



Utilização de leveduras para a produção de biomassa em extrato de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

Use of yeasts for biomass production in forage palm extract (*Opuntia ficus-indica*)

C. I. M. Lins^{1*}; F. F. Veras²; D. B. G. Martins³; J. L. de Lima-Filho³

¹Centro de Biociências/Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-420, Recife-PE, Brasil

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91501-970, Porto Alegre-RS, Brasil

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901, Recife-PE, Brasil

* rissabel@gmail.com

(Recebido em 08 de outubro de 2017; aceito em 28 de maio de 2018)

Opuntia ficus-indica é uma cactácea utilizada na produção de bioprodutos, sendo rica em carboidratos e reconhecida como fonte alternativa de alimento para agricultura de subsistência. Este trabalho objetivou avaliar a utilização do extrato líquido de *O. ficus-indica* como substrato para o crescimento de leveduras de interesse biotecnológico. *Candida utilis*, *C. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* foram cultivadas no extrato obtido após tratamento da cactácea. Alíquotas do cultivo microbiano foram coletadas para análise de biomassa, açúcares redutores, pH e parâmetros cinéticos. *K. marxianus* apresentou maior taxa de crescimento ($\mu_{\max}=0,25\text{h}^{-1}$) e maior porcentagem de consumo de açúcar (95,68%). *C. utilis* obteve melhor rendimento de biomassa em relação ao substrato consumido ($Y_{x/s}=2,69$). *C. lipolytica* se destacou por exibir melhor perfil cinético uma vez que apresentou maiores valores de produção de biomassa ($\Delta X_{\max}=10,93\text{ g/L}$) e produtividade ($P=0,58\text{ g/L.h}^{-1}$) em 24 horas de cultivo. A influência de diferentes concentrações salinas no crescimento de *C. lipolytica* cultivada em extrato de *O. ficus-indica* foi testada com NaCl e KCl (0,1M, 0,25M, 0,50M, 1M, 2M e 4M). No crescimento sob estresse a levedura foi tolerante às concentrações salinas (até 1M de NaCl e a 0,5M para KCl). As concentrações maiores inibiram o crescimento celular. A concentração de 4M foi considerada letal para ambas as células leveduriformes e a 2M sub-letal. As células de *C. lipolytica* expressaram adaptação contra estresse osmótico até a concentração de 1M. Os resultados sugerem a utilização desta cactácea como substrato alternativo para a produção de biomassa microbiana.

Palavras-chave: *Candida* spp., cactáceas, fermentação

Opuntia ficus-indica is a plant which can be applied in bioproducts production because of its composition rich in carbohydrates and recognized as an alternative food source for subsistence agriculture. This work aimed to evaluate the use of *O. ficus-indica* liquid extract as a regional substrate in yeasts growth of biotechnological interest. *Candida utilis*, *C. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* were used. Aliquots of the fermented palm were collected for analysis of biomass, reducing sugars, pH and kinetic parameters. *K. marxianus* had a higher growth rate ($\mu = 0.25\text{h}^{-1}$) and a higher percentage of sugar consumption (95.68%). *C. utilis* demonstrated a better biomass production compared to the substrate consumed ($Y_{x/s} = 2.69$). *C. lipolytica* presented a better kinetic profile and values of biomass ($\Delta X_{\max} = 10.93\text{ g/L}$) and high productivity ($P = 0.58\text{ g/L.h}^{-1}$) in 24 hours of fermentation time. Considering the NaCl and KCl salts as a growth inhibitory component, the influence at different concentrations (0.1M, 0.25M, 0.50M, 1M, 2M and 4M) on the growth of *C. lipolytica* grown in a regional extract was evaluated. On growth under stress, the yeast was tolerant to saline concentrations (up to 1M NaCl and 0.5M to KCl). Higher concentrations inhibited cell growth, 4M and 2M concentrations were considered lethal and sub-lethal for cells, respectively. Cells of *Candida lipolytica* expressed adaptation against osmotic stress to the concentration of 1M. The results suggest the use of the regional substrate in future productions of bio inputs using *Candida lipolytica*.

Keywords: *Candida* spp., cactus, fermentation

1. INTRODUÇÃO

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) é uma planta apropriada para o cultivo em condições adversas como escassez de água, temperaturas elevadas e solos pobres, proporcionando alimentos para subsistência agrícola das populações carentes, além de ser eficiente na aplicabilidade de sua mucilagem que contém carboidratos de estruturas complexas [1] e proporções variadas de L-arabinose, D-galactose, L-ramnose e D-xilose. Além disso, a mucilagem seca contém em média 5,6% de umidade, 7,3% de proteína, 37,3% de cinzas, 1,14% de nitrogênio, 9,86% de cálcio e 1,55% de potássio [2].

A mucilagem hidrocoloidal apresenta propriedades farmacológicas e biopoliméricas. Além da produção de xampu, sabonetes e cremes [3,4], agente espessante, aditivo para produção de alimentos e de cosméticos [5]. O caráter hidrofílico da mucilagem não interfere na sua utilização como biofilme [6], retardando a perda de água e prolongando a firmeza da carne do fruto, em fatias de kiwi frescas [7].

A empresa Elqui Global Energy, localizada no México, desenvolveu uma usina energética utilizando a biomassa da palma na produção do biogás [8]. Estima-se que 1,0 mg de biomassa de palma tem potencial para produzir 50 a 60 m³ de biogás (chegando a 70% metano) [9].

Visando agregar lucratividade e interesse econômico no mercado biotecnológico industrial, estudos sobre as diferentes aplicabilidades da mucilagem de *Opuntia ficus-indica*, além de pesquisas para viabilizar a aplicação da biomassa da palma forrageira em biocombustíveis, biopolímeros e biomoléculas são necessários [10].

Em resposta à demanda por bioprodutos, têm sido descritos a utilização e busca de novos biocatalisadores biotecnológicos empregando leveduras que são microrganismos adaptáveis a diversos substratos [11].

