

ANA PAULA RODRIGUES DE CASTRO ORNELAS

**ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM *Kluyveromyces marxianus*
var. lactis NA FASE DE DESACELERAÇÃO DO CRESCIMENTO EM
SORO DE QUEIJO ULTRAFILTRADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

ANA PAULA RODRIGUES DE CASTRO ORNELAS

**ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM *Kluyveromyces marxianus*
var. lactis NA FASE DE DESACELERAÇÃO DO CRESCIMENTO EM
SORO DE QUEIJO ULTRAFILTRADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 5 de setembro de 2001.

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho
(Conselheiro)

Prof. Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof. Frederico José V. Passos

Dr^a. Virgínia Maria Chaves Alves

Prof. Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo.

Aos meus pais, Nelson e Mary *in memoriam*.

Ao meu amado esposo, Victor.

Ao meu querido irmão, Rodrigo.

Ao meu lindo filho, João Victor.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria” (Pv 1, 7).

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia Agrícola e ao Núcleo de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO).

À FAPEMIG, pela concessão das bolsas de estudo.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação, pelo apoio, pela amizade, pela confiança e pela dedicação, imprescindíveis a este trabalho.

Aos professores Jorge Luiz Cavalcante Coelho e Célia Alencar de Moraes, pela colaboração e pelas sugestões oportunas.

Aos meus pais, Nelson Paulo de Castro e Mary Eloíse Rodrigues de Castro, pelo esforço que fizeram enquanto existiram, para que eu pudesse estudar e ter uma profissão.

Ao meu marido, Victor Bouzada Ornelas, pelo apoio, pela compreensão, pelo amor, pelo carinho e por ser um grande companheiro e amigo de forma incondicional.

Ao meu filho, João Victor de Castro Ornelas, que durante os nove meses colaborou muito para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao meu irmão, Rodrigo Paulo de Castro, por ele existir e ser sempre disponível, o que me ajudou muito.

Ao meu Pastor, Getúlio de Oliveira Fagundes e a sua esposa e amiga Vanja Medonça Fagundes, pela amizade, carinho e incentivo.

À Igreja Evangélica Assembléia de Deus-Missão de Viçosa pelas orações.

À amiga Cláudia, por tudo que me ensinou, pela amizade e pelo carinho.

Ao amigo Fábio, pelas incansáveis ajudas, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismo, Leonardo, Lízia, Evandro, Cássia, Ann, Poliana, Otávio, Marcelo, Fábiana, Wendel e Ximena, e à técnica de nível superior Virgínia, pela amizade e pelas contribuições a este trabalho.

A todos funcionários da Microbiologia e do BIOAGRO, em especial a Laura, Nilcéia, Aparecida, Sr.Toninho, Sr. Cesário e Sr. Paulo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANA PAULA RODRIGUES DE CASTRO ORNELAS, filha de Nelson Paulo de Castro e Mary Eloíse Rodrigues de Castro, nasceu no Rio de Janeiro-RJ, no dia 18 de novembro de 1974.

Em março de 1999, graduou-se em Nutrição, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, iniciando, em seguida, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de Mestrado, na mesma Instituição, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em setembro de 2001.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> , aplicação e potencial fisiológico.....	3
2.2. Assimilação de lactose e regulação da síntese de β -galactosidase	6
2.3. Síntese de β -galactosidase durante o cultivo de <i>Kluyveromyces lactis</i>	8
2.4. Fases fisiológicas de culturas de leveduras	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. <i>Kluyveromyces lactis</i>	15
3.2. Meio de cultivo e produção do inóculo.....	15
3.3. Cultivo em batelada e definição das fases fisiológicas da cultura.....	16
3.4. Cultivo contínuo	16
3.5. Métodos analíticos.....	17
3.5.1. Medida de crescimento.....	17

	Página
3.5.2. Microscopia.....	17
3.6. Atividade de β -galactosidase	18
3.7. Análise do consumo de lactose e formação e consumo de produtos metabólicos	18
3.8. Detecção de β -galactosidase intracelular e extracelular	19
3.9. Eletroforese de proteínas	20
3.10. Cinética da atividade de β -galactosidase em função da concentração de lactose no meio	20
4. RESULTADOS	22
4.1. Caracterização das fases fisiológicas de <i>Kluyveromyces lactis</i> em soro de queijo ultrafiltrado	22
4.2. Morfologia de <i>Kluyveromyces lactis</i> durante as diferentes fases fisiológicas do crescimento.....	24
4.3. Atividade de β -galactosidase, consumo de lactose, formação e consumo de etanol nas distintas fases fisiológicas de <i>Kluyveromyces lactis</i> em soro de queijo ultrafiltrado	27
4.4. Cinética da atividade de β -galactosidase em função da concentração de lactose no meio.....	29
4.5. Cultivo contínuo	32
4.6. Detecção de β -galactosidase intra e extracelular	34
5. DISCUSSÃO	38
6. RESUMO E CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

