhidos os corantes azul de metileno, safranina, alaranjado de acridina e FUN-1. Ressalta-se que os dois primeiros corantes foram utilizados em microscopia de campo claro e os dois últimos em microscopia de fluorescência.

• Azul de metileno:

O corante azul de metileno, muito utilizado em estudos de viabilidade celular, foi logo descartado como opção de corante. Esse corante se liga apenas às células metabolicamente inativas e por esse motivo não serviu para fins de contraste, uma vez que as células presentes nas amostras se encontravam todas viáveis.

• Safranina:

A safranina, bastante utilizada no método de coloração de Gram, demonstrou grande potencial para fins de contraste. Quando foi adicionada às suspensões de células de *Y. lipolytica*, a safranina foi capaz de corar as células por completo, realçando os limites das mesmas. Para efeitos de processamento de imagens a utilização da safranina se mostrou bastante promissora (Figura 5.19).

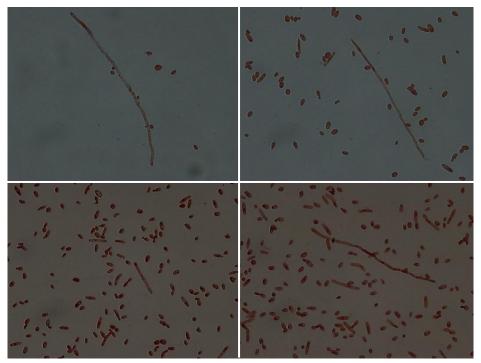


Figura 5.19. Amostras de células de *Y. lipolytica* coradas por safranina (Aumento de 40x).

• Alaranjado de acridina:

O alaranjado de acridina é descrito na literatura como um corante que estima a viabilidade celular através das fluorescências em laranja/vermelho ou em verde/amarelo. Quando as moléculas do corante se ligam à cadeia de RNA (ácido ribonucleico), presente em grande quantidade nas células em fase de crescimento exponencial, as células apresentam a fluorescência laranja/vermelha. Já quando o corante se liga ao DNA (ácido desoxirribonucleico), predominante em células mortas ou com baixa taxa reprodutiva, as células fluorescem em verde/amarelo (BELO, 2000).

Nos nossos estudos, o alaranjado de acridina foi capaz de corar todas as células de *Y. lipolytica* presentes nas amostras. Entretanto, o resultado final obtido nas imagens acabou por eliminá-lo como opção. Quando esse corante foi aplicado nas amostras de *Y. lipolytica*, a distribuição de células possivelmente viáveis ou não-viáveis não seguiu o padrão de cores esperado (Figuras 5.20 e 5.21).

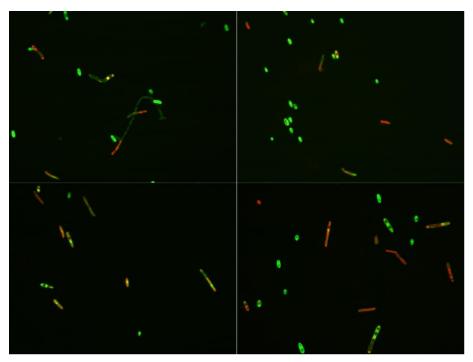


Figura 5.20. Amostras de células de *Y. lipolytica* após 24 horas de FES coradas por alaranjado de acridina (Aumento de 40x).

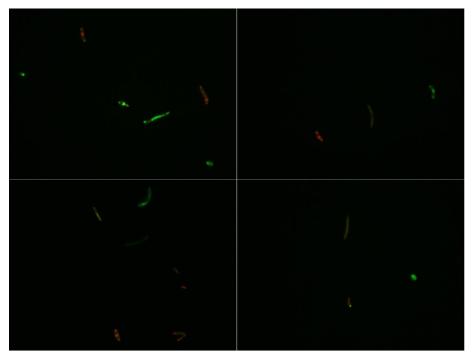


Figura 5.21. Amostras de células de *Y. lipolytica* após 96 horas de FES coradas por alaranjado de acridina (Aumento de 40x).

Como pode ser observado, as células não se distribuíram de maneira bem definida entre vermelhas/laranjas e verdes/amarelas. Na verdade, mesmo em amostras com células viáveis, a presença de células coradas em verde foi notável, principalmente nas primeiras 24 horas de fermentação. Poucas células ficaram completamente coradas em vermelho, na maior parte delas as extremidades se coraram em verde e apenas regiões internas se coraram em vermelho. Essas variações no padrão de cores apresentado pelas células claramente não seriam interessantes para as futuras etapas de processamento, e por esse motivo a utilização o alaranjado de acridina foi descartada.

• FUN-1:

O corante FUN-1 permitiu a aquisição de imagens interessantes no que concerne a viabilidade das células de *Y. lipolytica* (Figura 5.22).

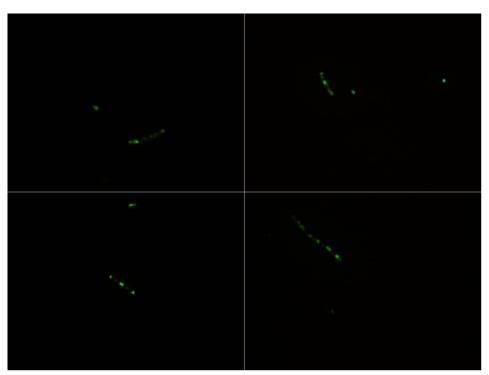


Figura 5.22. Amostras de células de *Y.lipolytica* após 96 h de FES coradas por FUN-1 (Aumento de 40x).

O corante FUN-1 é permeável à membrana celular, fluindo livremente para o interior das células. Inicialmente, no citoplasma, se mostra na cor verde brilhante. Em células fúngicas metabolicamente ativas, o FUN-1 é convertido em estruturas intravacuolares cilíndricas

(CIVS) que coram na cor vermelho/laranja ás custas de ATP (Adenosina trifosfato), enquanto as estruturas intracelulares continuam coradas em verde. Quando as células não estão metabolicamente ativas exibem apenas a fluorescência verde-amarelada de maneira difusa (MILLARD et al., 1997). Esse fato pode ser confirmado observando-se as imagens adquiridas, onde as células da levedura apresentaram estruturas internas coradas em vermelho, comprovando a viabilidade das mesmas.

Apesar do resultado positivo para a estimativa de viabilidade celular, o corante FUN1 não se mostrou viável para a etapa de processamento de imagens. Isso porque a fluorescência em vermelho das CIVS tem uma excitação muito curta, apagando rapidamente da imagem. Essas estruturas são a única comprovação da viabilidade das células, e nem sempre é possível captá-las nas imagens devido à excitação rápida.

Desta maneira, diante dos fatos expostos, a safranina foi o corante escolhido para auxiliar no processo de aquisição das imagens.

5.2.3. Desenvolvimento da nova rotina para o processamento de imagens de FES

Após as modificações realizadas nas metodologias de aquisição e preparo das amostras de FES, a etapa seguinte tratou do desenvolvimento de uma nova rotina para o processamento digital de imagens. Nessa etapa crucial do estudo, buscou-se aliar as modificações já realizadas nas metodologias às necessidades existentes no processamento de imagens de FES. A seguir está descrito o programa *LEV_HIFAS*, desenvolvido em ambiente MATLAB, em conjunto com pesquisadores do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho e do Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Politécnico de Coimbra – Portugal.

5.2.3.1. Interface do programa *LEV_HIFAS*

Trata-se de um programa desenvolvido para permitir a utilização das sub-rotinas de maneira automática ou semiautomática, dando ao operador a liberdade de escolha de alguns parâmetros. O menu principal tem 4 opções: Imagem, Avanço, Tratamento e Parâmetros.

Inicialmente, na opção "Parâmetros", é possível fazer a determinação do nível de *Threshold* e da largura dos objetos, no caso as células de *Yarrowia lipolytica*, permitindo ao operador adequar esses parâmetros à realidade dos objetos contidos nas imagens a cada utilização (Figura 5.23).

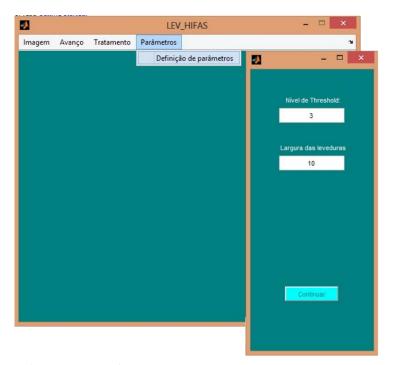


Figura 5.23. Interface do programa na opção Parâmetros.

A opção "Tratamento" é subdividida em 4 itens (Figura 5.24):

- Tipo de tratamento: Essa opção permite a escolha entre a sub-rotina de binarização de imagens (opção "Binarizar") e a sub-rotina de separação manual de objetos contidos nas imagens (opção "Segmentar"). Essa segunda sub-rotina é opcional e só pode ser utilizada em imagens binárias. Ela foi desenvolvida para possibilitar a separação de objetos que não tenham sido separados corretamente no processo de binarização;
- Eliminação de objetos na fronteira: Permite a escolha de se eliminar ou não os objetos que estejam próximos à borda da imagem;
- Eliminação manual de objetos: Quando na sub-rotina "segmentar", essa opção possibilita a eliminação manual de objetos que não devessem estar na imagem binazarizada (como resíduos, por exemplo);

• Tipo de segmentação: Permite a escolha da segmentação manual ou automática.

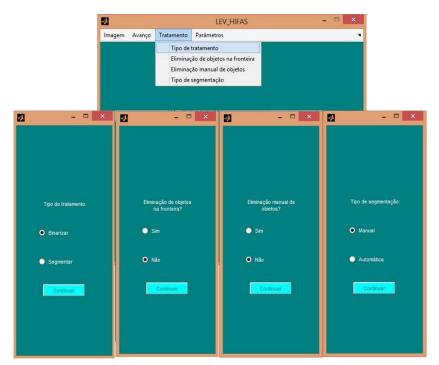


Figura 5.24. Interface do programa na opção Tratamento.

A opção "Avanço" possibilita a escolha do processamento de imagens em série ou uma a uma. Por último, a opção "Imagem" dá início à sub-rotina previamente escolhida.

5.2.3.2. Processamento de imagens com o programa LEV_HIFAS

O programa *LEV_HIFAS*, como mencionado anteriormente, permite a aplicação de duas sub-rotinas no processamento de imagens. Com a primeira sub-rotina obtêm-se as imagens binárias, já com a segunda sub-rotina essas imagens podem ser aperfeiçoadas. Um esquema representativo da rotina desenvolvida para o processamento de imagens está demonstrado na Figura a seguir (Figura 5.25).

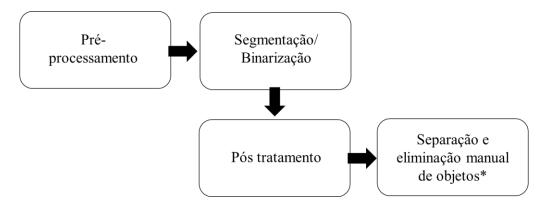


Figura 5.25. Esquematização das principais etapas do processamento de imagens (*Opcional).

A etapa de pré-processamento envolve a conversão da imagem colorida para escala de cinza (8 bit), utilizando por base o valor mínimo de cada um dos canais (*RGB – Red, Green, Blue*).

Na etapa de segmentação o fundo da imagem é subtraído de modo a destacar os objetos de interesse. A seleção do campo de interesse da imagem é realizada aplicando-se técnicas baseadas em limites de cinza, onde a imagem é segmentada a partir de um valor ótimo de *Threshold* (que pode ser modificado pelo utilizador). Essa segmentação é efetuada tendo-se por base uma função a partir de um valor predefinido e a média entre o valor da mediana, abaixo e acima de 50 % dos *pixels* no histograma. Os *pixels* abaixo do valor dessa função são reconhecidos como representando a fronteira das leveduras, e os *pixels* com valores acima são reconhecidos como fundo da imagem. Ao fim dessa etapa obtêm-se imagens binarizadas.

Na etapa de pós-tratamento ocorre a aplicação de filtros morfológicos, que visam a melhora da imagem binária. O programa é capaz de eliminar objetos que se encontrem na fronteira da imagem binária, caso seja de interesse do utilizador. Nesta etapa são aplicadas operações morfológicas de abertura e fechamento, alternando-se filtros de erosão e dilatação com o mesmo elemento estruturante. Em seguida ocorre o enchimento de zonas interiores das células e a eliminação de resíduos (*debris*) distinguidos dos objetos de interesse pelo tamanho. Finalmente é efetuada uma separação básica dos objetos em contato através de uma metodologia baseada na largura das hifas individuais (previamente definida pelo utilizador).