Alguns espécimes de *Candida*, *Yarrowia* e *Sporobolomyces* são conhecidas no controle da degradação de substratos hidrofóbicos não convencionais e são consideradas bons biocatalisadores. As lipases são conhecidas como biocatalisador industrial devido à sua capacidade de transportar uma infinidade de reações de bioconversão e são utilizadas na produção de *flavours* de interesse industrial [12].

Substâncias formadas durante a fermentação de leveduras são metabólicos intermediários ou subprodutos. Álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais (VDKs) são os principais elementos sintetizados. *Flavours* resultantes da bebida provém da soma incontável de compostos ativo-aromatizantes produzidos em cada passo da fabricação e irão determinar a qualidade do produto final [13].

Compostos como morfina, taxol, artemisina, coenzima Q10, ácido docosaheptaenoico (DHA) e carotenoides são metabólitos secundários que existem em plantas, mamíferos, microalgas e microrganismos que apresentam alto valor comercial [14]. No organismo, estes metabólitos apresentam funções importantes protegendo contra estresses abióticos, bióticos, radiação e agem como moléculas reguladoras [15].

Bioprocessos na produção dos carotenoides microbiológicos em substituição aos sintéticos, que podem ser utilizados como corantes em gêneros alimentícios, estão em expansão. A produção comercial de carotenoides de origem microbiana é altamente eficiente porque tais compostos podem ser facilmente controlados [16].

Leveduras que sobrevivem em estresse iônico têm uma forte habilidade a viver em ambientes marinhos extremos. Tais microrganismos são potenciais candidatos para a síntese de biomoléculas funcionais. A capacidade destes microrganismos em agir sinergicamente ou antagonicamente contra os agentes contaminantes é frequente em relação aos procedimentos de fabricação e preservação dos produtos alimentares [17].

As biomoléculas funcionais (enzimas, proteínas microbianas, entre outras substâncias bioativas) apresentam versatilidade para diferentes aplicações nas indústrias de alimentos, química, agrícola, de biocombustíveis e farmacêuticas. Portanto, é importante explorar leveduras resistentes e seus bio-produtos correspondentes para aplicação industrial [18].

A palma forrageira apresenta características favoráveis, entre os vegetais existentes na região semiárida, por ser utilizada como substrato no desenvolvimento de microrganismos em processos biotecnológicos. Dessa forma, o cultivo de leveduras nesse vegetal pode aumentar seu valor

nutricional após adição de proteína microbiana, fósforo, potássio e vitaminas do complexo B, os quais são importantes fatores de crescimento para os animais. Os cladódios (raquetes ou artículos) da planta constituem boa fonte de fibras, um elemento importante para a dieta humana apresentando um considerável potencial na utilização médica. Estudos utilizando a palma forrageira têm apresentado esta planta como uma alternativa tecnológica devido à sua grande disponibilidade no semiárido, agregando valor a esta cultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes linhagens de leveduras: *Candida utilis* URM 115, *Candida lipolytica* 1120 (gentilmente cedida pela Micoteca – URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE), *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®) e *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (CBS – Centraal bureau voor Schimmelcultures). Estas duas últimas são designadas como “Geralmente Reconhecidas como Seguras” (do inglês: *Generally Regarded as Safe - GRAS*) pela *Food and Drug Administration* (FDA). As linhagens foram mantidas em placas de Petri contendo meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ágar 2%) e o estoque congelado foi armazenado à -70 °C, de acordo com Ausubel et al. (2002) [19].

2.2 Obtenção do extrato de palma

Os exemplares da *O. ficus-indica* foram obtidos no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA-PE), localizado em Caruaru, no Agreste do Estado. Foram coletados cladódios (raquetes) em estágios terciário e quaternário de exemplares de Palma Gigante com idade aproximada de dois anos. Amostras de *O. ficus-indica* foram submetidas aos tratamentos de retirada dos espinhos, lavagem em água destilada, corte e desprezo da epiderme. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e filtrado à vácuo para remoção de partículas residuais do substrato. O extrato líquido resultante foi esterilizado em autoclave e utilizado como substrato.

2.3 Cultivo celular em extrato de palma

Colônias isoladas de cada levedura foram retiradas de placas de Petri contendo meio YPD e pré-inoculadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio YPD por 12 h a 30 °C, sob agitação orbital de 150 rpm. A partir da cultura obtida, uma concentração inicial de células correspondente a 0,1nm (DO_{600nm}) foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 180 mL de extrato líquido de *O. ficus-indica*. Os experimentos foram conduzidos por um período de 60 h em agitador orbital a 150 rpm, sob temperatura de 30 °C. As amostras foram retiradas em intervalos regulares de 12 h para a realização de determinações analíticas. Todos os crescimentos foram realizados em triplicata, de forma independente.

2.4 Avaliação do crescimento microbiano

A biomassa foi avaliada por espectrofotometria. A absorbância foi convertida para peso seco a partir da equação gerada por uma regressão linear. O pH foi determinado utilizando pHmetro Micronal (B474). A concentração de açúcares redutores foi realizada seguindo a metodologia do DNSA- Ácido dinitrossalicílico descrita por Miller (1959) [20]. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os parâmetros cinéticos foram calculados como descrito por Pirt (1975) [21]. A taxa de crescimento específico máxima (μ_{max}) foi determinada durante a fase exponencial da curva de crescimento. A produção de biomassa (X) foi determinada em gramas de células secas produzidas por litro de meio utilizado. O rendimento ($Y_{x/s}$) foi calculado em gramas de células secas produzidas por gramas de açúcar redutor consumido. A produtividade (P) foi obtida a partir do valor de biomassa produzida por litro de meio por hora de cultivo.