ORNELAS, Ana Paula Rodrigues de Castro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2001. **Atividade de β -galactosidase em *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* na fase de desaceleração do crescimento em soro de queijo ultrafiltrado.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (*K. lactis*) foi cultivada em soro de queijo ultrafiltrado (SUF) em regimes de batelada e contínuo com o objetivo de investigar as condições fisiológicas que levam ao aumento e à queda da atividade de β -galactosidase na entrada da fase de desaceleração do crescimento. As fases fisiológicas do crescimento no cultivo em batelada foram caracterizadas, e observou-se que as concentrações iniciais de células de DO₆₀₀ 0,1, 0,2 e 0,3 afetam a velocidade de crescimento, porém a delimitação das fases de crescimento é semelhante. A fase estacionária do crescimento foi apenas iniciada em 144 horas, o que permitiu uma longa fase de desaceleração do crescimento. O aumento e a queda na atividade de β -galactosidase foram acompanhados durante os cultivos, assim como a utilização de lactose e a formação e o consumo de etanol, além do perfil eletroforético da β -galactosidase intra e extracelular. Os picos de atividade máxima da enzima

foram encontrados no final da fase log e no início da fase de desaceleração nas culturas conduzidas em regime de batelada e no cultivo contínuo na taxa de diluição de $0,09\text{ h}^{-1}$. Nessas condições, as concentrações de lactose no meio não se correlacionaram com o máximo de atividade da enzima. Após a queda da atividade máxima, havia ainda lactose no meio e o etanol em concentrações crescentes. Desta forma, a queda na atividade não está relacionada com a exaustão de lactose no meio, nem com o crescimento diáuxico à custa do etanol, embora durante a fase de desaceleração do crescimento tenha sido observada diauxia quando a concentração de lactose era limitante. Outros picos de atividade foram evidenciados antes e após o pico máximo, onde foram obtidos os mesmos resultados. A β -galactosidase das amostras das culturas em batelada e contínua foi analisada em gel de poliacrilamida desnaturante e indicou a inexistência de uma relação direta entre a atividade da enzima e a concentração da proteína, com exceção nos tempos em que a atividade é máxima, quando houve aumento da intensidade da banda protéica no gel. Nas amostras de sobrenadante de ambas as bateladas e da cultura contínua submetidas à análise em gel, não se encontrou β -galactosidase, indicando que o etanol produzido não permeabilizou *K. lactis*. Cerca de 55 a 69% da lactose em ambos regimes de cultivo, foram convertidos em etanol. E, a variação cíclica da cinética de atividade durante o cultivo em regime de batelada e regime contínuo pode ser explicada pelos eventos de regulação da síntese e da atividade de β -galactosidase.

ABSTRACT

ORNELAS, Ana Paula Rodrigues de Castro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September of 2001. **β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* in the late log phase of growth in ultrafiltered cheese whey.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Célia Alencar de Moraes e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

The yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (*K. lactis*) was cultivated in ultrafiltered cheese whey (UCW) in batch and continuous culture with the aim to investigate the physiological conditions that lead to the increase and decrease of the activity of β -galactosidase in the beginning of the late log phase of growth. The physiological growth phases were characterized in the batch culture, and it was observed that the initial cell concentration of OD₆₀₀ 0,1, 0,2 e 0,3 affected the growth velocity. However, the delimitation of the growth phases is similar. The stationary phase of growth started after 144 hours, which enabled a long late log phase of growth. The increase and the decrease in the β -galactosidase activity were monitored during the cultivation, as well as the use of lactose, the formation and consumption of ethanol as well as the electrophoretical profiles of intra cellular and extra cellular β -galactosidase. The peaks of maximum activity of the enzyme were found in

the end of the log phase, and in the beginning of the late log phase in batch culture, and in the continuous culture at the dilution rate of 0,09 h⁻¹. Under these conditions, the lactose concentrations in the medium did not correlate with the maximum activity of the enzyme. After the maximum activity, there was still lactose in the medium and a rising concentration of ethanol. Therefore, the decrease of activity is not related to the exhaustion of lactose in the medium nor with the diauxic growth due to the ethanol. Albeit, during the late log phase of growth slight diauxic growth was observed when the lactose concentration was limiting. Other peaks of activity were noticed before and after the maximum peak, where the same results were obtained. β -galactosidase of the batch and continuous culture samples was analyzed in denaturing polyacrylamide gel and showed that a direct relationship between the enzyme activity and the protein concentration does not exist, except in the maximum activity times, when there was some increase in intensity in the proteic band of the gel. In the supernatant samples of both batch and continuous culture submitted to gel electrophoresis, β -galactosidase was not found, implying that the ethanol produced did not permeabilize *K. lactis*. Fifty five to sixty nine percent of the lactose in both cultures was converted to ethanol. And, the cyclical variation in the kinetic of the activity during the cultivation in batch and continuous culture can be explained through the regulation events of the synthesis and the activity.