A quarta e última etapa, opcional ao utilizador, permite uma melhor separação dos objetos em contato a partir das imagens finais do pós-tratamento, seja por uma metodologia automática ou por uma metodologia manual. Na metodologia automática utiliza-se uma separação por *watershed* baseada na largura das hifas individuais; na metodologia manual, o utilizador seleciona as zonas de separação entre hifas a serem inseridas na imagem. Essa etapa também permite a eliminação manual de objetos considerados como detritos. A Figura 5.26 exemplifica as principais etapas do processamento de imagens no programa *LEV_HIFAS*.

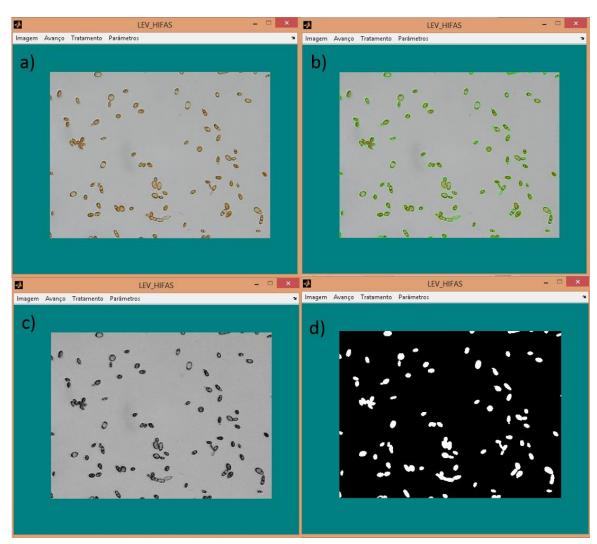


Figura 5.26. Imagens resultantes do procedimento de processamento de imagens: a) Amostra de células de *Yarrowia lipolytica*; b) Reconhecimento automático dos objetos contidos na imagem; c) Conversão da imagem colorida para a escala de cinza; d) Imagem binarizada.

5.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

Após o desenvolvimento dos métodos para o preparo das amostras de FES e do programa para o processamento de imagens, seguiu-se para aplicação dos mesmos. As fermentações foram conduzidas em triplicata, utilizando o resíduo de macaúba, e acompanhadas por 72 horas, com pontos a cada 24 horas.

5.3.1. Preparo das amostras

Como descrito anteriormente, para a visualização em microscópio as amostras de FES foram separadas a partir do processo de extração enzimática. Para cada amostra, uma alíquota de 0,5 mL da suspensão celular foi transferida para um *eppendorf*, onde foi adicionado 0,5 mL do corante safranina. Após alguns minutos, 0,5 mL de uma solução fisiológica contendo 1% de Triton-80 foi adicionado à amostra. Após a homogeneização da amostra, as imagens foram adquiridas, totalizando aproximadamente 150 imagens por amostra (divididas em duas lâminas).

5.3.2. Aquisição e processamento de imagens de FES

A metodologia desenvolvida para o processamento de imagens de FES, além de ter possibilitado a integração entre as metodologias de extração enzimática e aquisição de imagens, propiciou também a obtenção de imagens mais limpas e objetos mais destacados. Graças às mudanças na metodologia e ao programa *LEV_HIFAS* as imagens puderam ser binarizadas de modo rápido e automático (Figura 5.27).



Figura 5.27. Representação do processo automático de binarização, nas imagens células de *Y. lipolytica* após 72 de FES.

5.3.3. Análise de imagens de FES

Buscando avaliar os resultados obtidos das fermentações por meio do processamento e análise de imagens desenvolvidos, os parâmetros *Comprimento* e *Largura* foram escolhidos para análise estatística (*LS-means*), para identificar correlações entre as réplicas no decorrer das 72 horas de processo. Esses parâmetros foram inicialmente escolhidos por serem os mais adequados para caracterizar o provável comportamento dimórfico da levedura quando empregada em FES.

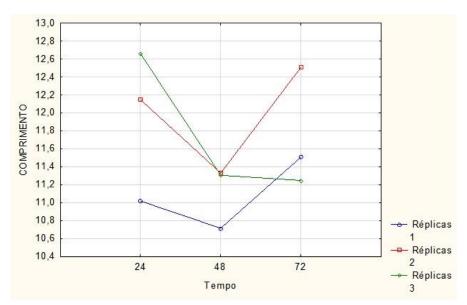


Figura 5.28. Avaliação das triplicatas utilizando a variação do parâmetro *Comprimento* (µm) nos tempos (horas) 24, 48 e 72.

Observando-se a Figura 5.28 é possível perceber o comportamento semelhante das réplicas entre 24 e 48 horas de processo, quando ocorre uma diminuição no comprimento médio da levedura. De maneira oposta, com exceção da réplica 3, entre 48 e 72 horas o comprimento médio aumenta, atingindo valores acima daqueles encontrados no tempo de 24 horas. É importante salientar que cada réplica é uma fermentação distinta, o que justifica as diferenças encontradas entre os comprimentos médios das mesmas para cada tempo avaliado. Ressalta-se que o valor máximo obtido foi de 12,7 µm e o menor para o mesmo tempo de análise foi 11 µm, expressando uma variação de apenas 13%.

A maior variação do comprimento médio entre 24 e 48 horas foi de aproximadamente 1,2 μm (réplica 3), seguida por uma variação de 0,8 μm (réplica 2) e 0,3 μm (réplica 1). Já entre 48 e 72 horas, a réplica 3 manteve o comprimento médio praticamente estável, enquanto as réplicas 2 e 1 apresentaram aumento no comprimento médio de aproximadamente 1,1 μm e 0,8 μm, respectivamente. A diferença apresentada pela réplica 3 entre 48 e 72 horas pode ser interpretada como um erro de amostragem.

A diminuição do comprimento médio entre 24 e 48 horas pode ter sido motivado pelo processo de divisão celular da levedura. Durante a divisão por brotamento as células mãe e filha podem permanecer um tempo aderidas até a separação completa em células individuais, e essas células germinadas ao serem processadas acabam sendo interpretadas como uma única célula. No ponto de 48 horas, as células que antes estavam ligadas, já se encontram como células individuais, levando a uma falsa impressão de que as células da levedura "diminuíram".

A elevação ocorrida no comprimento médio entre 48 e 72 horas (com exceção da réplica 3) pode tanto ser interpretada como o aumento de células com brotamento, como também como células que realmente se encontram mais alongadas devido a formação de pseudo-hifas. De qualquer maneira, observando-se o ponto de 48 horas, onde o comprimento médio teve os valores mais baixos, a menor média (aproximadamente 10,7 μm - réplica 1) pode ser considerada elevada no caso da existência de apenas células individuais, o que nos leva a conclusão da presença de células alongadas dentro das populações estudadas. Isso porque, nas condições oferecidas pela FES aqui estudada, as células de *Y. lipolytica* quando no formato leveduriforme apresentaram comprimentos entre 2 μm e 4 μm (Figura 5.29).



Figura 5.29. Imagem das células de *Y. lipolytica* em FES de torta de macaúba no ponto de 48 horas. À direita: Imagem original; À esquerda: Imagem binarizada.

A Figura 5.29 exemplifica a existência de células individuais leveduriformes e hifadas numa mesma amostra. Na imagem em questão 47 objetos (células) foram analisados, dos quais o menor comprimento verificado foi 3,04 μm e o maior foi 59,86 μm.

O estudo das médias é importante para se ter uma visão geral do comportamento das réplicas em relação ao tempo, mas não oferece a noção real dos variados comprimentos das células de levedura encontrados durante a FES. Desta maneira foram elaborados histogramas para cada tempo do processo.

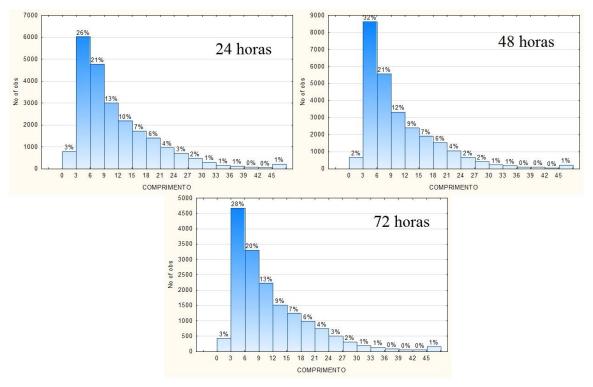


Figura 5.30. Histogramas de distribuição dos comprimentos nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: comprimento em µm; Eixo vertical: número de observações (objetos).

Avaliando-se os histogramas de comprimento podemos verificar a heterogeneidade das células presentes nas amostras. A primeira faixa, que caracteriza principalmente as células leveduriformes (comprimento até 3 μ m), variou entre 3 % e 2 %. Na faixa de 3 a 12 μ m, as somas das percentagens foram 60 %, 65 % e 61 % (24, 48 e 72 horas, respectivamente). Na faixa de 12 a 24 μ m, as somas das percentagens foram 26 %, 27 % e 26 % (24, 48 e 72 horas, respectivamente). Na faixa entre 24 e acima de 45 μ m a soma das percentagens foram 9 %, 7

% e 8 % (24, 48 e 72 horas, respectivamente). É importante ressaltar que a percentagem nula (0 %) em determinadas faixas não significa a ausência de células nestas faixas.

Apesar de, aparentemente, não ter variações significativas nas percentagens de cada faixa de comprimento no decorrer das 72 horas, a população total (objetos processados) de cada tempo foi diferente, como pode ser observado no eixo vertical de cada gráfico da Figura 5.30. Considerando as réplicas em cada tempo estudado, o total de objetos analisados foi: 24 horas – 22.948 objetos; 48 horas – 27.021 objetos; 72 horas – 16.586 objetos. Não se pode afirmar uma causa exata para as diferenças encontradas no total de objetos analisados no decorrer das 72 horas, mas sabendo que o total de imagens analisadas foi semelhante, podemos inferir tratar-se de diferenças na concentração celular nas amostras processadas.

Conforme foi escrito anteriormente, o parâmetro *Largura* é igualmente importante quando se estuda possíveis mudanças morfológicas nas células *de Y. lipolytica*. A Figura 5.31 mostra o comportamento das triplicatas em relação a este parâmetro no decorrer das 72 horas de fermentação.

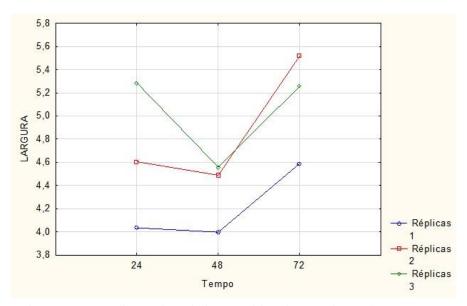


Figura 5.31. Avaliação das triplicatas utilizando a variação do parâmetro *Largura* (µm) nos tempos (horas) 24, 48 e 72.

É possível verificar que o comportamento do parâmetro *Largura* no decorrer do processo fermentativo seguiu uma tendência semelhante do parâmetro *Comprimento* (Figura 5.28). Entre os tempos 24 e 48 horas há uma diminuição acentuada na largura média da

réplica 3, enquanto que a diminuição nas réplicas 1 e 2 foi discreta, quase nula. Entre 48 e 72 horas, as três réplicas experimentaram aumento na largura média que, com exceção da réplica 3, atingiu valores superiores àqueles encontrados no tempo de 24 horas. Este fato reforça a ideia de que entre 24 e 48 horas as células provavelmente encontrar-se-iam em fase de divisão celular onde o comprimento muda, mas a largura de cada célula individual é mantida.

Observando-se o parâmetro *Comprimento* (Figura 5.28) verificamos que entre 48 horas e 72 horas as réplicas 2 e 1, respectivamente, tiveram o maior aumento, enquanto a réplica três manteve-se praticamente estável. O comportamento em relação ao parâmetro *Largura* foi diferente, os maiores aumentos médios foram, respectivamente, das réplicas 2, 3 e 1. Com exceção da réplica três, verifica-se que a variação do comprimento das células foi acompanhada da variação na largura nos três tempos estudados. Significa dizer que as células de *Y. lipolytica* durante a FES não só se alongaram, característica do seu comportamento dimórfico, como também ficaram mais robustas (Figura 5.32), provavelmente por conta das mudanças morfológicas que exigem mais da maquinaria celular (HURTADO; RACHUBINSKI, 2002).



Figura 5.32. Imagens de células de Y. lipolytica em FES de torta de macaúba no tempo de 72 horas.

A Figura 5.33 traz os histogramas de distribuição das larguras nos diferentes tempos estudados.