2.5 Crescimento de *Candida lipolytica* em extrato de palma sob estresse salino

Nos ensaios de crescimento sob estresse salino, a levedura *C. lipolytica* foi pré-cultivada conforme descrito anteriormente, e em seguida inoculada em Erlenmeyer de 500 mL contendo 180 mL de extrato líquido de *O. ficus-indica* adicionado dos sais NaCl e KCl nas concentrações de 0,1M, 0,25M, 0,50M, 1M, 2M e 4M. Amostras do cultivo microbiano foram coletadas em intervalos regulares de 12 h para análises de densidade óptica e pH.

2.5.1 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5%. Todos os valores são apresentados como médias de três determinações e os resultados foram expressos como valores médios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil de Cinético dos microrganismos

O perfil de crescimento microbiano em extrato de palma forrageira pode ser observado na Figura 1. As leveduras *S. cerevisiae* e *C. utilis* produziram 13,75 e 7,38 g/L de biomassa, respectivamente. Tais valores correspondem a 84 e 35,32%, respectivamente, daqueles observados no cultivo desses microrganismos em meio YPD. *K. marxianus* e *C. lipolytica* também demonstraram a capacidade de crescimento nesse substrato.

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* em Extrato de *Opuntia max-indica*

A levedura *S. cerevisiae* Fleischmann®, amplamente utilizada em processos biotecnológicos, foi utilizada como microrganismo padrão no crescimento cinético de leveduras em extrato de *Opuntia ficus-indica*. As condições de cultivo de *S. cerevisiae* apresentaram desaceleração de crescimento a partir de 8h de incubação, com fase estacionária estabelecida após 24 h de cultivo, coincidindo com a baixa concentração de açúcares redutores no meio de cultivo (Figura 1A). A cinética de crescimento pela *S. cerevisiae* demonstrou uma taxa de crescimento específico (μ_{\max}) de 0,40 e 0,39h⁻¹ no extrato de palma e em meio YPD, respectivamente.

Ao final do processo, o consumo de açúcares redutores pela *S. cerevisiae* foi de 6,84 e 15,08 g/L para extrato de palma e YPD, respectivamente. Estes valores correspondem a 95,9% e 86,9% do total de açúcares redutores presentes no meio. Consequentemente, a baixa concentração de açúcares redutores totais no extrato de palma levou ao aumento do rendimento de biomassa em relação ao açúcar consumido no extrato, sendo cerca de 45% maior em palma. A produtividade em extrato de palma foi menor ($P= 0,65\text{g/L.h}^{-1}$) que no YPD ($P= 1,06\text{g/L.h}^{-1}$) devido à maior biomassa produzida no meio de cultura padrão, YPD ($X = 16,59\text{g/L}$).

Durante o cultivo de *S. cerevisiae*, o pH não apresentou grande variação, permanecendo na faixa de 4,1 a 4,3 em extrato de palma. Enquanto no cultivo desta levedura em YPD, os valores de pH quase atingiram a neutralidade, variando entre 5,7 – 6,9 no decorrer das 60 horas de crescimento microbiano.

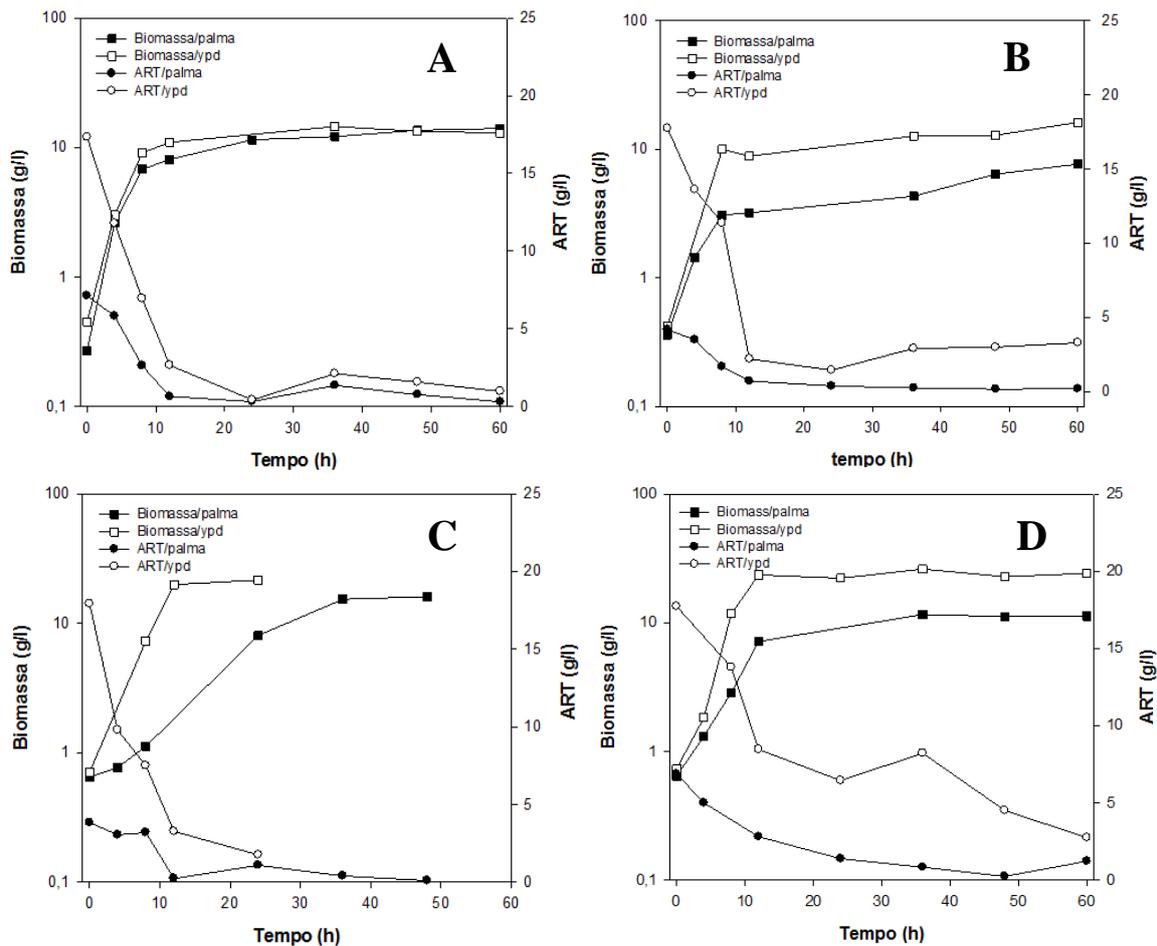


Figura 1. Perfil do crescimento (produção de biomassa e consumo de açúcares) das leveduras (A) *Saccharomyces cerevisiae* Fleischmann®, (B) *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, (C) *Candida utilis* URM115 e (D) *C. lipolytica* cultivadas em extrato de palma ou meio controle (YPD) a 150rpm e 30 °C durante 60 h de incubação.