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Kluyveromyces marxianus var. lactis* (*K. lactis*) possui grande potencial biotecnológico e tem sido tradicionalmente empregada na produção de β -galactosidase, para hidrólise da lactose no leite e seus derivados. Recentemente, tem atraído a atenção como hospedeira na produção de proteínas recombinantes de interesse industrial.

A habilidade de assimilar lactose via permease e β -galactosidase intracelular permite o cultivo dessas leveduras em soro de queijo, subproduto de baixo custo e altamente disponível. O soro de queijo contém lactose e proteínas, além de algumas vitaminas e minerais. As proteínas contidas neste soro, especialmente α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, podem ser aproveitadas pela indústria alimentícia, após separação e concentração por ultrafiltração. Entretanto, a lactose e os sais freqüentemente presentes no soro, em razão de seu menor valor agregado, são freqüentemente descartados no efluente, o que gera poluição ambiental. Desta forma, a utilização do soro de queijo como meio de cultura está entre as opções convenientes para o seu aproveitamento.

A produção de β -galactosidase pela *K. lactis* tem sido estudada extensivamente, e o consenso é de que sua indução na presença de lactose está associada ao estado fisiológico da cultura e aumenta em pulsos durante o

cultivo em batelada. A atividade da enzima por unidade de concentração de células é máxima na entrada da fase estacionária do crescimento em batelada, caindo em seguida, quando a lactose ainda é detectada no meio.

Acredita-se que o aumento da atividade de β -galactosidase esteja relacionado com a concentração ideal de lactose no meio, resultando na indução do lac-gal regulon. Já a queda da atividade pode ser causada por inúmeros fatores fisiológicos que determinam essa fase do crescimento, entre os quais a resposta ao estresse nutricional e aos produtos do metabolismo primário, como etanol. A oxidação posterior do etanol pode aumentar a massa de células desproporcionalmente à produção de β -galactosidase, o que levaria à diluição da enzima. Sinais externos também podem levar a célula a canalizar a sua energia para sintetizar outras proteínas que lhe garantam a assimilação dos nutrientes remanescentes no meio, pois, na fase de desaceleração do crescimento populacional em batelada, observa-se o aumento de proteínas secretadas, como fosfatases, proteases e permeases, entre outras. Finalmente, a permeabilização da membrana pelo etanol poderia resultar na liberação da β -galactosidase no sobrenadante, reduzindo sua atividade intracelular.

Diante de tantas questões não esclarecidas, este trabalho teve como objetivo investigar as condições fisiológicas que levam ao aumento e à queda da atividade de β -galactosidase por *K. lactis* cultivada em soro de queijo ultrafiltrado, durante a fase de desaceleração do crescimento populacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Kluyveromyces lactis*, aplicação e potencial fisiológico

A levedura *K. marxianus* var. *lactis* (*K. lactis*), anteriormente classificada como *Saccharomyces lactis* (Dombrowski, 1910, citado por BONEKAMP e OOSTEROM, 1994), pertence à família *Saccharomycetaceae*, subfamília *Saccharomycetoideae*, tendo sido reclassificada em 1984 devido à incapacidade de cruzamento com *Saccharomyces cerevisiae* (Van der Walt e Johannson, 1984, citados por BONEKAMP e OOSTEROM, 1994).

O FDA (*Food and Drug Administration*) reconhece a *K. lactis* como microrganismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), o que a qualifica para aplicações de interesse na alimentação e na saúde humana e animal. Ainda, confirma que sua presença em produtos lácteos é normal e até mesmo necessária, não tendo nenhum relato de toxicidade e patogenicidade sido relacionado à presença dessa levedura em alimentos (BONEKAMP e OOSTEROM, 1994). Além disto, *K. lactis* é uma das poucas leveduras na natureza capazes de assimilar a lactose (o açúcar do leite) como única fonte de carbono e energia, o que a torna um microrganismo atrativo para a indústria alimentícia (DICKSON e MARKIN, 1980). Essa característica tem sido investigada ao longo de décadas, e o cultivo de *K. lactis* em soro de queijo tem

surgido como opção prática para o aproveitamento desse subproduto da indústria de queijo.