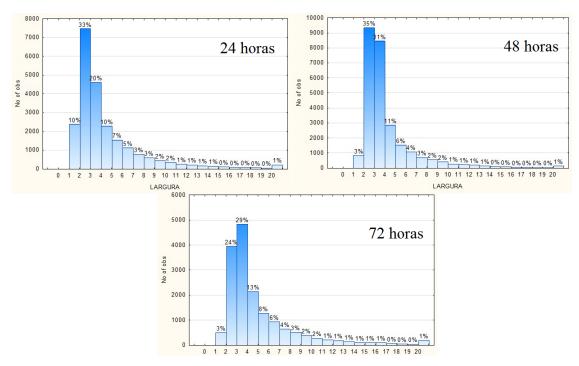


Figura 5.33 Histogramas de distribuição das larguras nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: larguras em µm; Eixo vertical: número de observações (objetos).

Analisando os histogramas do parâmetro *Largura* é possível observar uma tendência ao aumento no decorrer das 72 horas. No tempo de 24 horas 10 % da população analisada está na faixa de 1 – 2 μm, decaindo para 3 % nos tempos de 48 horas e 72 horas. A soma das percentagens de faixas entre 2 – 6 μm é de 70 % no tempo de 24 horas, aumentando para 83 % no tempo de 48 horas. No tempo de 72 horas a soma das percentagens entre faixas entre 2 – 6 μm diminui para 74 % devido ao aumento das percentagens nas faixas de maior largura. Desta maneira, podemos perceber que, embora os histogramas do parâmetro *Comprimento* não nos tenha permitido visualizar uma tendência exata devido à heterogeneidade existente entre as células, os histogramas do parâmetro *Largura* possibilitaram a visualização de uma população que tende a aumentar de largura no decorrer das 72 horas de processo.

O parâmetro *Circularidade*, dado pela razão entre os parâmetros *Comprimento* e *Largura*, também foi analisado por meio de histogramas (Figura 5.34).

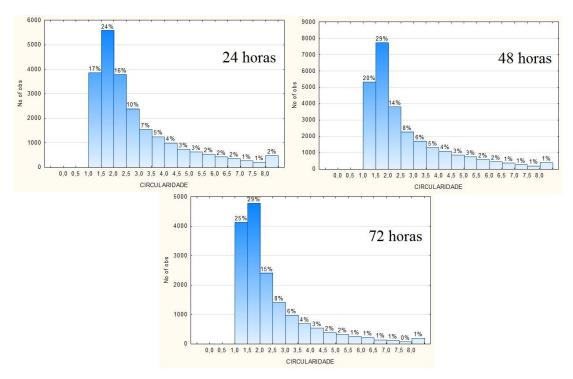


Figura 5.34 Histogramas de distribuição das circularidades nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: circularidades; Eixo vertical: número de observações (objetos).

A morfologia comum de célula de levedura, tipo ovóide, tem uma circularidade próxima de 1,0 (um). Se considerarmos uma célula de levedura passando por transição na sua morfologia, assumindo característica filamentosa, espera-se um aumento crescente na circularidade. Observando-se os histogramas pode-se verificar que no decorrer das 72 horas de processo há uma diminuição da população dentro das classes de maior circularidade. Ao considerar, por exemplo, a soma das percentagens das circularidades acima de 5,0, verifica-se uma queda gradual de 13 % (24 horas), para 11 % (48 horas), terminando em 7 % (72 horas).

Embora a diminuição da circularidade sugira que exista uma diminuição de células mais compridas (filamentosas), essa resposta pode ser decorrente do que foi observado nos histogramas do parâmetro Largura. A Figura 5.33 mostra a tendência ao aumento da largura das células no decorrer das 72 horas de processo, que levaria a diminuição das circularidades uma vez que a razão $F_{máx}/F_{mín}$ se tornaria cada vez menor. Desta maneira, verificamos a importância da análise de diversos parâmetros ao se estudar e avaliar mudanças morfológicas em biocatalisadores durante um processo fermentativo.

Dando continuidade à avaliação de parâmetros morfológicos, a Figura 5.35 traz os histogramas do parâmetro $Diâmetro\ Equivalente\ (D_{eq})$.

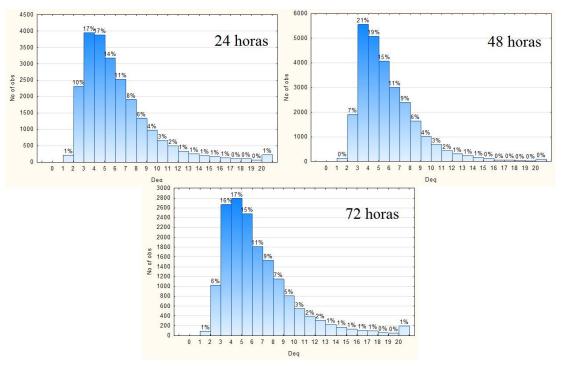


Figura 5.35 Histogramas de distribuição dos D*eq* nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: diâmetro equivalente (μm); Eixo vertical: número de observações (objetos).

A análise dos histogramas de distribuição dos diâmetros equivalentes, em função da área do micro-organismo, confirma a heterogeneidade da população analisada. Adicionalmente é possível perceber que, assim como os outros parâmetros, o diâmetro equivalente segue uma distribuição gaussiana, indicando a ausência de erro sistemático durante a análise das imagens. Neste tipo de distribuição, o desvio-padrão é o parâmetro de dispersão e pode ser verificado observando-se a forma da curva, se mais larga ou estreita (CALLEGARI-JAQUES, 2008).

Pode-se observar na Figura 5.35 uma distribuição mais larga, resultado de um desvio padrão alto que implica diretamente na diversidade de tamanhos encontrados nas amostras analisadas durante as 72 horas de fermentação. É fato que, mesmo durante a transição morfológica para forma de hifas ou pseudo-hifas, células leveduriformes coexistem com células filamentosas durante todo o processo fermentativo (Figura 5.36).

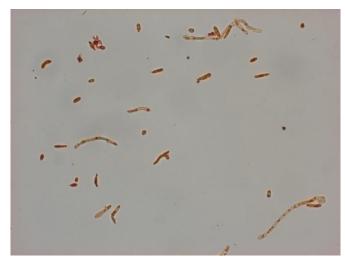


Figura 5.36. Imagem de células de *Y. lipolytica* em FES de torta de macaúba no tempo de 48 horas.

A imagem acima exemplifica a variedade de tamanhos celulares encontrada em amostras de FES. De acordo com o processamento realizado, a célula nesta imagem com maior área tem $263,69~\mu\text{m}^2$, enquanto que a menor célula tem $3,50~\mu\text{m}^2$, 75~vezes menor.

O parâmetro excentricidade também pode caracterizar o comportamento dimórfico da levedura, estando relacionado ao alongamento da mesma (Figura 5.37).

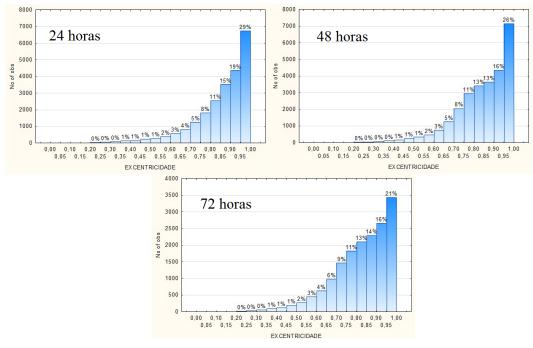


Figura 5.37. Histogramas de distribuição das excentricidades nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: excentricidade; Eixo vertical: número de observações (objetos).

Braga e colaboradores (2015), ao estudarem os efeitos da agitação na morfologia de uma estirpe de *Yarrowia lipolytica*, classificaram como pouco alongadas células com excentricidade média em torno de 0,68, e como alongadas células com excentricidade média em torno de 0,77 (excentricidade elevada). Observando a Figura 5.37 é possível constatar que, nos três tempos estudados, mais de 50 % da população se encontra com excentricidades acima de 0,8 confirmando a característica dimórfica da levedura quando empregada em FES. Como já foi mencionado, o dimorfismo apresentado por alguns micro-organismos é uma resposta fisiológica as condições de estresse, sendo um mecanismo adaptativo. No presente estudo podemos verificar que a FES, claramente, induz às células de *Yarrowia lipolytica* a uma condição de estresse, provavelmente devido a uma transferência de oxigênio limitada e a baixa atividade de água resultante das características da FES.

A análise do parâmetro *Robustez* (Figura 5.38) nos fornece informações acerca da regularidade da superfície celular da levedura, uma vez que leva em consideração a quantidade de erosões que foram necessárias para apagar o objeto durante o processamento da imagem.

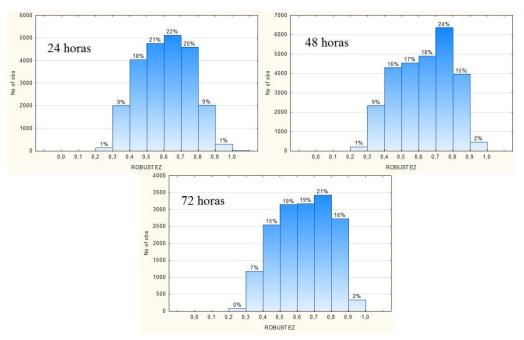


Figura 5.38. Histogramas de distribuição da robustez nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: robustez; Eixo vertical: número de observações (objetos).

Valores de robustez elevados (próximos de 1,0) indicam células mais regulares, com a superfície integra. Considerando o estudo realizado por Braga e colaboradores (2015), que classificaram como irregulares células com robustez abaixo de 0,70, observamos que no decorrer das 72 horas de processo pelo menos 50 % da população se encontra nas faixas < 0,7. Este resultado nos indica células irregulares, provavelmente mais frágeis, e pode estar diretamente relacionado à mudança morfológica da levedura.

O parâmetro *Compacidade* pode também ser indicativo da integridade da superfície celular. Assim como a *Robustez*, quanto mais próximo de 1,0, mais regular a superfície celular.

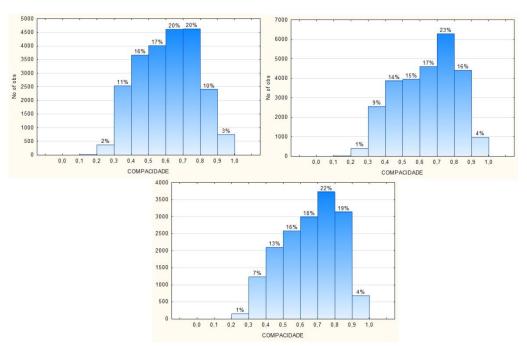


Figura 5.39. Histogramas de distribuição da compacidade nos diferentes tempos da FES. Eixo horizontal: compacidade; Eixo vertical: número de observações (objetos).

Analisando a Figura 5.39 confirmamos a presença de células irregulares nos três tempos estudados. Assim como os histogramas de robustez, pelo menos 50 % da população se encontra com a compacidade < 0,7. Pérez (2006), ao realizar o estudo morfológico de flocos em sistema de lodo ativado verificou a existência de uma correlação entre os parâmetros D_{eq} e *Compacidade*, comprovando que quanto maior os flocos mais irregulares eles eram. Desta maneira, podemos também inferir que a transição celular da levedura para a forma filamentosa, de alguma maneira, tornou as células mais irregulares.

As análises dos parâmetros morfológicos demostram o comportamento dimórfico da levedura durante a FES, que pode ser confirmado por meio do *Comprimento*, D_{eq} , Área e *Excentricidade*. O parâmetro *Largura* permite a visualização da robustez celular, que pode estar associada a modificações intracelulares sinalizadas por um fator externo (estresse, por exemplo), ou até mesmo devido ao processo de divisão celular. A análise dos parâmetros *Robustez* e *Compacidade* classifica as células de acordo com a superfície celular, indicando a presença de células irregulares, como foi verificado em nossos experimentos.

5.4. PRODUÇÃO DE LIPASES ATRAVÉS DE FES UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS – Um caso estudo

5.4.1. Valorização de TPOMW através da produção de lipases por Y. lipolytica

O TPOMW é um resíduo da indústria de azeite, resultante do sistema de centrifugação de duas fases. Neste processo o resíduo gerado é composto da fase sólida (pasta de azeitonas) juntamente da fase líquida (água do fruto), fazendo com que o mesmo apresente alta umidade (aproximadamente 60 %), diminuindo o seu valor comercial. Este resíduo possui alta carga orgânica, além da presença de compostos fenólicos, e pode causar relevante impacto ambiental se não manejado adequadamente (MOREIRA, 2012). Em contrapartida, é um resíduo com quantidade significativa de óleo residual, tornando-o atraente para produção de lipases utilizando a levedura *Y. lipolytica*. Desta maneira, estudou-se a sua aplicação em FES como parte do estágio no laboratório de Bioprocessos e Biossistemas da Universidade do Minho (Braga – Portugal).