Os dados de produção de biomassa de *S. cerevisiae* no presente estudo foram maiores do que aqueles observados por Choi et al. (2002) [22] e Choi e Park (2003) [23] que utilizaram resíduo de palmito chinês como substrato e obtiveram aproximadamente 6g/L de biomassa para esta levedura, após 24h de cultivo. Estes autores demonstraram menor rendimento de biomassa devido à alta concentração de açúcares, em torno de 18 g/L. Por outro lado, Gélinas e Barrette (2007) [24] obtiveram 27,6 g/L de biomassa da *S. cerevisiae* utilizando amido resultante da fabricação de batatas tipo Chips, suplementado com glicose como substrato.

Yüzgeça et al. (2009) [25] observaram que *S. cerevisiae* consumiu mais de 95% ($X=7\text{g/L}$) da fonte de carbono do substrato residual de melaço em 1,5 h de crescimento. Estes resultados são comparáveis aos obtidos com *S. cerevisiae* Fleischmann® cultivada em extrato de *O. ficus-indica*. Tal comportamento pode estar relacionado à presença de polissacarídeos e oligossacarídeos no extrato de palma, que permitem grande consumo de açúcares após hidrólise das estruturas complexas, resultando em grandes concentrações de carboidratos monoméricos disponíveis [26].

3.1.2 *Kluyveromyces marxianus* em Extrato de *Opuntia ficus-indica*

A levedura *K. marxianus* apresentou baixa produção de biomassa em extrato de *O. ficus-indica* com desaceleração do crescimento a partir de 8 h de incubação, sendo observado um leve aumento da biomassa até o final do cultivo (Figura 1B). Os resultados permitiram observar uma menor produção de biomassa ($X= 7,32\text{ g/L}$) e produtividade ($P= 0,47\text{g/L.h}^{-1}$). Apesar da baixa

concentração de açúcares redutores no início do cultivo (4,17 g/L), cerca de 95,68% (3,99 g/L) foi consumida durante o crescimento, valor próximo ao observado para a linhagem controle de *S. cerevisiae* em extrato de palma. Em meio YPD, 81,5% (14,46 g/L) do total de glicose foi consumido no mesmo período. A menor concentração de açúcar no extrato de palma levou ao maior rendimento de biomassa da *K. marxianus* neste substrato. Além disso, esta levedura apresentou uma menor taxa específica de crescimento em extrato de palma e YPD ($\mu_{\max} = 0,25$ e $0,39 \text{ h}^{-1}$, respectivamente).

Em relação ao pH médio no extrato de palma para *K. marxianus*, houve grande variação dos valores, com tendência a formação de substância de caráter básico e consequentemente o aumento de pH que variou entre 4,2 – 5,8. No entanto, o pH manteve-se ácido durante todo o cultivo. No meio YPD, o microrganismo apresentou variação de pH entre 5,7- 6,3 ao longo do crescimento.

Os valores de biomassa obtidos durante o cultivo de *K. marxianus* foram menores ($X = 7,32 \text{ g/L}$) quando comparados ao estudo realizado por Hang et al. (2003) [27], que avaliaram a produção de biomassa durante 24h de crescimento por *K. marxianus* NRRLY-610 em resíduo de ensilagem de milho, produzindo acima de 13 g/L de matéria seca, com consumo completo de ácido lático, ácido acético e etanol.

Ghaly e Kamal (2005) [28], utilizaram biorreator de bancada para produção de “Single Cell Protein” (SCP) com *K. marxianus* em substrato de soro de queijo, obtendo uma taxa de crescimento específico $\mu_{\max} = 0,23 \text{ h}^{-1}$. Valores semelhantes foram obtidos com extrato de palma ($\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$) após cultivo da levedura em frasco aerado, demonstrando o potencial deste substrato para cultivo da *K. marxianus*.

3.1.3 *Candida utilis* em Extrato de *Opuntia ficus-indica*

A levedura *C. utilis*, cultivada em extrato de palma apresentou um metabolismo mais lento que as demais leveduras testadas, sendo observado o início da fase estacionária após 36 horas de cultivo (Figura 1C). Em meio YPD, esta linhagem se comportou de forma semelhante as demais leveduras, com desaceleração do crescimento após 12 horas de cultivo. O consumo dos açúcares redutores presentes nos substratos durante as primeiras 12 h de cultivo foi mais evidente, representando quase a totalidade de sua concentração.

Assim como a *K. marxianus* CBS6556, a linhagem *C. utilis* URM115 também apresentou baixa produção de biomassa em extrato de palma ($X = 7,38 \text{ g/L}$). Este valor é 53,67% menor que o obtido pela *S. cerevisiae* ($X = 13,75 \text{ g/L}$) no extrato. A taxa de crescimento específica de *C. utilis* no extrato de palma foi extremamente baixa ($\mu_{\max} = 0,06 \text{ h}^{-1}$), assim como sua produtividade ($P = 0,31 \text{ g/L.h}^{-1}$).