Nas décadas de 50 e 60, segundo BONEKAMP e OOSTERON (1994), a ênfase foi a produção de biomassa protéica de elevado valor nutricional por *K. lactis* cultivada em soro, para servir como suplemento alimentar ou ração animal. Além disto, sua habilidade de assimilar lactose vem sendo explorada na síntese de β -galactosidase, enzima necessária para crescimento em lactose. Esta enzima é importante na produção de leite hidrolisado e de cápsulas enzimáticas para indivíduos intolerantes á lactose (RICHMOND e GRAY, 1981), e também é utilizada na indústria de alimentos, para estabilizar produtos concentrados do leite e evitar a textura arenosa devido à cristalização da lactose (RICHMOND e GRAY, 1981; KULIKOVA et al., 1990; BONEKAMP e OOSTEROM, 1994; SOMKUTI e HOLSINGER, 1997; CARVALHO, 1999). Atualmente, *K. lactis* tem recebido destaque na produção de proteínas recombinantes (BONEKAMP e OOSTEROM, 1994; INCHAURRONDO et al., 1994), devido à facilidade em manipular geneticamente suas células, pela disponibilidade de vetores integrativos, por sua adaptação em processos fermentativos automatizados em larga escala, pelo lac-gal regulon, que controla a síntese de β -galactosidase, dispondo de um promotor forte e induzido, e finalmente pelo potencial de secretar proteínas recombinantes de alto peso molecular (ENCARNACIÓN e DOMÍNGUES, 1998).

Além dessas aplicações, a capacidade de *K. lactis* crescer em soro de queijo, substrato de baixo custo gerado em grandes volumes pela indústria de queijo, estimula a sua otimização para fins biotecnológicos (ROMANOS et al., 1992; NUNES et al., 1993; BARBA et al., 2001).

O soro de queijo é o fluído obtido após a precipitação da caseína do leite durante a fabricação de queijos. Representa cerca de 85-95% do volume do leite e retém cerca de 55% de seus nutrientes (SISO, 1996). Em geral, sua composição é de 93% de água e de 7% de sólidos totais, distribuídos em 4,9% de lactose, 0,9% de fontes de nitrogênio (0,5% de β -lactoglobulina e α -

lactalbumina e 0,4% de creatinina, creatina, uréia, ácido úrico, aminoácidos e amônia), 0,6% de cinza, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico, além de algumas vitaminas, A, C, B₆, B₁₁, tocoferol, tiamina e riboflavina e minerais, como fosfato, cálcio, potássio, sódio e magnésio (WHITTIER et al., 1950; SMITHERS et al., 1996; SISO, 1996). As proteínas β -lactoglobulina e α -lactalbumina possuem valores nutricional e funcional importantes para a indústria alimentícia e farmacêutica, podendo ser aproveitadas após a separação e concentração por ultrafiltração, em membranas com corte de exclusão na ordem de 10 KDa, formando o permeado ou o soro ultrafiltrado (SUF) (KENNEDY, 1985). No SUF permanece a lactose, os sais e os constituintes de baixo peso molecular, que em razão de seu menor valor agregado são freqüentemente descartados no efluente, constituindo fonte de poluição ambiental (SMITHERS et al., 1996; WIT, 1998). Desta forma, *K. lactis* serve tanto como fonte de β -galactosidase para diversos fins industriais (SISO et al., 1992), quanto como agente para bioconversão do soro de queijo. Além disto, pode promover a fermentação da lactose em etanol (SISO et al., 1996). Mas devido ao potencial de seu metabolismo oxidativo, a produção de etanol por *K. lactis* tem sido negligenciada, embora nos últimos anos, vários pesquisadores tenham reavaliado essa possibilidade em função do reduzido número de microrganismos capazes de metabolizarem lactose a etanol (SISO et al., 2000).

Dessa forma, várias alternativas têm sido estudadas. Uma delas consiste na hidrólise prévia da lactose por β -galactosidase e na subsequente fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), levedura de metabolismo essencialmente fermentativo (CHAMPAGNE e GOULET, 1988). No entanto, quando *S. cerevisiae* usa a mistura glicose e galactose como fonte de carbono, ocorre o crescimento diáuxico e conseqüentemente, a baixa produção de etanol. Outra alternativa atualmente considerada consiste na expressão dos genes do sistema que codificam a β -galactosidase e lactose permease de *K. lactis* em *S. cerevisiae* (Russel, 1986, Sreekrishna e Dickson, 1985 e Farahnak et al., 1986, citados por SISO, 1996). Por enquanto, essas

leveduras recombinantes apresentam baixo crescimento e reduzida estabilidade genética quando cultivadas em biorreatores (JEONG et al., 1991). Ultimamente, alguns estudos têm focalizado o metabolismo respirofermentativo de *K. lactis* no soro, e observa-se que sob condições de baixa aeração a concentração de etanol produzido a partir da lactose não deve ser subestimada ou negligenciada (SISO et al., 1996; KIERS et al., 1998; SISO et al., 2000).