5.4.1.1. Composição do meio de FES

Estudos preliminares demonstraram que o resíduo TPOMW, quando utilizado como única fonte de carbono, não permitia o crescimento adequado da levedura (dados não apresentados). Esse resíduo possui características que dificultam a sua aplicação direta em bioprocessos, dentre elas está a alta concentração de compostos aromáticos, que são tóxicos para a células microbianas. Adicionalmente, esse resíduo possui partículas muito pequenas que o tornam viscoso, com pouca capacidade para absorção de água. Com uma baixa capacidade para suportar o mínimo de umidade, qualquer nível acima pode causar diminuição da porosidade, limitando a transferência de oxigênio e consequentemente o crescimento microbiano (MOFTAH et al., 2012).

Para contornar esse problema considerou-se a adição de um segundo resíduo cujas características fossem complementares às características do TPOMW, tendo sido o farelo de trigo o resíduo escolhido. Características como alta capacidade de retenção de água e níveis elevados de nitrogênio, além de ser um resíduo de fácil obtenção, asseguraram o potencial do farelo de trigo para aplicação em FES. A Tabela a seguir traz uma comparação ente as principais características dos dois resíduos (Tabela 5.1).

Tabela 5.2. Principais características dos resíduos TPOMW e farelo de trigo (Fontes: Jang et al., 2000; Palmarola-Adrados et al., 2005; Seguin et al., 2012; Salgado et al., 2013a-b).

Parâmetros	TPOMW	Farelo de trigo	
Umidade (%)	$75,31 \pm 0,14$	$20,0 \pm 3,4$	
C (%)	$51,66 \pm 1,54$	$54,3 \pm 4,2$	
N (%)	$0,86 \pm 0,19$	$2,6\pm0,3$	
C/N	60,06	17,3 - 24,9	
Fenóis Totais (mg/g)	$2,57 \pm 0,04$	-	
Proteínas (mg/g)	$0,30 \pm 0,03$	$15,3 \pm 0.8$	
Lipídios (mg/g)	$102,46 \pm 0,04$	0.3 ± 0.0	
Lignina (Klason) (g/100g)	$58,16 \pm 0,41$	5,0	
Celulose (g/100g)	$6,76 \pm 0,24$	$11,4 \pm 0,6$	

Estudou-se então a proporção ideal de cada resíduo para produção de lipases. Neste estudo uma solução de ureia foi utilizada como suplementação de nitrogênio (0,5 %), e as seguintes proporções entre os resíduos foram testadas (TPOMW:Farelo de trigo): 1:1, 3:1,1:3, em um total de 10 g de meio. As fermentações foram conduzidas por 96 horas e a avaliação da atividade de lipase foi realizada a cada 24 horas.

O meio com proporções iguais entre os resíduos foi o que proporcionou a melhor atividade de lipase, atingindo 94 U/g após 24 horas de processo fermentativo. O meio com a quantidade mínima de TPOMW também levou à melhor produção nas primeiras 24 horas, atingindo 15,5 U/g, enquanto o meio com a maior proporção de TPOMW teve a sua melhor produção apenas após 72 horas de fermentação, atingindo 30 U/g (Figura 5.40).

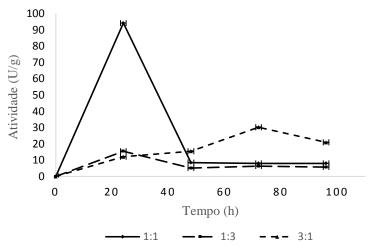


Figura 5.40. Atividade de lipase nas três diferentes proporções entre os resíduos (TPOMW:Farelo de trigo).

Este resultado demonstra como a produção de enzimas lipolíticas pode ser influenciada por substratos lipídicos. Mesmo com uma maior concentração de compostos fenólicos, o meio com 75 % de TPOMW teve uma produção maior, ainda que tardia, do que o meio com 25 % de TPOMW. Na literatura estão descritos vários elementos extracelulares que afetam a expressão de lipases, e dentre eles a fonte de carbono parece ser a mais crítica. A produção destas enzimas é normalmente estimulada pela presença de fontes lipídicas, tais como óleos vegetais (triacilglicerois), ácidos graxos livres, agentes tenso-ativos, sais biliares e glicerol (KEBABCI & CIHANGIR, 2012). Outrossim, a levedura *Y. lipolytica* é também conhecida por sua capacidade de metabolizar compostos aromáticos, como polifenóis por exemplo (LANCIOTTI et al., 2005).

O aumento no tempo requerido para se alcançar a maior produção de lipase no meio contendo 75 % de TPOMW deveu-se, provavelmente, à elevada relação carbono/nitrogênio. Sabe-se que as lipases produzidas por leveduras permanecem ligadas à parede celular, sendo secretadas somente quando a fonte de carbono se torna escassa, o que retarda a secreção de lipases em meios com uma relação C/N elevada (PEREIRA-MEIRELES et al., 2000). De modo semelhante, uma estirpe de *Yarrowia lipolytica* mostrou um atraso na transição para a fase estacionária quando cultivada em meio rico em ácido oleico. Enquanto o ácido oleico era abundante as lipases permaneceram ligadas às células, sendo secretadas no meio de cultura somente quando a concentração desse substrato diminuiu (FICKERS et al., 2004).

5.4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases

A fonte de nitrogênio, orgânica ou inorgânica, é de grande relevância na produção de lipases. Desempenhando papéis diferentes na síntese de enzimas, fontes orgânicas fornecem fatores de crescimento e aminoácidos às células, enquanto as fontes inorgânicas podem ser utilizadas rapidamente (ALMEIDA et al., 2012). Adicionalmente, a fonte de nitrogênio pode alterar o pH do meio, influenciando diretamente a morfologia celular da levedura *Y. lipolytica*, já tendo sido reportado uma máxima formação de hifas em pH perto da neutralidade, tornando-se mínima ou praticamente nula em pH igual a três (RUIZ-HERRERA & SENTANDREU, 2002).

Por este motivo, o efeito do sulfato de amônio na produção de lipase foi avaliado e comparado com a suplementação com ureia, normalmente utilizada na FES. De acordo com o experimento anterior, a proporção de 1:1 entre os resíduos foi a escolhida e os meios foram suplementados com soluções de ureia e sulfato de amônio separadamente (0,5 %). As fermentações foram conduzidas durante 96 horas, com pontos a cada 24 horas onde foram medidos a atividade de lipase e o pH.

Como pode ser observado, os meio suplementado com sulfato de amônio apresentou perfil de produção diferente quando comparados ao meio suplementado com ureia (Figura 5.41).

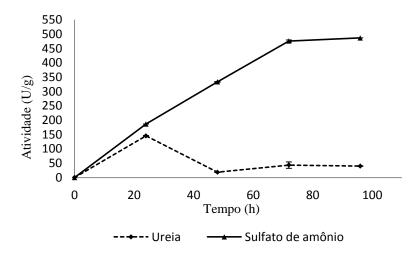


Figura 5.41. Influência da fonte de nitrogênio na produção de lipases.

A presença do sulfato de amônio não só propiciou um aumento na atividade de lipase, como também manteve os níveis elevados durante todo o processo, atingindo 476 U/g em 72 horas, chegando a 486 U/g ao fim das 96 horas de fermentação. Como esperado, a suplementação com ureia também teve influência positiva na produção de lipases, com produção máxima nas primeiras 24 horas. Entretanto, é possível observar que a atividade máxima no meio suplementado com ureia foi de 145 U/g, cerca de três vezes menor do que a atividade máxima obtida no meio suplementado com sulfato de amônio.

De acordo com diversos autores, compostos nitrogenados modulam a síntese da Lip2, sendo as fontes orgânicas as melhores para esse fim. Estudos destacam a utilização de compostos nitrogenados orgânicos na produção de lipases, contrastando com a utilização de compostos inorgânicos, que dificilmente têm o mesmo efeito positivo (PEREIRA-MEIRELES et al., 1997; FICKERS et al., 2004). Hidrolisados de caseína e ureia são exemplos de fontes nitrogenadas preferidas em estudos sobre a produção de lipases por *Y. lipolytica*, diferentemente do sulfato de amônio, que já teve descrito um efeito inibitório (CORZO & REVAH, 1999; TURKI et al., 2009; IMANDI et al., 2010).

Nossos resultados, contrariando outros estudos, mostrou o potencial do sulfato de amônio como suplementação na produção de lipases por *Y. lipolytica*. A combinação entre os resíduos e esta fonte de nitrogênio, de alguma maneira, favoreceu um incremento na produtividade do processo (Figura 5.42).

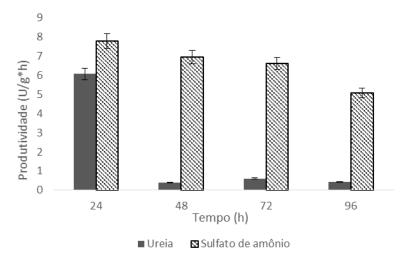


Figura 5.42. Produtividade nos diferentes tempos de processo fermentativo nos meios suplementados com ureia e sulfato de amônio.

As fermentações suplementadas com sulfato de amônio não só tiveram uma maior produção de lipase, quando comparadas às fermentações com ureia, como também apresentaram as maiores produtividades. Nas primeiras 24 horas a produtividade atingiu o seu maior valor, com 7,8 U/g*h, e mesmo após quatro dias de processo a produtividade diminuiu apenas 35 %. Este resultado promissor confirma o potencial do processo de FES desenvolvido, uma vez que a produtividade foi mais elevada do que grande parte das produtividades relatadas na literatura, como mostra a Tabela 5.2.

Embora as fontes de nitrogênio orgânicas sejam as mais utilizadas, a aplicação de fontes inorgânicas tem sido cada vez mais estimulada, principalmente por serem fontes de baixo custo e por facilitarem os processos posteriores de purificação enzimática. Yu e colaboradores (2013) investigaram o impacto do íon amônio (NH₄⁺) na produção de lipases por *Pichia pastoris*, e os resultados obtidos demonstraram o efeito positivo deste íon. O estudo utilizou o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, a fim de manter a concentração do íon NH₄⁺ constante em três níveis, 400 mmol/L, 440 mmol/L e 500 mmol/L. A maior atividade de lipase foi obtida no meio com a concentração de 440 mmol/L, tendo sido 71% maior do que a atividade obtida no sistema de controle, onde a concentração do íon não foi mantida constante. Além disso, segundo os autores, a presença do íon NH₄⁺ no processo fermentativo também inibiu a produção de proteases. Este fato pode explicar a manutenção da atividade da lipase ao longo das 96 horas em nossos experimentos quando o sulfato de amônio foi utilizado.

Tabela 5.3. Comparação entre o pico de atividade lipolítica e produtividade de diferentes microorganismos produtores de lipase.

Micro- organismo	Matéria-prima	Máxima atividade lipolítica*	Produtividade	Referências
Y. lipolytica	Torta de semente de niger	26,42 U/g ^A	0,28 U/g*h	IMANDI et al., 2010
Candida utilis	Torta de azeitona	25 U/g ^A	0,26 U/g*h	MOFTAH et al., 2012

Trichoderma harzianum	Bagaço de cana e Torta de mamona	4,04 U/g ^A	0,042 U/g*h	CORADI et al., 2012
Rhizopus oryzae	Bagaço de cana	215,16 U/g ^A	2,98 U/g*h	VASEGHI et al., 2013
Aspergillus ibericus	TPOMW	18,67 U/g $^{\rm B}$	0,155 U/g*h	SALGADO et al., 2013b
Y. lipolytica IMUFRJ 50682	TPOMW e	$486~\mathrm{U/g}^{\mathrm{C}}$	7,8 U/g*h	Este trabalho
	farelo de trigo			

^{*}Todas as atividades aqui apresentadas foram medidas pelo método espectrofotométrico. Substratos utilizados: A – *p*-nitrofenil palmitato; B - *p*-nitrofenil butirato; C - *p*-nitrofenil laurato

Kebabci e Cihangir (2012) estudaram a produção de lipases por três estirpes de *Y. lipolytica*, avaliando a influência de diferentes fontes de nitrogênio (caseína, ureia, sulfato de amônio, oxalato de amônio, nitrato de amônio e carbonato de amônio) em meios contendo ou não óleo de oliva. Os pesquisadores observaram que os compostos de amônio eram os melhores para esse fim. De acordo com eles, quando o sulfato de amônio foi empregado no meio contendo óleo de oliva o pH ficou levemente baixo e a produção de lipases atingiu seu maior nível.

No estudo aqui reportado, o pH também foi acompanhado. De maneira semelhante, o pH no meio contendo sulfato de amônio variou dentro da faixa ácida, entre 5,5-5,9. Já o pH no meio suplementado com ureia variou entre 7,0-7,8 (Figura 5.43).