O maior consumo de açúcares redutores totais foi observado em meio YPD, chegando a 90,1% (16,15 g/L) da concentração inicial. No entanto, o consumo de açúcares redutores totais no extrato de palma, foi de 2,74 g/L, equivalente a 71,40% do total presente no meio regional. Este comportamento justifica o maior rendimento de biomassa para *C. utilis* em extrato de palma ($Y_{x/s} = 2,69$), sendo o dobro do valor obtido em YPD. Este valor de rendimento foi maior que o obtido por *S. cerevisiae* em extrato de palma. O pH médio em extrato de palma variou de 4,2 - 5,4, apresentando uma tendência à formação de substância de caráter alcalino, assim como em meio YPD, no qual ocorreu variação entre 5,7- 6,8.

Os resultados de biomassa produzida por *C. utilis* URM115, tanto em extrato de palma ($X = 7,38 \text{ g/L}$) quanto em YPD ($X = 20,8 \text{ g/L}$), foram menores que os valores observados por Gélinas e Barrette (2009) [24], que obteve $X = 26,6 \text{ g/L}$. Entretanto, o resultado de produção de biomassa de *C. utilis* foi superior ao estudo realizado por Gomes (2005) [29] quando cultivou esta em extrato de cabeça de camarão obtendo $X = 1,8 \text{ g/L}$ e relata sobre a suplementação com glicose que o levou ao aumento da biomassa para $X = 8,2 \text{ g/L}$, além da melhora na taxa de crescimento, que aumentou de $\mu_{\max} = 0,27$ para $0,32 \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, o consumo de açúcar descrito por Nascimento (2008) [30] para o mesmo hidrolisado de camarão, adicionado de melaço, foi de 75% do valor inicial com produção de biomassa de $X = 6,1 \text{ g/L}$ em biorreator, sendo comparável ao valor obtido com o experimento aqui apresentado, com extrato de palma.

3.1.4 *Candida lipolytica* em Extrato de *Opuntia ficus-indica*

A levedura *C. lipolytica* URM1120 apresentou elevada produção de biomassa, tanto em extrato regional de palma, como no meio YPD. A levedura entrou na fase estacionária após 12h de cultivo em YPD, coincidindo com a fase estacionária do extrato de palma (Figura 1D). O consumo dos açúcares redutores totais foi mais lento em ambos os meios de cultivo. Esta levedura apresentou $X=10,93$ g/L de biomassa produzida em extrato de Palma. A produção de biomassa em extrato foi 43% menor do que o valor obtido em YPD ($X= 25,33$ g/L). No entanto, o rendimento de biomassa foi 1,72 vezes maior em extrato de palma quando comparado ao meio YPD, obtendo produtividade para o extrato regional de $0,58$ g/L. h^{-1} , valor menor que o observado em YPD ($1,89$ g/L. h^{-1}). O consumo dos açúcares redutores foi de $4,31$ g/L (79,90% do total) e $17,25$ (93% do total) em substrato de palma e YPD, respectivamente.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* comercial e *Candida lipolytica* URM1120 cultivadas em extrato de palma apresentaram produção de biomassas compatíveis, assim como a produtividade; ambas apresentaram valores maiores que os alcançados por *K. marxianus* e *C. utilis*. A relação rendimento da biomassa x consumo de açúcar, demonstrou que a levedura *C. lipolytica* apresentou melhor desempenho quando comparada com *S. cerevisiae*. Em paralelo foi possível evidenciar desempenho próximo à levedura *C. utilis*, que obteve o maior valor de rendimento ($Y_{x/s} = 2,69$).

Crolla e Kennedy (2004) [31], utilizando substrato de n-parafina como a fonte de carbono para produção de ácido cítrico na fermentação de *C. lipolytica* NRRL-Y-1095 em reator de bancada, observaram o início da fase estacionária com 36h de crescimento sendo atribuída aos efeitos da agitação no processo de fermentação, e obtiveram concentração de biomassa celular de $X= 9$ g/L. Estes dados foram comparáveis aos obtidos no presente trabalho que também demonstrou valores de biomassa superiores aos descritos no estudo realizado por Cazetta e Celligoi (2005) [32] ao empregar meio de melão a 10% para o cultivo de *C. lipolytica*, obtendo $X= 6,09$ g/L de biomassa.

Uma vez que os resultados demonstraram a habilidade de *S. cerevisiae* Fleischmann® em obter um crescimento satisfatório no extrato de palma, esta levedura foi utilizada como microrganismo referência (controle). *C. lipolytica* URM1120 foi a levedura que mais se aproximou do perfil cinético da *S. cerevisiae* demonstrando valores de produção de biomassa $X= 10,93$ g/L e produtividade em 24 horas de cultivo ($P= 0,58$ g/L. h^{-1}) elevados em relação às demais leveduras. A taxa de crescimento específica foi metade do valor observado em *S. cerevisiae* ($\mu_{max} = 0,40$ h^{-1}), sendo semelhante à de *K. marxianus* ($\mu_{max} = 0,25$ h^{-1}). Entretanto, mesmo com uma taxa de crescimento específico ($\mu_{max}= 0,20$) relativamente baixa, a produção de biomassa *C. lipolytica* URM1120 foi maior que *K. marxianus* CBS 6556 e *C. utilis* URM115, indicando que o metabolismo da *Candida lipolytica* está direcionado para a conversão do substrato em biomassa e não em metabólitos secundários (álcoois e carboidratos), como ocorre com *S. cerevisiae* com o etanol e a *Xanthomonas campestris* com a goma xantana [33]. Tais resultados levaram à escolha da *C. lipolytica* como levedura de melhor potencial biotecnológico visando à produção de proteínas em extrato de *O. ficus-indica*.

Vários estudos mostraram a capacidade de *C. lipolytica* para crescer em substratos residuais e regionais como única fonte de carbono disponível. Tal afirmação pode ser justificada pelos seus genes em evolução que codificam diversas biomoléculas [34,35]. *C. lipolytica* é um microrganismo modelo usado para produzir substratos hidrofóbicos metabolizadores de lipídios e biomoléculas de interesse biotecnológico [36].