2.2. Assimilação de lactose e regulação da síntese de β -galactosidase

A levedura *K. lactis* assimila lactose, graças à presença dos genes *LAC12* e *LAC4*, que codificam lactose permease e β -galactosidase, respectivamente. Esses genes são controlados no nível transcricional e são co-regulados com os genes *GAL1* (galactoquinase), *GAL7* (galactoepimerase), *GAL10* (galactotransferase), que participam da via Leloir para utilização da galactose (DICKSON e RILEY, 1989). Essa co-regulação é mediada por um ativador transcricional Lac9p ou KlGal4p (homólogo a Gal4p de *S. cerevisiae*). A ativação do Lac9p requer a absorção de lactose, pela lactose permease e atividade de β -galactosidase, pois o indutor deste regulon é a galactose intracelular (BREUNIG et al., 2000).

DICKSON E RILEY (1989) foram os primeiros a propor um modelo para o “lac-gal regulon” de *K. lactis*, nos estados não-induzido e induzido. O centro deste modelo é a proteína reguladora positiva Lac9p, que possui um domínio de ligação no DNA e outro na extremidade carboxílica para interação com a proteína Lac10p (regulador negativo) ou KlGal80p (homólogo a Gal80p de *S. cerevisiae*). No estado não-induzido, ausência de galactose, Lac10p regula negativamente Lac9p, interagindo com seu domínio de ativação. Além disto, a indução basal da expressão do gene *LAC10* por Lac9p em tipos selvagens cria um *loop feedback* negativo, impedindo Lac9p de se ligar ao seu próprio promotor (SCHAFFRATH e BREUNIG, 2000). Segundo ZAICHAIRE E BREUNIG (1993), é a expressão do gene *LAC9* que irá

influenciar a ativação dos genes do lac-gal regulon. Sendo assim, existe um equilíbrio delicado entre ativador e repressor nesse regulon.

No estado induzido ocorre a interação da proteína Lac10p com Gal1p ou KlGal3p (homólogo a Gal3p de *S. cerevisiae*), uma enzima com natureza bifuncional, possuindo, uma atividade de galactoquinase e uma função reguladora, sendo ambas as funções separáveis por mutação. A interação de Lac10p com Gal1p foi confirmada *in vitro* por ZENKE et al. (1993), e depende da atividade reguladora e não da enzimática de Gal1p, além de requerer galactose e ATP, sugerindo que a ligação do substrato na galactoquinase leva à mudança na sua conformação, o que permite sua interação com Lac10p e a conseqüente ativação de Lac9p (BREUNIG et al., 2000). A fosforilação da galactose não é requerida para a indução, ao contrário, conduz ao consumo do indutor e assim provê um vínculo direto entre o metabolismo e a regulação (SCHAFFRATH e BREUNIG, 2000). A proteína Lac9p liberada ativa a transcrição dos genes estruturais que participam do lac-gal regulon, por se ligar a uma seqüência específica anterior aos promotores desses genes (DICKSON e RILEY, 1989).

A incapacidade de Lac9p induzir os genes do lac-gal regulon também ocorre na presença de glicose, o que caracteriza o fenômeno de repressão catabólica (ZAICHAIRE e BREUNIG, 1993; SCHAFFRATH e BREUNIG, 2000). Basicamente, a repressão catabólica é primariamente causada na região promotora do gene *LAC9*, pois existe variação no nível de repressão em diferentes estirpes de *K. lactis* (DICKSON e RILEY, 1989). Um estudo realizado por ZAICHAIRE e BREUNIG (1993) demonstrou que uma alteração de dois pares de bases na posição 178 e 192, a partir de ATG na região promotora do gene *LAC9*, foi suficiente para converter uma estirpe repressível em glicose em não-repressível. De acordo com esses autores, a repressão por glicose nos genes controlados por Lac9p ocorre quando a relação glicose/galactose é alta, pois sabe-se que a cinética de indução depende crucialmente da concentração de galactose, que acima de um ponto crítico permitirá a expressão do gene *LAC9*, o que influencia não apenas a

expressão do gene *LAC4*, mas também do gene *GALI*, e provavelmente de outros genes controlados por Lac9p, como o próprio *LAC9*, que pela auto-regulação amplifica as diferenças entre o ativador e o repressor.

Sendo assim, observa-se que a repressão por glicose no lac-gal regulon de *K. lactis* ocorre quando, no interior da célula, a concentração de glicose é superior à de galactose, o que resulta na não-indução por galactose, devido à baixa produção da proteína Lac9p, o que implica baixa indução do lac-gal regulon. À medida que a concentração de galactose aumenta em relação à glicose no interior da célula, a situação se reverte.