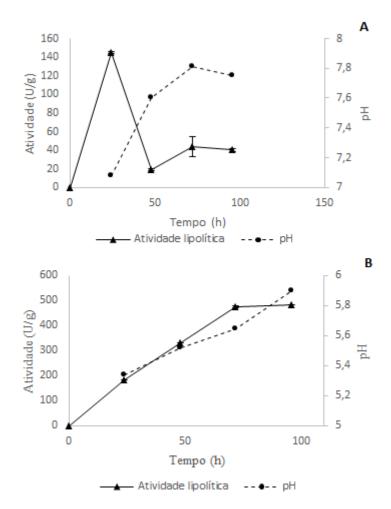


Figura 5.43. Atividade *versus* pH. A: Suplementação com ureia; **B**: Suplementação com sulfato de amônio.

O pH ótimo para a Lip2, a principal lipase de *Y. lipolytica*, é relatado na literatura como ligeiramente ácido, embora isso dependa do substrato e das condições experimentais (FICKERS et al., 2011). De acordo com Dominguez e colaboradores (2003), o pH baixo nesses casos pode ser atribuído à liberação de ácidos graxos devido a ação de lipases. Já o aumento no pH durante um processo é normalmente atribuído à liberação de aminoácidos devido à ação de proteases (RIGO et al., 2010).

A levedura *Y. lipolytica* pode produzir grandes quantidades de enzimas proteolíticas, dentre elas as proteases alcalinas (AEP) e ácida (AXP) são as mais comuns. As proteases alcalinas, no entanto, são as principais proteases secretadas, atingindo vários gramas por litro em condições otimizadas (NICAUD et al., 2002). A secreção desta enzima pode ocorrer paralelamente à secreção da lipase, sendo induzida em pH neutro/básico.

Embora neste trabalho a produção de proteases não tenha sido acompanhada, o pH verificado em nossos experimentos pode fornecer informações sobre as fermentações. Najjar e colaboradores (2011) demonstraram que, independentemente do meio de cultivo, a atividade da lipase sempre diminuía na fase tardia do processo, quando o pH se tornava alcalino, sugerindo uma degradação proteolítica pela AEP. De forma semelhante, nossos resultados mostraram que, quando em pH neutro/básico, a atividade da lipase atingiu o seu valor mais baixo.

O maior aumento no pH (7,0-7,6), observado nos meios suplementados com ureia, foi seguido de uma queda acentuada na atividade da lipase (Figura 5.43-A). Já nos meios suplementados com sulfato de amônio, onde a atividade da lipase atingiu os maiores níveis, o pH se encontrava levemente ácido, fora da faixa ótima para a AEP (Figura 5.43-B). Sabe-se que a produção de proteases é rigorosamente controlada por uma combinação de estímulos ambientais, que incluem a disponibilidade de nutrientes como carbono, nitrogênio. A presença de compostos como íons de amônio e aminoácidos, assim como a presença de enxofre podem promover um efeito repressor sobre a produção de AEP e AXP (YOUNG et al., 1996; GONZALEZ-LOPEZ et al., 2002).

A estirpe de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 mostrou um grande potencial para a produção de lipases em FES, agregando valor a um resíduo que é normalmente considerado um problema ambiental, o TPOMW. A utilização conjunta do TPOMW e o farelo de trigo ofereceu as melhores condições para FES, principalmente quando usadas proporções iguais dos resíduos. Além disso, a suplementação com uma fonte de nitrogênio mineral propiciou o aumento significativo na atividade da lipase, atingindo o patamar de 486 U/g após 96 horas de FES. O uso do sulfato de amônio também aumentou produtividade do processo, mantendo-a elevada até o fim das 96 horas, diferentemente dos meios com ureia que tiveram os menores valores de atividade e produtividade.

5.4.2. Valorização de torta de macaúba através da produção de lipases por Y. lipolytica

Estudos prévios realizados por Farias (2014) determinaram as melhores condições para a produção de lipases através da FES utilizando a torta da polpa de macaúba. Segundo o estudo realizado, a ureia foi a única fonte de nitrogênio que apresentou significância

estatística dentre todas as fontes testadas (ureia, peptona e extrato de levedura). Entretanto, como o sulfato de amônio não foi contemplado nesses estudos e diante do incremento significativo na produção obtido na FES de TPOMW quando o mesmo foi utilizado, essa fonte de nitrogênio mineral foi testada e comparada aos resultados obtidos com ureia.

Em um segundo momento, o processo de extração enzimática foi avaliado. Nos estudos prévios realizados por Farias (2014) apenas o tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) era adicionado à torta fermentada para a extração da enzima, diferentemente dos estudos com TPOMW onde houve também a adição de 1 % de NaCl e 0,5 % de Triton-X100 (MOREIRA, 2012). Desta maneira, estudou-se a influência da adição destes dois componentes juntamente com o tampão no processo de extração.

5.4.2.1. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases em meio contendo torta de macaúba

A atividade enzimática foi acompanhada durante 96 horas de processo em fermentações contendo suplementação de ureia (0,5 %) ou sulfato de amônio (0,5 %). Como pode ser observado na Figura 5.44, não houve diferença significativa na atividade da lipase nas primeiras 24 horas, quando os meios suplementados com ureia e os meios suplementados com sulfato de amônio apresentaram as maiores atividades. O pico de atividade nas primeiras 24 horas de processo está de acordo com os estudos prévios (FARIAS, 2014).

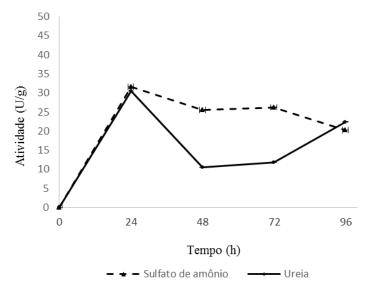


Figura 5.44. Atividades de lipase em FES de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia.

Dados na literatura demonstram que a produção das enzimas extracelulares está associada ao crescimento microbiano, uma vez que as mesmas são necessárias para a disponibilização dos nutrientes que são assimilados pelos micro-organismos. Segundo Amaral (2007), a principal lipase produzida pela estirpe de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizada neste trabalho, tem seu pico de produção durante a fase de desaceleração do crescimento celular, ou seja, em um intervalo entre as fases exponencial e estacionária que acontece dentro das primeiras 24 horas de processo (mais precisamente em 20 horas de processo).

Apesar do estudo realizado por Amaral (2007) ter utilizado um processo fermentativo em submerso, o mesmo perfil para a produção de lipases foi encontrado para a fermentação em estado sólido. No estudo realizado por Farias (2014) foi possível verificar que o ponto máximo de atividade lipolítica para as fermentações conduzidas com a torta da polpa de macaúba acontecia na fase exponencial do crescimento da levedura, estando a produção enzimática associada ao crescimento. O estudo incluiu a análise da biomassa pelo método indireto da N-acetil-glicosamina, que alcançou 0,27 mg de N-acetil-glicosamina/g de torta (Figura 5.45).

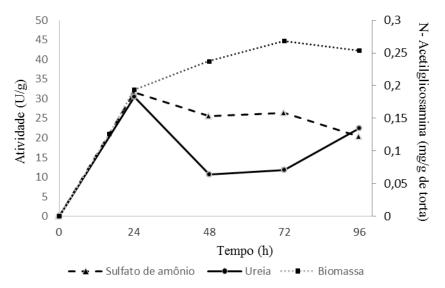


Figura 5.45. Dados da quantificação de biomassa em FES de torta da polpa de macaúba (FARIAS, 2014) e atividades de lipase com as diferentes suplementações de nitrogênio.

Uma vez que a maior produção enzimática foi semelhante para as duas fontes de nitrogênio, a escolha da melhor suplementação baseou-se na avaliação das produtividades (Figura 5.46).

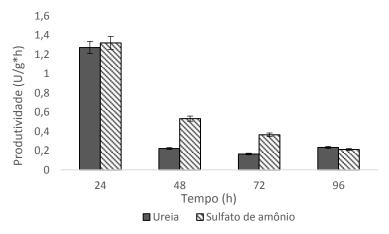


Figura 5.46. Produtividade nos diferentes tempos de FES de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio

A produção de lipase nos meios suplementados com sulfato de amônio manteve-se superior durante quase todo o processo fermentativo, quando comparado à produção nos meios suplementados com ureia, o que impactou diretamente a produtividade. É possível verificar que, com exceção do ponto de 96 horas, a produtividade com sulfato de amônio foi superior à produtividade com ureia, chegando a ser mais do que o dobro nos tempos 48 e 72 horas de processo. Uma melhor produtividade ao longo do processo fermentativo, associada ao baixo custo dessa fonte de nitrogênio reforçam a utilização do sulfato de amônio em FES para a produção de lipases, tendo sido o escolhido para a etapa seguinte.

5.4.2.2. Avaliação do melhor processo de extração

Como mencionado anteriormente, nos estudos realizados por Farias (2014) o processo de extração enzimática era realizado através da adição de tampão fosfato de potássio ao meio fermentado, seguido de agitação em *shaker*. Já a metodologia utilizada para extração enzimática nos trabalhos realizados com os resíduos TPOMW e farelo de trigo previa também a adição de 1 % de NaCl e 0,5 % de Tritron-X100.

Existem diversos estudos na literatura que reportam a utilização de detergentes no processo de extração enzimática (RODRIGUEZ et al., 2006; SALGADO et al., 2013b; VASEGHI et al., 2013; VEERABHADRAPPA et al., 2013), e por este motivo a influência do Triton-X100 na recuperação das enzimas lipolíticas dos meios fermentados de torta de macaúba foi estudada. O estudo compreendeu a avaliação da atividade da enzima lipase nas fermentações extraídas das três seguintes maneiras:

- Apenas com tampão;
- Tampão adicionado de 1 % de NaCl e 0,5 % de Triton-X100;
- Tampão adicionado de 1 % de NaCl e 1% de Triton-X100.

Devido ao conhecimento prévio da produção de lipases pela levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, que nas condições estudadas atinge seu máximo dentro das primeiras 24 horas, nesta etapa apenas esse ponto foi avaliado (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Avaliação de diferentes extrações para recuperação de lipases.

Extrações	Atividade da lipase (U/g)
Tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7.0)	22,3±1,10
Tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7.0) + 0,5 % Triton–X100 + 1 % NaCl	118,1±4,99
Tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7.0) + 1 % Triton–X100 + 1 % NaCl	11,8±0,74

Observando os resultados obtidos é possível perceber o efeito positivo da adição de Triton quando na concentração de 0,5 %, que aumentou a recuperação das enzimas e quintuplicou a atividade da lipase do meio. A produtividade no tempo de 24 horas passou de aproximadamente 0,93 U/g*h para 4,9 U/g*h. De modo oposto, a utilização de Triton na concentração de 1 % teve uma influência negativa no processo de extração, reduzindo a atividade para quase a metade quando comparada com a extração utilizando apenas tampão.

Edwinoliver e colaboradores (2010), em seus estudos para recuperação de lipases, verificaram que o NaCl (1 %) propiciava uma ótima recuperação da enzima, e quando o mesmo foi combinado com Triton—X100 (0,5 %) o incremento na atividade foi ainda maior. Segundo os autores, o aumento na atividade deveu-se provavelmente à ação do surfactante, que pode ter aumentado a permeabilidade das células, resultando em uma melhor recuperação das enzimas. Ainda de acordo com os estudos de Najjar e colaboradores (2011), a solução de NaCl possibilita a recuperação de lipases, provavelmente residuais não-ligadas a células, enquanto que a utilização de surfactantes como o Triton-X100 potencializa a liberação de lipases ligadas a células, favorecendo a recuperação máxima de atividade enzimática.

Surfactantes são frequentemente utilizados em ensaios envolvendo lipases, seja na preparação de emulsões ou na caracterização e purificação enzimática. Esses compostos tensoativos facilitam o acesso dos substratos às enzimas, reduzem a tensão interfacial óleo-água, onde ocorrem as reações catalíticas, além de prevenirem a agregação das enzimas, fatores que influenciam no aumento da atividade lipolítica. Contudo, a utilização de surfactantes também pode potencialmente causar a desnaturação da enzima, desestruturando a sua estrutura terciária (BUSSAMARA et al., 2010), o que pode explicar a queda na atividade quando o Triton foi utilizado na concentração de 1 %. Assim, o processo de extração utilizando tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) adicionado de 1 % de NaCl e 0,5 % de Triton-X100 foi escolhido para uma avaliação da cinética da FES, abrangendo 96 horas de processo, utilizando o sulfato de amônio como suplementação de nitrogênio.

5.4.2.3. Produção de lipases em FES a partir da torta da polpa de macaúba

Durante os estudos da produção de lipases, um novo lote de resíduo de polpa e casca de macaúba passou a ser utilizado. Os estudos conduzidos anteriormente haviam mostrado o potencial do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, entretanto, a chegada do novo lote de torta de macaúba fez com que as suplementações de nitrogênio fossem reavaliadas. Isso porque, já em uma primeira análise, era possível verificar diferenças visuais entre os resíduos novo e antigo.