3.2 Crescimento de *Candida lipolytica* em extrato de *Opuntia ficus-indica* sob estresse salino

A aplicação de leveduras em processos biotecnológicos tradicionais, como panificação, fabricação de cerveja, fermentação de destilarias e produção de vinho, implica na sua exposição a várias condições de estresse ambiental. Tolerância a situações de estresse é a chave para o aumento efetivo das leveduras industriais, tendo em vista um conjunto de respostas fisiológicas sob tais condições [37]. A eficiência desses processos em uma determinada variedade de

leveduras determina sua robustez e, em grande parte, se é capaz de atuar nos padrões comerciais necessários no processo industrial [38].

Alterações no processo fermentativo tais como o estresse osmótico é uma condição importante na produção de biomassa e fermentação alcoólica [39]. O perfil de crescimento da levedura *C. lipolytica* URM1120 sob condições de estresse salino foi avaliado utilizando NaCl e KCl como aditivos ao extrato de *O. ficus-indica*. O meio YPD foi usado como padrão de crescimento. Em extrato de palma, a estrutura celular da *C. lipolytica* demonstrou ser mais alongada com raras aparições de estruturas ovaladas, sendo observada a presença de pseudohifas para aumentar a área de absorção de nutrientes (Figura 2).

A levedura *C. lipolytica* apresenta como seu teleomorfo a levedura *Yarrowia lipolytica*, sendo caracterizada morfológicamente pela formação de pseudomicélio em meio líquido [40,41]. Roostita e Fleet [42] avaliaram a influência da concentração salina e temperatura sobre o crescimento de *C. lipolytica* em leite, juntamente com *Debaryomyces hansenii*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *C. catenulata*. Neste trabalho, os autores demonstraram que as taxas de crescimento específico e a densidade celular máxima diminuíram quando a concentração de NaCl no leite foi aumentada de 0 para 15%. Shahzad et al. [43] observaram a potencialização do crescimento de arroz em estresse salino com o uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas.

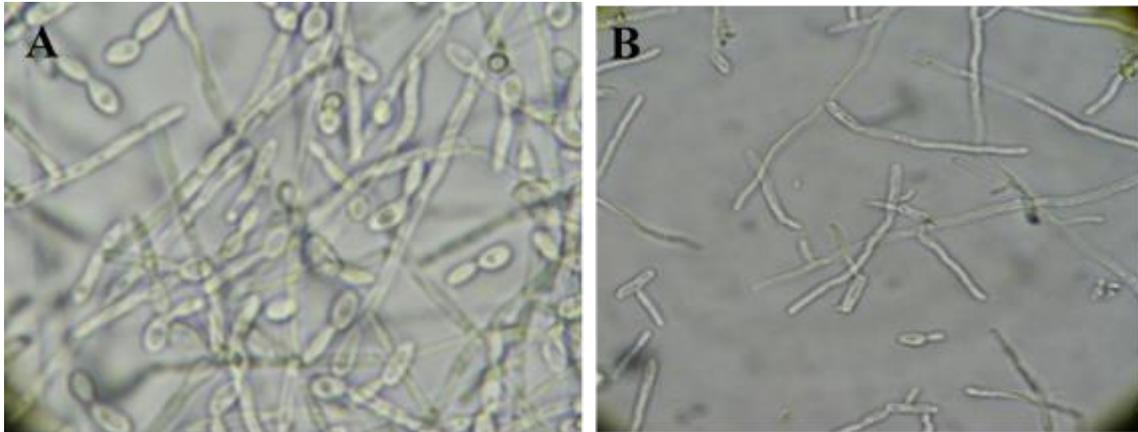


Figura 2. *Candida lipolytica* URM1120 cultivada sob estresse salino de NaCl 0,5M em meio YPD (A) e em extrato de palma (B) com 12h de crescimento em frasco aerado a 30°C em rotação de 150rpm. (40x + Zoom).

O estresse osmótico é uma condição desfavorável para as células de leveduras uma vez que a regulação hídrica é essencial para o metabolismo celular. Quando células são expostas ao meio hiperosmótico ocorre a perda de água citoplasmática e os mecanismos metabólicos são iniciados para regular a desidratação e proteger a estrutura celular dos possíveis danos, desenvolvendo como resposta molecular a tolerância e resistência osmótica [44]. O conhecimento do estresse e da resposta ao estresse é crucial para a compreensão de como os organismos unicelulares e multicelulares se adaptam às mudanças das condições [45].

Considerando que o sal pode ser um componente inibitório do crescimento de microrganismos, a levedura *C. lipolytica* URM1120 foi submetida ao crescimento em condições de estresse salino. As células da levedura *C. lipolytica*, quando testadas com NaCl e KCl em resposta às mudanças do potencial osmótico, aumentaram a concentração intracelular dos íons de K^+ e Na^+ . Os testes realizados demonstraram que o cloreto de sódio (NaCl) levou à redução máxima de 31% da produção de biomassa celular quando utilizou a concentração de 0,50M. O aumento da concentração para 1M levou à redução de 37,6% na produção de biomassa. As concentrações de 2M e 4M de NaCl não foram compatíveis com o crescimento celular (Figura 3).

Quando os experimentos foram realizados com cloreto de potássio (KCl) houve inibição da taxa de crescimento a partir da concentração de 0,50M, demonstrando maior sensibilidade desta levedura ao respectivo sal (Figura 3). Concentrações de KCl a 0,10 M e 0,25M levaram à redução na produção de biomassa nas proporções de 22,5 e 36,8 %, respectivamente. No entanto, para a concentração de 0,50M, o valor de biomassa produzida reduziu 81,7%, demonstrando grande

impacto na viabilidade celular. Comportamento semelhante pode ser observado na concentração de 1M que resultou em 90% de decaimento na produção celular. As concentrações de 2M e 4M foram completamente inibitórias para o crescimento da levedura.