Apesar de haver repressão por glicose no lac-gal regulon de *K. lactis*, DICKSON e MARKIN (1980) observaram que essa repressão é transitória, mais pronunciada no início do crescimento, mas sem efeito na taxa diferencial final da síntese de β -galactosidase, não impedindo assim a absorção e utilização da lactose. Entretanto, INCHAURRONDO et al. (1998) acreditam que a repressão por glicose em *K. lactis* é dependente da estirpe, pois existem estirpes que possuem o lac-gal regulon fortemente reprimido por glicose.

2.3. Síntese de β -galactosidase durante o cultivo de *Kluyveromyces lactis*

Em meios que contêm lactose como única fonte de carbono, a síntese de β -galactosidase em *K. lactis* está associada ao crescimento populacional. Vários estudos têm sido realizados, e a observação mais comum é que a atividade da enzima por unidade de concentração de células é máxima na entrada da fase estacionária, caindo em seguida quando a lactose ainda é detectada no meio (MAHONEY et al., 1974; DICKSON e MARKIN, 1980; INCHAURRONDO et al., 1994).

MAHONEY et al. (1974) observaram, em regime de batelada, que quando *K. fragilis* era cultivada em meio YPL contendo 10% de lactose a utilização de lactose era mais rápida durante a fase exponencial de crescimento e que a sua concentração diminuía mesmo após a estabilização da massa de células. Os autores ainda identificaram que o rendimento máximo da

enzima foi obtido no início da fase estacionária do crescimento.

INCHAURRONDO et al. (1994) cultivaram, em regime de batelada, várias linhagens de *K. lactis* em meio sintético contendo lactose, e obtiveram maior atividade da enzima no início da fase estacionária, o que coincidiu com a exaustão de lactose do meio. Esses autores afirmaram que a atividade total da enzima permaneceu constante até pelo menos uma a duas horas após o início da fase estacionária o que, indica que a enzima não foi degradada neste tempo. No mesmo estudo, menos de 5% da lactose do meio foi convertida a etanol. Outras pesquisas (MAHONEY et al., 1974; HOLMBERG et al., 1984) mostraram que mais de 30% da lactose metabolizada foi convertida em etanol por *K. lactis* CBS2360, *K. marxianus* e *K. fragilis*, cultivadas em soro de queijo ou em meio YPL em regime de batelada, o que resultou em baixo rendimento da biomassa e crescimento diáuxico após a entrada na fase estacionária. A subsequente utilização do etanol por *K. lactis*, de acordo com aqueles pesquisadores, pode reduzir a necessidade de produção de β -galactosidase, embora BRANDI et al. (1996) não tenham detectado o crescimento diáuxico da *K. lactis* cultivada em SUF até 24 horas.

Segundo DICKSON e MARKIN (1980), *K. lactis* ativada em meio mínimo DS contendo sorbitol e cultivada em seguida em lactose apresenta nível máximo da atividade da enzima no início da fase estacionária. A redução posterior de 80-90% na atividade da enzima nas células foi atribuída à diluição da população com progênie de células advindas da divisão celular, na ausência da síntese da enzima ou sua inativação. A ocorrência de repressão da síntese ou sua inativação da enzima não foi esclarecida.

GENARI (1999), cultivando *K. lactis* e *K. marxianus* em SUF a 30°C/24 h/150 rpm, constatou a produção máxima da enzima no final da fase exponencial, antes de entrar na fase estacionária. O autor sugeriu que a redução da atividade posterior a seu aumento deve ser uma resposta da célula às alterações na concentração de indutores/repressores no meio de crescimento.

A atividade máxima de β -galactosidase coincide com o estado fisiológico particular da célula, fato este constatado pela maioria dos autores citados (MAHONEY et al., 1974; DICKSON e MARKIN, 1980; INCHAURRONDO et al. 1994; GENARI, 1999), que observaram que a atividade da enzima por unidade de concentração de células aumenta no final da fase exponencial ou na entrada da fase estacionária, diminuindo logo em seguida. Deve-se ressaltar que a fase estacionária considerada por esses autores corresponde desde 8 a 20 horas de cultivo, o que na verdade deve ser chamado de fase de desaceleração do crescimento, uma vez que nesses tempos de cultivo a velocidade de crescimento ainda não é nula, variando com o tempo.

Nota-se que a maioria dos conhecimentos obtidos da indução e repressão de enzimas é derivada de estudos realizados em regime de batelada (INCHAURRONDO et al., 1998). Observa-se que poucos dados estão disponíveis em estudos realizados em regime contínuo, o que ofereceria a vantagem de se ter a população em condições fisiológicas constantes e bem definidas (HOEK et al., 1998). Desta forma, uma análise mais detalhada da fase de desaceleração do crescimento de *K. lactis* em cultura contínua pode auxiliar no entendimento do aumento e da queda na atividade de β -galactosidase observada em culturas cultivadas em regime de batelada, o que implicará a definição de fatores determinantes do cultivo desta levedura e a máxima produção da enzima em escala industrial.