A avaliação da produção de lipases com o novo lote surpreendeu ao apresentar resultados bem diferentes dos adquiridos com o resíduo antigo. As produtividades ficaram

aquém do que era esperado para as duas fontes de nitrogênio, assim como o perfil de produção se modificou (Figura 5.47). O pico de produção de lipases deixou de acontecer nas primeiras 24 horas de processo, passando para as últimas horas tanto nas fermentações com ureia quanto nas fermentações com sulfato de amônio.

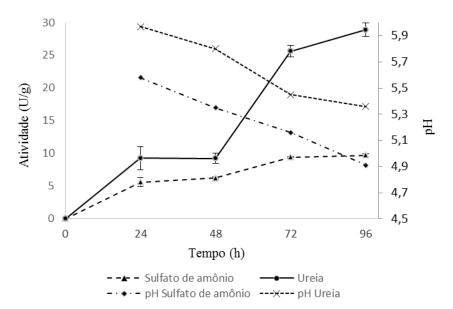


Figura 5.47. Atividades de lipase em FES versus pH do novo lote de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia.

Como o gráfico acima mostra, a maior atividade de lipase nas fermentações com sulfato de amônio só ocorreu após 72 horas de processo, ficando praticamente estável até as 96 horas. Já a maior atividade nas fermentações suplementadas com ureia só foi obtida em 96 horas de processo. Pode-se observar que a FES com ureia atingiu uma produção de quase 30 U/g, enquanto que a produção máxima de lipase com sulfato de amônio ficou abaixo de 10 U/g. Ao observar a variação do pH nas fermentações é possível perceber que tanto nos meios suplementados com ureia quanto nos meios suplementados com sulfato de amônio o pH ficou mais ácido no decorrer das 96 horas de processo.

O meio suplementado com sulfato de amônio alcançou níveis mais baixos de pH, chegando a atingir 4,9 em 96 horas. Já o pH nos meios suplementados com ureia o pH mais baixo foi 5,36, em 96 horas. Estudos realizados por Farias (2014) mostraram uma variação de pH entre 5 e 9 durante a produção de lipases por *Y. lipolytica* 50682 em FES de torta de polpa

de macaúba (torta antiga), com o pico de produção entre os pHs 6 e 7. Já utilizando a torta nova os picos de produção ficaram entre 5 e 6.

Existem trabalhos relatando uma ótima produção de lipases por *Y. lipolytica* tanto em pHs ácidos quanto em pHs neutros/básicos, demonstrando que o pH ótimo depende do substrato utilizado para produção desta enzima (BRÍGIDA et. al., 2007; YU et al., 2007; FICKERS et al., 2011; KEBABCI et al., 2012). É comum, entretanto, verificar um aumento no pH no decorrer dos processos fermentativos, indicativo da presença de enzimas proteolíticas, o que não foi observado em nossos experimentos.

Apesar de, em termos de valores, a produção máxima com ureia utilizando o novo lote ter sido semelhante à produção com o resíduo antigo (Figura 5.44), o deslocamento de 24 para 96 horas tornou a produtividade com a nova torta muito baixa. A produtividade da FES de torta de macaúba, que chegou a atingir o nível de 4,9 U/g*h nos estudos aqui apresentados, quando utilizado o novo lote não chegou a 0,4 U/g*h (Figura 5.48).

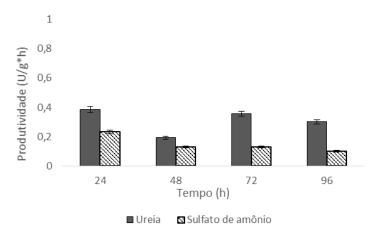


Figura 5.48. Produtividade nos diferentes tempos de FES do novo lote de torta de polpa de macaúba suplementada com sulfato de amônio e ureia.

Como explicado anteriormente, a baixa produtividade foi consequência tanto da baixa produção de lipases como do aumento do tempo necessário para a produção máxima ser atingida. Buscando uma maior compreensão sobre mudanças ocorridas na produção de lipases em FES de torta de macaúba, a análise bromatológica do novo lote foi realizado. O resultado

da análise confirmou a suspeita de que as tortas (antiga e nova) diferiam nas suas características (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Análises físico-químicas das tortas residuais da polpa de macaúba realizada pelo laboratório de controle bromatológico- LABCBROM/UFRJ.

A 41: 64-:	Composição centesimal base seca (%)		
Análises físico- químicas	Torta de polpa e casca – ANTIGA	Torta de polpa e casca – NOVA	
Cinzas	$2,3 \pm 0,1$	$4,02 \pm 0,11$	
Proteínas	$4,6 \pm 0,2$	$0,570 \pm 0,002$	
Extrato etéreo	5.8 ± 0.3	$13,21 \pm 0,20$	
Carboidratos totais Nifext	$16,2 \pm 1,6$	$14,72 \pm 1,84$	
Fibras totais	$71,2 \pm 1,6$	56,93 ± 2,26	

Dentre as diferenças que podem ter contribuído para a baixa produção de lipases, a mais significativa foi a quantidade de proteína. Sabe-se que a produção de lipases por *Y. lipolytica*, mais especificamente a Lip2p, é modulada também pelas fontes de nitrogênio, que são de grande relevância para o crescimento microbiano e para otimização da produção desejada (HASAN et al., 2006; RIGO et al., 2010). O conteúdo proteico do novo lote, principal fonte de nitrogênio para o micro-organismo, se encontrava em níveis muito baixos, aproximadamente 87 % menor que o conteúdo proteico da torta utilizada primeiramente.

Estudos anteriores demonstraram que o ponto máximo de atividade lipolítica ocorre provavelmente na fase exponencial do crescimento desta levedura, ou seja, a produção de lipases pode estar associada ao crescimento. Sendo assim, o retardo observado na produção quando o novo lote foi utilizado pode ser justificado pela dificuldade de desenvolvimento da levedura diante da limitação nutricional. Diferentemente da torta antiga, a suplementação com ureia foi a melhor para os requerimentos necessários para a biossíntese de lipase com a nova torta, ainda que com atraso no pico de produção decorrido da baixa concentração de proteínas.

É de conhecimento geral que a fonte de carbono lipídica funciona como um indutor na produção de lipase, sendo considerado por muitos trabalhos como o fator de maior relevância. As lipases são geralmente produzidas a partir de indutores tais como lipídios, ácidos graxos, ésteres hidrolisados, dentre outros. Em vista disso, as fontes de carbono lipídicas demonstram ser essenciais para o aumento da produção de lipase por diversos microorganismos (DALMAU et al., 2000). Embora o novo lote de torta de polpa de macaúba possuísse um elevado nível de extrato etéreo, no caso o dobro da quantidade existente na torta antiga, essa característica não foi suficiente para sustentar uma boa produção de lipases com o novo resíduo, devido à carência de proteínas.

Apesar da mudança do resíduo não nos ter permitido atingir uma elevada produção de lipases, os resultados obtidos demonstram a necessidade de se conhecer bem as necessidades nutricionais do micro-organismo para a produção de metabólitos de interesse, ao se fazer a escolha do meio de FES. É possível perceber que o ponto máximo de produção de lipase extracelular é totalmente dependente do tipo de resíduo agroindustrial utilizado, uma vez que este pode conferir diferente composição nutricional, e também muito dependente do arcabouço metabólico de cada micro-organismo (SALIHU et al., 2012).

Neste sentido, as mudanças morfológicas que estão intimamente ligadas à síntese proteica são também dependentes da composição nutricional do meio fermentativo. Ao longo desse trabalho, a variabilidade da matéria-prima induziu diferenças no comportamento dimórfico que podem ser quantificadas pelos valores nominais dos parâmetros descritivos da população, mas que não podem ser explicitadas apenas com medias dos mesmos, na qual o mesmo micro-organismo cresceu em torta de macaúba com diferentes composições centesimais. Deste modo, a mais valia apresentada por uma análise completa de diversos parâmetros da Geometria Euclidiana formam um quadro mais fiel do sistema em estudo do que análises globais de concentração celular.

Associando as respostas obtidas no estudo morfológico e o perfil de produção de lipases aqui obtidos, pode-se formar um quadro relativo ao comportamento da levedura *Yarrowia lipolytica* em FES, tendo a torta de macaúba como matéria-prima (Figura 5.49).

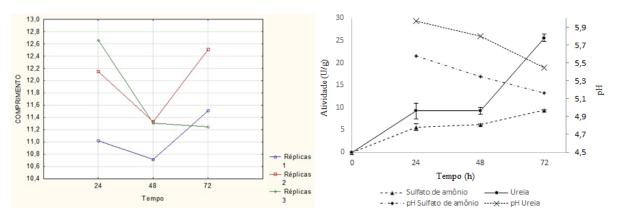


Figura 5.49. Comparação entre o comprimento desenvolvido pela levedura em FES de torta de polpa de macaúba e a produção de lipases.

Nos instantes iniciais (até 24h de processo), onde o micro-organismo se encontra na fase exponencial de crescimento, há uma máxima produção de lipases em pH próximo do neutro. Nesse momento, a maior parte das células encontra-se na forma leveduriforme por terem sido ativadas e propagadas em meio rico (YPD). Nas 24 horas seguintes (entre 24 e 48 horas de processo), há uma queda tanto na produção da enzima como no comprimento celular que, como foi mencionado, deve-se ao final do processo de divisão celular, visto que as células nesse momento entram em fase de desaceleração do crescimento, conforme descrito por Farias (2014). Até 72 horas de processo, as células encontram-se entrando na fase estacionária, seguida de uma fase longa de desaceleração, onde pode-se observar uma queda no pH para a faixa ligeiramente ácida (entre 4-5), fato que pode explicar o aumento detectado no comprimento celular pela formação de filamentos. Conforme observado neste trabalho e por Amaral (2007), um novo pico de atividade é detectado em 72 horas de processo, provavelmente tratando-se de isoformas da lipase.

Capítulo 6 - Conclusões PECLAT, V. R. O. L.

6. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para separação da biomassa celular do meio sólido se mostrou eficaz para aquisição de imagens limpas (ausente de resíduos), que representaram bem as diferentes morfologias desenvolvidas pela levedura. Adicionalmente, a utilização de Tween-80 e a aplicação do corante safranina às amostras possibilitou a obtenção de células menos agregadas e mais destacadas, melhorando as etapas posteriores do processamento de imagens.

O desenvolvimento do *software LEV_HIFAS* possibilitou um processamento de imagens automatizado, tornando-o rápido e eficiente na obtenção de imagens binárias das amostras de FES. Os objetos (células) das imagens binárias tiveram diversos parâmetros morfológicos rapidamente calculados. Os parâmetros $\acute{A}rea$, Comprimento, Largura, Compacidade, Excentricidade, Robustez, Circularidade e Diâmetro Equivalente (D_{eq}) demonstraram ser relevantes no estudo e avaliação do caráter dimórfico da levedura Y. lipolytica. A análise conjunta dos parâmetros $\acute{A}rea$, Comprimento, Largura, Compacidade e Diâmetro Equivalente (D_{eq}) foi adequada para caracterizar a formação de filamentos. Enquanto que os parâmetros Excentricidade e Robustez confirmaram a presença de células com bordas irregulares, característica de células filamentosas.

A aplicação da *Yarrowia lipolytica* IMURJ 50682 em FES utilizando diferentes matérias-primas confirmou o potencial dessa levedura para a produção de lipases, mesmo quando em condições nutricionais limitadas. A produtividade de 7,8 U/g*h obtida em FES com TPOMW e farelo de trigo destaca-se como uma produtividade elevada quando comparada às verificadas na literatura. A produtividade em FES de torta de macaúba, mesmo menor que verificada com TPOMW e farelo de trigo, foi também superior à produtividades verificadas na literatura (4,9 U/g*h). A fonte de nitrogênio mostrou ser importante para a produção de lipases, entretanto o conhecimento prévio da composição da matéria-prima é sem dúvida etapa necessária para o sucesso de uma FES.

A integração entre estudos morfológicos e de produção de metabólitos por um biocatalisador abre caminho para novas perspectivas na configuração de um bioprocesso. A metodologia desenvolvida permitiu um novo olhar, sob o ponto de vista do micro-organismo,

Capítulo 6 - Conclusões PECLAT, V. R. O. L.

para a FES. Os resultados aqui obtidos estimulam estudos mais aprofundados no que tange o comportamento microbiano em FES, utilizando novos resíduos e novos micro-organismos, para confirmar a sua adequabilidade.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Por ter sido a primeira tese que estudou a aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens no estudo da variação morfológica da levedura *Yarrowia lipolytica* em FES, as sugestões para trabalhos futuros visam à continuação deste que demostrou grande potencial face aos resultados obtidos.