Uma levedura de boa qualidade deve apresentar fermentação vigorosa com uma fase latente curta e segura, características de fermentação reprodutíveis, comportamento previsível e ser tolerante e resistente a estresses adversos [39]. O conhecimento do comportamento de leveduras comerciais em processos fermentativos é essencial, visto que durante a fermentação, as células estarão sujeitas a um ou mais condicionantes de estresse. O estresse salino pode ser uma característica vital para melhorar a produção e a tolerância da cultura [46].

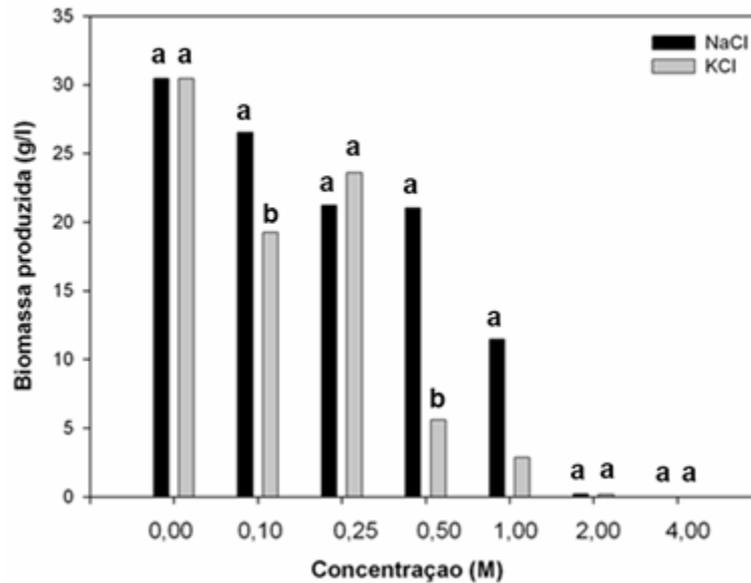


Figura 3. Produção de biomassa por *Candida lipolytica* URM1120 cultivada em extrato de palma contendo diferentes concentrações de NaCl e KCl. O crescimento da levedura ocorreu durante 60h de incubação a 30 °C sob agitação de 150rpm. Letras diferentes na comparação entre NaCl e KCl indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

É possível observar que o KCl apresentou maior efeito inibitório no crescimento celular em todas as concentrações comparado ao NaCl. *C. utilis* URM 1120 exibiu maior sensibilidade a KCl a partir da concentração de 0,50 M. Quanto ao NaCl, a levedura demonstrou sensibilidade a partir da concentração de 1M. Resultados semelhantes foram descritos por Almagro et al. [17], para íons sódio, onde os efeitos deste sal sobre o crescimento da *D. hansenii* e *S. cerevisiae* foi influenciado fortemente a partir da concentração de 1M.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos sugerem que o extrato de *O. ficus-indica* pode ser utilizado para o crescimento das leveduras utilizadas neste trabalho, apresentando potencial para aplicações na área biotecnológica. O uso da palma forrageira como substrato alternativo na fermentação de leveduras para obtenção de biomassa microbiana foi satisfatório. É possível que este bioproduto apresente ampla aplicabilidade uma vez pode ser empregado para uma provável produção de biomoléculas funcionais, enzimas, substâncias bioativas, *Single Cell Protein* - SCP e nanopartículas. Tais compostos são de crescente interesse nas indústrias de alimentos, química, agrícola, de biocombustíveis e farmacêuticas.

Nos ensaios experimentais sob estresse salino, a levedura *C. lipolytica* URM1120 apresentou tolerância às concentrações de até 1M de NaCl e 0,5M de KCL. Tais resultados sugerem que a levedura *C. lipolytica* demonstrou ser um microrganismo resistente ao estresse iônico, apresentando potencial fisiológico específico para produção de biomoléculas funcionais e seus

bioprodutos. Contudo, são necessários estudos acerca da sua fisiologia e genética, permitindo uma maior aplicabilidade e segurança desta levedura.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia Desenvolvimento (CNPq) e pela Coordenação para o Melhoramento do Pessoal de Educação de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sepúlveda E, Sáenz C, Aliaga E, Aceituno C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *J Arid Environ*. 2007 Aug;68(4):534-45, doi:10.1016/j.jaridenv.2006.08.001.
2. El -Mostafa K et al. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 2014 Sep;19(9):14879-901, doi:10.3390/molecules190914879.
3. Iturriaga LB. Potencialidades del uso de mucílago de tuna em alimentos. *CactusNet*. 2005;10:21-27.
4. Sáenz-Hernandez C. Utilización agroindustrial del nopal. Roma: FAO. 2006.
5. Kaur M, Kaur A, Sharma R. Pharmacological actions of *Opuntia ficus-indica*: a review. *J Appl Pharm Sci*. 2012 Jul;2(7):15-18, doi:10.7324/JAPS.2012.2703.
6. Allegra A, Inglese P, Sortino G, Settanni L, Todaro A, Liguori G. The influence of *Opuntia ficus-indica* mucilage edible coating on the quality of ‘Hayward’ kiwifruit slices. *Postharvest Biol Technol*. 2016; 120:45-51, doi:10.1016/j.postharvbio.2016.05.011.
7. Allegra A, Sortino G, Inglese P, Settanni L, Todaro A, Gallotta A. The effectiveness of *Opuntia ficus-indica* mucilage edible coating on postharvest maintenance of ‘Dottato’ fig (*Ficus carica* L.) fruit. *Food Packaging Shelf Life*. 2017 Apr;12(2017):135-41, doi:10.1016/j.fpsl.2017.04.010.
8. Wayland, Ruiz. Origen de la energía del nopal. Disponível em: <<http://www.elquiglobalenergy.com/>> Acesso em 14 de agosto. 2017.
9. Jigar E, Sulaiman H, Asfaw A, Bairu A. Study on renewable biogas energy production from cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *J Food Agric Sci*. 2011 Dec;1(3):44-8.
10. Dubeux Jr JC, Santos MVF, Cavalcante M, Santos DC. Potencial de la tuna en Sud América (Potential of cactus pear in South America). *Cactusnet Newsletter*. 2013 Jan;13:29-40.
11. Jacques N, Casaregola S. Safety assessment of dairy microorganisms: The Hemiascomycetous yeasts. *Inter J Food Microbiol*. 2008 Sep;126(3):321-6, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020.
12. Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress Lipid Research*. 2015 Jan;57:40-54, doi:10.1016/j.plipres.2014.12.001.
13. Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T, Vicente AA. Yeast: the soul of beer’s aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Mar;98(5):1937-49, doi:10.1007/s00253-013-5470-0.
14. Zhou J, Du G, Chen J. Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;25:17-23, doi:10.1016/j.copbio.2013.08.009.
15. Marienhagen J, Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J Biotechnol*. 2013 Jan;163(2):166-78, doi:10.1016/j.jbiotec.2012.06.001.
16. Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb Cell Fact*. 2014 Jan;13:12, doi:10.1186/1475-2859-13-12.
17. Almagro A et al.. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Inter J Food Microbiol*. 2000 Jul;56:191-7, doi:10.1016/S0168-1605(00)00220-8.
18. Chi Z, Liu G-L, Lu Y, Jiang H, Chi Z-M. Bio-products produced by marine yeasts and their potential applications. *Bioresource Technol*. 2016 Dec;202:244-52, doi:10.1016/j.biortech.2015.12.039.
19. Ausubel FM et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th .Ed Willey, 2002.
20. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 1959;31(3):426-8, doi:10.1021/ac60147a030.
21. Pirt SJ. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975.
22. Choi MH, Ji GE, Koh KH, Ryu YW, Jo DH, Park YH. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. *Bioresource Technol*. 2002 Jul;83(3):251-3, doi:10.1016/S0960-8524(01)00232-2.
23. Choi MH, Park YH. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. *Biomass and Bioenergy*. 2003;25:221-6, doi:10.1016/S0961-9534(02)00194-0.