2.4. Fases fisiológicas de culturas de leveduras

A forma de reprodução vegetativa mais comum em levedura é o brotamento. Geralmente, os brotos são iniciados quando as células-mãe atingem um tamanho crítico, que coincide com a síntese de DNA (WALKER, 1998). Em leveduras, cada divisão produz um organismo adicional, mas antes de produzir um par de células-filhas geneticamente idênticas, o DNA precisa ser fielmente replicado, e os cromossomos replicados precisam ser segregados

em duas células separadas, o que é possível por um sistema que controla o ciclo celular (WALKER, 1998). O ciclo celular é dividido em fases distintas: a intérfase é caracterizada por aumento da massa celular, quando as células estão se preparando para a divisão celular, inclusive duplicando seu DNA (que ocupa somente uma parte da intérfase chamada fase S); em seguida a fase M compreende a mitose; a fase G1 é o intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA; e a fase G2 é o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose celular (WALKER, 1998). Essas interrupções chamadas de G1 e G2 são importantes para permitir que o sistema de controle do ciclo celular seja regulado por sinais provenientes do meio ambiente. Em leveduras, sinais que regulam o ciclo agem no ponto de controle G1, que em leveduras é chamado de início (WALKER, 1998). Quando as circunstâncias ambientais impedem a divisão celular, é neste ponto do ciclo que muitas células repousam, chamada fase G0 (fase estacionária), em que não ocorre o crescimento (WASHBURN et al., 1993).

Segundo NEIDHARDT et al. (1990), o estado fisiológico da cultura é caracterizado pelo tamanho das células e pela composição macromolecular. Quando uma levedura é cultivada em meio definido nutricionalmente e fisicamente, sob regime de batelada, ela aumenta inicialmente sua população a uma velocidade máxima característica daquelas condições. Mas em determinado ponto, o crescimento populacional torna-se restrito por mudanças no meio, impostas tanto pelo próprio crescimento microbiano, como por alterações externas físicas ou químicas (WALKER, 1998).

Em função dessas mudanças no meio de cultura durante o cultivo de um microrganismo, observa-se uma curva sigmoideal típica do aumento populacional com o tempo. Essa curva mostra fases na população com propriedades fisiológicas distintas: fase lag, exponencial, de desaceleração, estacionária e de morte (GRIFFIN et al., 1994). Entretanto, embora essas fases possam ser bem delimitadas, a condição do regime de batelada implica variações no meio e na população com o tempo.

Atualmente, muitos estudos têm focalizado a fase estacionária do crescimento populacional de culturas sob regime de batelada, pois é nesta fase que há metabolismos alternativos e respostas complexas a condições de estresse (RIOU et al., 1997) e a mutação espontânea é mais suscetível (HEIDENREICH et al., 2001).

De acordo com GRIFFIN (1994), MOAT e FOSTER (1995) e RIOU et al. (1997), a fase de transição entre a fase exponencial e a fase estacionária é caracterizada por um estado fisiológico alterado, que envolve novos comportamentos da célula, incluindo o declínio da replicação do DNA genômico, indução de proteínas de estresse, aumento do estoque de carboidratos, indução e repressão de genes específicos relacionados à carência nutricional (como genes de permeases e fosfatases, entre outros), possibilitando a utilização de substratos alternativos. Neste período, além da escassez de nutrientes, aumentam os produtos do metabolismo como ácidos orgânicos, álcoois e íons de hidrogênio, que podem inativar enzimas.

BRUNO (1999) constatou que leveduras secretam baixa concentração de proteína no meio de cultura, mas a secreção, por sua vez, é diferenciada nos diferentes estados fisiológicos da célula. O autor observou que na fase de crescimento em que há estresse nutricional ocorre aumento no número de proteínas secretadas para o meio de cultura pelas leveduras *S. cerevisiae*, *K. lactis* e *K. marxianus*. Essas proteínas têm peso molecular entre 31.000 e 97.000 Da.

KAISER et al. (2000) relataram, recentemente, que a via de secreção de certas permeases em levedura é regulada pela fonte de nitrogênio do meio. As permeases Gap1p e Put4p são distribuídas pela extremidade trans do Golgi, em resposta à fonte de nitrogênio do meio. Em células de levedura cultivadas em fonte pobre de nitrogênio, por exemplo, uréia, Gap1p e Put4p são transportadas do Golgi para a membrana plasmática, enquanto em células cultivadas em uma fonte rica de nitrogênio, por exemplo, glutamato, Gap1p é transportada do Golgi para o vacúolo.

Dessa forma, tanto a concentração quanto a localização de proteínas responsáveis pelo metabolismo associado ao crescimento da célula parecem responder ao seu estado fisiológico, caracterizado pelas condições que delimitam as fases de crescimento da cultura (DORAN e BAILEY, 1986).