- Metodologia para aquisição amostras de FES: Sugere-se que mais estudos sejam conduzidos com o objetivo de confirmar a reprodutibilidade da metodologia para a separação de amostra de células, correlacionando-a com alguma metodologia para quantificação de biomassa em FES;
- Utilização de diferentes matérias-primas: Sugere-se que as metodologias aqui desenvolvidas para a separação de amostras e aquisição de imagens sejam aplicadas em FES com diferentes matérias primas;
- **Dimorfismo em** *Yarrowia lipolytica*: Haja vista o comportamento dimórfico da levedura quando aplicada em FES, sugere-se que a metodologia desenvolvida para o PDI seja aplicada avaliando-se intervalos menores de tempo, correlacionando os parâmetros estudados (*Área, Comprimento, Largura, Compacidade, Diâmetro Equivalente* (D_{eq}), *Excentricidade* e *Robustez*) com as variáveis do processo que possam sem responsáveis por tal comportamento, como relações C/N, umidade, granulometria, etc.).

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. A.; COSTA, J. C.; ARAYA-KROFF, P., FERREIRA, E. C; ALVES, M. M. Quantitative image analysis as a diagnostic tool for identifying structural changes during a revival process of anaerobic granular sludge. **Water Res** 41:1473–80, 2007.
- AGGELOPOULOS, T.; KATSIERIS, K.; BEKATOROU, A.; PANDEY, A.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chem** 145:710–6, 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel** 135:315–21, 2014.
- ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Ann Microbiol** 63:1225–34, 2012.
- ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J. A.; PUCCINELLI, D.; MOUZ, N.; LECLAIRE, J.; LEBLOND, Y.; CARRIÈRE, F. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. **Biochim. Biophys. Acta** 1771, 228–237, 2007a.
- ALOULOU, A.; PUCCINELLI, D.; DE CARO, A.; LEBLOND, Y.; CARRIERE, F. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity, **Biochim. Biophys. Acta** 1771 1446–1456, 2007b.
- AMARAL, A. L. Image Analysis in Biotechnological Processes: Applications to Wastewater Treatment, Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga, 2003.
- AMARAL, A. L.; PEREIRA, M. A.; DA MOTTA, M.; PONS, M. N.; MOTA M.; FERREIRA, E.C., et al. Development of image analysis techniques as a tool to detect and quantify morphological changes in anaerobic sludge: II. Application to a granule deterioration process triggered by contact with oleic acid. **Biotechnol Bioeng** 87:194–9, 2004.
- AMARAL, P. F. F.; LEHOCKY, M.; TIMMONS, A. M. B.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; COELHO, M. A. Z.; COUTINHO, J. A. P. Cell Surface Characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. **Yeast** 23:867-877, 2006.
- AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* usando biorreator multifásico. Tese de Doutorado EQ/UFRJ, Brasil, 2007.

- BABU, I. S.; RAO, G. H. Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in Solid State Fermentation Using Mixed Substrate. **Res J Microbiol** 2:469–74, 2007.
- BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology** 84:847-865, 2009.
- BARRY, D. J.; WILLIAMS, G. A. Microscopic characterisation of filamentous microbes: towards fully automated morphological quantification through image analysis. **J Microsc** 244:1–20, 2011.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews** 19:219-237, 1997.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.-L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J.-M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid research** 48:375-87, 2009.
- BEOPOULOS, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J.-M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie** 91:692-6, 2009.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: an overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, 22: 49-70, 2008.
- BIGEY, F.; TUERY, K.; BOUGARD, D.; NICAUD, J.-M.; MOULIN, G. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. **Yeast** 20:233-48, 2003.
- BORA, L.; GOHAIN, D.; DAS, R. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. **J Chem Technol Biotechnol** 88:1959–70, 2013.
- BRAGA, A.; MESQUITA, D. P.; AMARAL, A. L., FERREIRA, E. C., BELO, I. Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology. **Biochem Eng J** 93:55–62, 2015.
- BRÍGIDA, A. I. S; AMARAL, P. F.; COELHO, M. A. Z. Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. **Proceedings of European Congress of Chemical Engineering** (ECCE-6), p. 16-20, 2007.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; DE OLIVEIRA, E. S., BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-

secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource technology** 101:268-75, 2010.

CALLEGARI-JAQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre. Artmed. 2008.

CERVANTES-CHÁVEZ, J. A.; RUIZ-HERRERA, J. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research** 6:801-15, 2006.

CERVANTES-CHÁVEZ, J. A.; RUIZ-HERRERA, J. The regulatory subunit of protein kinase A promotes hyphal growth and plays an essential role in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS** yeast research 7:929-40, 2007.

CERVANTES-CHÁVEZ, J. A.; KRONBERG, F.; PASSERON, S.; RUIZ-HERRERA, J. Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. **Fungal Genet Biol** 46:390–9, 2009.

CHEN, H. Modern Solid State Fermentation, 332p. Springer Netherlands; 2013.

COELHO, M. A. Z.; BELO, I.; PINHEIRO, R.; AMARAL, A. L.; MOTA, M.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, E. C. Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: study by automated image analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology** 66: 318-324, 2004.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: A M-V, editor. **Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.**, FORMATEX; p. 930–44, 2010.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B., MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. D. A. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 67:163-171, 2010.

CORADI, G.V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; OLIVA, P.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology** (2) 63: 553-540, 2012.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. et al. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **J Mol Catal B Enzym** 5:75–8, 1998.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, 70, 173–80, 1999.

- COSTA, J. C; MOITA, I.; ABREU, A. A; FERREIRA, E. C.; ALVES, M. M. Advanced monitoring of high-rate anaerobic reactors through quantitative image analysis of granular sludge and multivariate statistical analysis. **Biotechnol Bioeng** 02:445–56, 2009.
- COURI, S.; MERCES, E. P.; NEVES, B. C.; SENNA, L. F. Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. **Journal of Microscopy** 224: 290–297, 2006.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering** 76: 291–302, 2006.
- COX, P. W.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. **Microbiology** 144: 817-827, 1998.
- CUI, C.; TAO, Y.; LI, L.; CHEN, B.; Tan, T. Enzymatic Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. **J Mol Catal B Enzym** 91:59–66, 2013.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 657-663, 1 2000.
- DARVISHI, F.; DESTAIN, J.; NAHVI, I.; THONART, P; ZARKESH-ESFAHANI, H. Highlevel production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New biotechnology** 00:3-7, 2011.
- DARVISHI, F. Microbial Biotechnology in Olive Oil Industry, **Olive Oil Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions**, Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech, 2012.
- DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Ind Crops Prod** 41:78–84, 2013.
- DOBSON, L. F; O'CLEIRIGH, C. C.; O'SHEA D. G. The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. **Appl Microbiol Biotechnol** 79:859–66, 2008.
- DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid-state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, 25, 1225–9, 2003.

DOMÍNGUEZ, A.; DEIVE, F. J.; SANROMAN, M. A.; LONGO, M. A. Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. **Eur J Lipid Sci Technol** 112:1200–8, 2010.

DRIOUCH, H.; SOMMER, B.; WITTMANN, C. Morphology Engineering of *Aspergillus niger* for Improved Enzyme Production. **Biotechnol Bioeng** 105:1058–68, 2010.

DUAN, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Digital image analysis and fractal-based kinetic modelling for fungal biomass determination in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 67:60-67, 2012.

DUBEY, A. K.; SURESH, C.; KUMAR, S. U.; KARANTH, N. G. An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 5:299-302, 1998.

DUTRA, J. C. V.; TERZI, S. C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P.; SENNA, L. F. Lipase Production in Solid-State Fermentation Monitoring Biomass Growth of *Aspergillus niger* Using Digital Image Processing. **Applied Microbiology and Biotechnology** 147: 63–75, 2008.

EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMBE, T. N.; KAMINI, N. R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresour Technol**;101:6791–6, 2010.

FARIAS, M.; VALONI, E.; CASTRO, A.; COELHO, M. A. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation using different agroindustrial residues. **Chemical Engineering Transactions** 38:301-306, 2012.

FARIAS, M. A. Produção de ésteres etílicos na faixa do biodiesel com lipase de *Yarrowia lipolytica* obtida a partir de co-produtos da macaúba. Tese de Doutorado EQ/UFRJ, Brasil, 2014.

FARINAS, C. S.; VITCOSQUE, G. L.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products** 34:1186-1192, 2011.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; PÉREZ-CORREA, J. R. Realistic model of a solid substrate fermentation packed-bed pilot bioreactor. **Process Biochem** 42:224–34, 2007.

- FICKERS, P.; NICAUD J-M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, 96, 742–9, 2004.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J-M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology advances** 29:632-44, 2011.
- FREITAS, A. C.; BALEEIRO, F. C. F.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI NETO, V.; PINTO, G. A. S.; FARINAS, C. S. Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. **Food Bioprod Process** 95:173–82, 2015.
- GILAT, A. **MATLAB: Com Aplicações em Engenharia.** Ed. Bookman, 359 p. IBSN 8536306920, 9788536306926, 2006.
- GINORIS, Y. P.; AMARAL, A. L.; NICOLAU A.; COELHO M. A. Z.; FERREIRA E. C. Development of an image analysis procedure for identifying protozoa and metazoa typical of activated sludge system. **Water Res** 41:2581–9, 2007.
- GLASBEY, C. A.; HORGAN, G. W. **Image Analysis for the Biological Sciences**, John Willey & Sons, Chichester,1995.
- GONZÁLEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de Imagens Digitais**, Addison-Wisley Publishing Company, Reading, 1992.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E., EDDINS, S. L. **Digital Image Processing Using MATLAB**, 2nd ed., Gatesmark Publishing, Knoxville, TN, 2009.
- HAEGLER, A. N.; MENDONÇA-HAEGLER, L. C. Yeast from marine and stuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology** 41:173-178, 1981.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology** 58: 137-161, 1996.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb Technol** 39:235–51, 2006.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol** 64:175–86, 2004.

- HURTADO, C. A. R.; BECKERICH, J.; RACHUBINSKI, R. A.; GAILLARDIN, C. A Rac Homolog Is Required for Induction of Hyphal Growth in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Bacteriology** 182:2376-2386, 2000.
- HURTADO, C. A. R.; RACHUBINSKI, R. A. Isolation and Characterization of YlBEM1, a Gene Required for Cell Polarization and Differentiation in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica* Isolation and Characterization of YlBEM1, a Gene Required for Cell Polarization and Differentiation in the Dim. **Eukaryotic Cell** 1:526-537, 2002.
- IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H. R. Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Solid State Fermentation by *Yarrowia Lipolytica* from Niger Seed Oil Cake (*Guizotia Abyssinica*). **Journal of Microbial & Biochemical** Technology 02, 028–33, 2010.
- JIANG, H.; LIU, G.; XIAO, X.; MEI, C.; DING, Y.; YU, S. Monitoring of solid-state fermentation of wheat straw in a pilot scale using FT-NIR spectroscopy and support vector data description. **Microchemical Journal** 102:68-74, 2012.
- JOLIVET, P.; BORDES, F.; FUDALEJ, F.; CANCINO, M.; VIGNAUD, C.; DOSSAT, V.; BURGHOFFER, C.; MARTY, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J-M. Analysis of *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase Lip2p glycosylation. **FEMS yeast research** 7:1317-27, 2007.
- KAMOUN, J.; SCHUÉ, M.; MESSAOUD, W.; BAIGNOL, J.; POINT, V.; MATEOS-DIAZ E. et al. Biochemical characterization of *Yarrowia lipolytica* LIP8, a secreted lipase with a cleavable C-terminal region. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids** 1851:129–40, 2015.
- KAWASSE, F. M.; AMARAL, P. F. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z. Morphological Analysis of *Yarrowia lipolytica* under Stress Conditions through Image Processing. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 25(6): 371-375, 2003.
- KEBABCI, Ö.; CIHANGIR, N. Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production: NBRC 1658, IFO 1195, and a local strain. **Turkish Journal of Biology**, 36, 15–24, 2012.
- KING, R. Mathematical Modelling of the Morphology of *Streptomyces* Species. . In: SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v.60, Berlin Heidelberg, ISBN 540-62567-4, 1998.
- KUMAR, S.; MITTAL, G. S. Rapid Detection of Microorganisms Using Image Processing Parameters and Neural Network. **Food and Bioprocess Technology** 3:741-751, 2010.

KUMARI, A.; VERMA, V. V.; GUPTA, R. Comparative biochemical characterization and in silico analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 with Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **World J Microbiol Biotechnol** 28:3103–11, 2012.

KUMARI, A.; GUPTA, R. Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol Lett** 34:1733–9, 2012.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; BALDI, D.; ANGRISANI, R.; SUZZI, G.; MASTROCOLA, D. et al. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresour Technol** 96:317–22, 2005.