24. Gélinas P, Barrette J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technol.* 2007 Jun;98(5):1138-43, doi:10.1016/j.biortech.2006.04.021.
25. Yüzgeç U, Türker M, Hocalar A. On-line evolutionary optimization of an industrial fed-batch yeast fermentation process. *ISA Transactions.* 2009 Oct;48:79-92, doi:10.1016/j.isatra.2008.09.001.
26. Menezes RSC, Simões DA, Sampaio EVSB. A Palma no Nordeste do Brasil: Conhecimentos Atual e novas Perspectivas de Uso. Recife: Editora Universitária- UFPE, 258p. 2005.
27. Hang YD, Woodams EE, Hang LE. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technol.* 2003 Feb;86(3):305-7, doi:10.1016/S0960-8524(02)00170-0.
28. Ghaly AE, Kamal MA. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res.* 2005 Feb;38(3):631-44, doi:10.1016/j.watres.2003.10.019.
29. Gomes E. P., Martins, D.B.G., Wiggers, F.N., Lima Filho, J.L. Industrial Shrimp Waste utilized for *Candida utilis* production. Recife- PE. SINAFERM 2005.
30. Nascimento, G A. Análise do Potencial da *Candida utilis* para Produção de Biomassa Utilizando Resíduos Agroindustriais Como Substrato.2008. Dissertação- (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, 2008. Disponível em: http://repositorio.ufpe.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2179/arquivo9635_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y
31. Crolla A, Kennedy KJ. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. *J Biotechnol.* 2004 May;110:73-84, doi:10.1016/j.jbiotec.2004.01.007.
32. Cazetta LM, Celligoi, MAPC Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 26, n. 2,105-112, jul./dez. 2005. doi:10.5433/1679-0375.2005v26n2p105.
33. Iwatani S, Yamada Y, Usuda Y. Metabolic Flux Analysis In Biotechnology Processes. *Biotechnological Letters.* 2008 30;791-799, doi:10.1007/s10529-008-9633-5.
34. Rufino RD, Luna JM, Campos-Takaki GMC, Sarubbo LA. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron J Biotechnol.* 2014;17:34-8, doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006.
35. Beopoulos A, Chardot T, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie.* 2009;91:692-6, doi:10.1016/j.biochi.2009.02.004
36. Souza AF et al. Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1608, doi:10.3390/ijms17101608.
37. Attfield PV. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol.* 1997;15:1351-1357, doi:10.1038/nbt1297-1351.
38. Ramos CL, Duarte WF, Freire AL, Dias DR, Eleutherio ECA, Schwan RF. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2013;44:935-944, doi:10.1590/S1517-83822013005000051.
39. Zuzuarregui A, Olmo MD. Analysis of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2004 May;85(4):271-280. doi:10.1023/B:ANTO.0000020162.21248.53.
40. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and Identification.* 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press. 2000.
41. Knutsen AK et al. Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. *Inter J System Evolutionary Microbiol.* 2007 Oct;57:2426-35, doi:10.1099/ijms.0.65200-0.
42. Roostita R, Fleet GH. The occurrence and growth of yeast in Camembert and Blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol.* 1996 Aug;31(1-3):205-19, doi:10.1016/0168-1605(95)00018-6.
43. Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Waqas M, Sang-Mo K, In-Jung L. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environ Exp Bot.* 2017;136:68-77, doi:10.1016/j.envexpbot.2017.01.010.
44. Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *Fems Microbiology Reviews.* 2000 Oct;24(4):469-486, doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00551.x
45. Hohmann, Stefan, Mager, Willem H. *Yeast Stress Responses.* Editors: Hohmann, Stefan, Mager, Willem H. Topics in Currents Genetics 1, Springer – Verlag, Berlin – Heidelberg, 2003.
46. Khan AL, Waqas M, Asaf S, Kamran M, Shahzad R, Bilal S, Khan MA, Kang SM, K YH, Yun BW, Rawah A A, Harrasi AA, Lee I J. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. *Environmental and Experimental Botany.* 2017;133:58-69, doi:10.1016/j.envexpbot.2016.09.009.