MA, H.; BRYERS, J. D. Non-invasive method to quantify local bacterial concentrations in a mixed culture biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol** 37:1081–9, 2010.

MADZAK, C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. **Appl Microbiol Biotechnol** 99:4559–77, 2015.

MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **N Biotechnol** 27:337–40, 2010.

MANTZOURIDOU, F. T.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. **Biochem Eng J** 101:1–8, 2015.

MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. **Processamento Digital de Imagens,** Rio de Janeiro: Brasport, 1999. ISBN 8574520098.

MASUTTI, D.; BORGOGNONE, A.; SETTI, L. Production of enzymes from rice husks and wheat straw in solid state fermentation. **Chemical Engineering Transactions** 27:133-138, 2012.

MCINTYRE, M.; BERRY, D. R.; EADE, J. K.; COX, P. W.; THOMAS, C. R.; MCNEIL, B. Manual and semi-automated morphological analysis of *Penicillium chrysogenum* chemostat cultures. **Biotechnol Tech** 12:671–5, 1998.

MEGASON, S. G.; FRASER, S. E. Imaging in Systems Biology. Cell 130:784-175, 2007.

MESQUITA, D. P; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C. Identifying different types of bulking in an activated sludge system through quantitative image analysis. **Chemosphere** 85:643–52, 2011.

- MILLARD, P. J.; ROTH, B. L.; THI, H. P.; YUE, S. T.; HAUGLAND, R. P. Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology** (63) 7:2897–2905, 1997.
- MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; ZUŽA, 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**, 166, 348–64, 2012.
- MORALES-VARGAS, A. T.; DOMÍNGUEZ, A.; RUIZ-HERRERA, J. Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. **Research in microbiology** 163:378-87, 2012.
- MORÍN M.; MONTEOLIVA, L.; INSENSER, M.; GIL, C.; DOMÍNGUEZ, Á. Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. **J Mass Spectrom** 42:1453–62, 2007.
- MOREIRA, C. Valorização de bagaços de azeitona por fermentação sólida com fungos filamentosos, Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga, 2012.
- NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUÉRIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIÈRE, F. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied microbiology and biotechnology** 89:1947-1962, 2011.
- NARS, G.; SAUREL, O.; BORDES, F.; SAVES, I.; REMAUD-SIMÉON, M.; ANDRÉ, I. et al. Production of stable isotope labelled lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* for NMR: investigation of several expression systems. **Protein Expr Purif** 101:14–20, 2014.
- NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; VAN, DEN BROEK P.; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P. et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Res** 2:371–9, 2002.
- NUNES, P. M. B.; DA ROCHA, S. M.; AMARAL, P. F. F.; DA ROCHA-LEÃO, M. H. M. Study of trans-trans farnesol effect on hyphae formation by *Yarrowia lipolytica*. **Bioprocess Biosyst Eng** 36:1967–75, 2013.
- OSMA, J. F; TOCA –HERRERA, J. L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Environmental, scanning electron and optical microscope image analysis software for determining volume and occupied area of solid-state fermentation fungal cultures. **Journal of Biotechnology** 6: 45–55, 2011.

OLIVEIRA, A. A.C.; SOUSA, T. V. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; ARAUJO, O. Q. F. Study of morphological physiological parameters of cultures of *Yarrowia lipolytica* undergone electrochemical stress. **Chemical Engineering Transactions** 20:133-138, 2010.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 13: 81-84, 2003.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelia. **Microbial Cell Factories** 5:3, 12p, 2006.

PAPAGIANNI M. Characterization of Fungal Morphology using Digital Image Analysis Techniques. **J Microb Biochem Technol** 06:189–94, 2014.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology** 112:639-654, 2010.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. **European Journal of Lipid Science and Technology** 113:1052-1073, 2011.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA JR, G. L. A. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology Letters** 22, 71–5, 2000.

PEREIRA-MEIRELES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA JR, G. L. A., Stable Lipase from *Candida lipolytica*: Cultivation Conditions and Crude Enzyme Characteristics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 63, 73–85, 1997.

PEREIRA JR, N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M. A Biotecnologia Microbiana: Conceitos e Aplicações. **Séries em biotecnologia**: Tecnologia de bioprocessos. v1, p. 8-10.1. ed. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

PÉREZ, Y.G. Aplicação de Técnicas de Análise Digital de Imagens na Monitoração de Sistemas de Lodos Ativados, Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos / EQ / UFRJ, 2006.

PIGNÈDE, G.; WANG, H.; FUDALEJ, F.; SEMAN, M.; NICAUD, J-M.; WANG, H.; FUDALEJ, F.; GAILLARDIN, C.; PIGNE, G. Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Bacteriology** 182:2802-2810, 2000.

PINTO, L. S.; VIEIRA, L. M.; PONS, M. N.; FONSECA, M. M. R.; MENEZES, J. C. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 26: 177–184, 2004.

PONS, M. N.; DROUIN, J. F.; LOUVEL, L.; VANHOUTTE, B.; VIVIER, H.; GERMAIN, P. Physiological investigations by image analysis. **Journal of Biotechnology** 65:3 – 14, 1998.

POSCH, A. E; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. **Fungal Genet Biol** 49:499–510, 2012.

RAGHAVARAO, K. S. M.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 13:127-135, 2003.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Utilizing Agricultural Wastes as Substrates for Lipase Production by *Candida rugosa* NCIM 3462 in Solid-State Fermentation: Response Surface Optimization of Fermentation Parameters. **Waste and Biomass Valorization** 4:347–57, 2012.

RIGO, E.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; KALIL, S. J.; NINOW, J. L; DI LUCCIO, M. Esterification activity of novel fungal and yeast lipases. **Applied biochemistry and biotechnology** 162:1881-8, 2010.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S., et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochem** 41:2264–9, 2006.

ROERDINK, J. B. T. M. An Introduction to Digital Image Processing. In: WILKINSON, M. H. F. & SCHUTT, F., JOHN WILEY & SONS. **Digital Image Analysis of Microbes**, UK, 1998. ISBN 0-471-97440-4

RONNEST, N. P.;STOCKS, S. M.; LANTZ, A. E.; GERNAEY, K. V. Comparison of laser diffraction and image analysis for measurement of *Streptomyces coelicolor* cell clumps and pellets. **Biotechnology letters** 34:1465-73, 2012.

RUIZ-HERRERA, J.; SENTANDREU, R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. **Arch Microbiol** 178:477–83, 2002.

RUSS, J.C. The image processing handbook, CRC Press, Boca Raton, 1995.

SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Screening of winery and olive mill wastes for lignocellulolytic enzyme production from

Aspergillus species by solid-state fermentation. **Biomass Convers Biorefinery** 172:1832–45, 2013a.

SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Integrated Use of Residues from Olive Mill and Winery for Lipase Production by Solid State Fermentation with *Aspergillus* sp. **Appl Biochem Biotechnol** 172:1832–45, 2013b.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SANNA, M. L.; ZARA, S.; ZARA, G.; MIGHELI, Q.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I. *Pichia fermentans* dimorphic changes depend on the nitrogen source. **Fungal Biol** 116:769–77, 2012.

SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, T.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresour Technol** 102:10080–4, 2011.

SCHTUGERL, K.; GERLACH, S. R.; SIEDENBERG, D. Influence of the Process Parameters on the Morphology and Enzyme Production of *Apergilli*. In: SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v.60, Berlin Heidelberg, ISBN 540-62567-4, 1998.

SEBASTINE, I. M.; STOCKS, S. M.; COX, P. W.; THOMAS, C. R. Characterisation of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 419–423, 1999.

SIERACKI, M. E.; VILES, C. L. Enumeration and Sizing of Microorganisms using Digital Image Analysis. In: WILKINSON, M.H.F. & SCHUTT, F., JOHN WILEY & SONS. **Digital Image Analysis of Microbes**, UK, 1998. ISBN 0-471-97440-4.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Appl Biochem Biotechnol** 166:486–520, 2012.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 44: 13-18, 2009.

SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; et al. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: a novel substrate. **Carbohydr Polym** 92:697–703, 2013.

- SUGUMARAN, K. R.; JOTHI, P.; PONNUSAMI, V. Bioconversion of industrial solid waste-Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. **Carbohydr Polym** 99:22–30, 2014.
- SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for "whole-cell synthetic lipase" production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochem** 43:219–24, 2008.
- SUZUKI, G.; SAWAI, H.; OHTANI, M.; NOGAMI, S.; SANO-KUMAGAI, F.; SAKA, A.; YUKAWA, M.; SAITO, T. L.; SESE, J.;HIRATA, D.; MORISHITA, S.; OHYA, Y. Evaluation of image processing programs for accurate measurement of budding and fission yeast morphology. **Current Genetics** 49:237-247, 2006.
- SWENNEN, D.; BECKERICH, J. *Yarrowia lipolytica* vesicle-mediated protein transport pathways. **BMC Evolutionary Biology** 19:1-19, 2007.
- SZABO, R.; STOFANÍKOVÁ, V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS microbiology letters** 206:45-50, 2002.
- TEPWONG, P.; GIRI.; OHSHIMA, T. Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes*. **Mycoscience** 53:102–12, 2011.
- THOMAS, C. R.; PAUL, G. C. Applications of image analysis in cell technology. **Current Opinion in Biotechnology** 7: 35-45, 1996.
- TIBAYRENC, P.; BELLOYA, L. P.; ROGERB, J. M.; GHOMMIDHA, C. Assessing yeast viability from cell size measurements? **Journal of Biotechnology** 149: 74–80, 2010.
- TRINDADE, J. R.; FREIRE, M. G.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M. Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*. **Colloids an Sufaces A: Physicochem. Eng**. 324, 149-154, 2008.
- TURKI, S.; KRAEIM, I. B.; WEECKERS, F.; THONART, P.; KALLEL, H. Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology** 100, 2724–31, 2009.
- TURKI, S.; AYED, A.; CHALGHOUMI, N.; WEEKERS, F.; THONART, P.; KALLEL, H. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied biochemistry and biotechnology** 160:1371-85, 2010.

- VASEGHI, Z.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHSENI, S.; MAHJOUB, S. Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. **Int J Food Sci Technol** 48:283–9, 2013.
- VEERABHADRAPPA, M.B.; SHIVAKUMAR, S.B.; DEVAPPA, S. Solid-state fermentation of Jatropha seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in Jatropha seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. J **Biosci Bioeng** 1–7, 2013.
- VELİOĞLU, Z.; ÖZTÜRK ÜREK, R. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. **Turkish J Biol** 39:160–6, 2015.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Perspectives and limitations of fermentation in Mexico. In: (Raimbault, M., Ed.). **Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials**, p. 67-72, Montpellier, France, 1988.
- WANG, X-F.; SHEN, X-G.; SUN, Y-C.; ZHAO, H-Y.; XU, L.; LIU. Y. et al. Production of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. **J Chem Technol Biotechnol** 87:553–8, 2012.
- WILKINSON, M. H. F. Automated and Manual Segmentation Techniques in Image Analysis of Microbes. In: WILKINSON, M. H. F. & SCHUTT, F., JOHN WILEY & SONS. **Digital Image Analysis of Microbes**, UK, 1998. ISBN 0-471-97440-4.
- YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. **Bioresour Technol** 131:179–87, 2013.
- YIN, P.; WANG, Y.; ZHANG, S.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; CHEN, N. et al. Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. **J Chinese Inst Chem Eng** 39:609–15, 2008.
- YOUNG, T. W.; WADESON, A.; GLOVER, D. J.; QUINCEY, R. V.; BUTLIN, M. J.; KAMEI, E. A. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: Sequence and pH-regulated transcription. **Microbiology** 142:2913–21, 1996.
- YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 384-391, 2007.
- YU, X. W.; LU, X.; ZHAO, L. S.; XU, Y. Impact of NH₄⁺ nitrogen source on the production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, 48, 1462–8, 2013.

ZALEWSKI, K.; BUCHHOLZ, R. Morphological analysis of yeast cells using an automated image processing system. **Journal of biotechnology** 48:43-49, 1996.

ZHAO, H.; ZHENG, L.; WANG, X.; LIU, Y.; XU, L.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of new lipases from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol Lett** 33:2445–2452, 2011.

ZHONG, H.; FANG, Z.; ZOU, B.; LI, X.; OUYANG, P.; GUO, K. Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. **J Mol Catal B Enzym** 90:114–7, 2013.

ZHOU, W-J.; YANG, J-K.; MAO, L.; MIAO, L-H. Codon optimization, promoter and expression system selection that achieved high-level production of *Yarrowia lipolytica* lipase in *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb Technol** 1:66–72, 2015.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A.; DESHPANDE, M. V. Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. **Mycological Research** 102:553-558, 1998.