A variação na síntese e localização de enzimas em função do estado de estresse tem sido ultimamente explorada em vários aspectos, por diversos pesquisadores. Segundo WASHBURN et al. (1993), muitos compostos de interesse potencial são produzidos e transformados por leveduras na fase estacionária, além da expressão de novos genes, muitos deles com produto secretado no meio.

Nesse sentido, RIOU et al. (1997), com o intuito de melhorar a produção de vinho por *S. cerevisiae*, procuraram identificar promotores de genes especificamente ativados sob condições de processamento do vinho. Nove genes, incluindo membros da família HSP, mostraram indução na fase estacionária do crescimento. A expressão de um desses genes foi posteriormente estudada por meio da fusão *HSP30::LACZ* em vetores de expressão, em que a produção de β -galactosidase pelas células recombinantes, foi observada. A intenção dos autores foi explorar o sistema de regulação desses genes na construção de células de *S. cerevisiae* mais eficientes no processo de fermentação.

Em um outro estudo realizado por ENCARNACIÓN e DOMINGUEZ (1997), uma fosfatase ácida codificada pelo gene *KIPHO5* de *K. lactis* teve seu gene purificado e seqüenciado. Esse gene possui uma seqüência-sinal de secreção e é regulado em nível transcricional, sendo induzido de 400 a 600 vezes, quando a célula está em um meio com baixa concentração de fosfato. Posteriormente, os autores iniciaram um estudo da região promotora do gene *KIPHO5*, identificando as seqüências envolvidas no controle de sua expressão em relação à concentração de fosfato. Esse estudo culminou com um novo sistema de expressão e secreção heteróloga em *K. lactis*, pela fusão da região promotora do gene *KIPHO5* com o cDNA de um hormônio de crescimento de truta (*tGH-II*). A região promotora e a seqüência-sinal do gene *KIPHO5*

dirigiram a expressão do gene *tGH-II* e a secreção de sua proteína (tGH-II). A síntese de tGH-II nos transformantes obtidos nessa construção foi regulada pelo fosfato presente no meio, assim a desrepressão da expressão da proteína heteróloga é ativada em baixas concentrações de fosfato.

Observa-se o quanto é atual estudar as fases do crescimento populacional das culturas e os fatores fisiológicos associados a elas, em especial a fase de desaceleração que corresponde ao período entre a fase exponencial e a fase estacionária do crescimento em batelada. Detalhar a fase de desaceleração pelo cultivo em regime contínuo sob várias velocidades de crescimento, isto é, diferentes condições fisiológicas predefinidas, poderá gerar informações que serão importantes para explorar o potencial da *K. lactis* na produção de biomassa e proteínas de interesse biotecnológico, tanto homólogas, como β -galactosidase, quanto heterólogas, em uma perspectiva futura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

3.1. *Kluyveromyces lactis*

A levedura *K. marxianus* var. *lactis* (*K. lactis*) utilizada neste estudo é proveniente da Universidade da Califórnia, Davis (USA), e está mantida a -80°C, em glicerol 20%, no banco de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Meio de cultivo e produção do inóculo

O meio de cultura, em todas as modalidades de cultivo, foi o soro de queijo mussarela ultrafiltrado (SUF) não-suplementado, do Instituto Cândido Tostes de Juiz de Fora, Minas Gerais. O SUF foi estocado a -20°C e descongelado quando necessário. As proteínas remanescentes da ultrafiltração foram decantadas após o aquecimento, durante a noite. Posteriormente, o SUF

foi filtrado em bomba a vácuo e ao sobrenadante foi adicionado 0,4% de citrato de sódio, antes de autoclavar por 10 minutos.

A cultura de *K. lactis* foi ativada, inoculando-se 1mL do estoque em 50 mL de SUF, e incubada por 18 a 24 horas a 30°C e 200 rpm.

3.3. Cultivo em batelada e definição das fases fisiológicas da cultura

K. lactis foi cultivada em regime de batelada em três frascos de 1.000 mL, contendo um volume final de meio de cultura de 300 mL, por 22 horas, sob agitação de 200 rpm a 30°C, em duplicata. A densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) inicial foi de 0,1, 0,2 e 0,3, respectivamente, em cada frasco. Em um segundo experimento em regime de batelada, a levedura foi cultivada nas mesmas condições, mas por 172 horas, com DO_{600} inicial de 0,04. A fase de crescimento exponencial máxima foi delimitada pelo melhor ajuste da regressão linear dos dados de $\log DO_{600}$ com o tempo. A fase de desaceleração foi definida como sendo aquela posterior à fase exponencial e anterior à fase estacionária e caracterizada como a fase em que o μ é maior que zero e menor que $\mu_{\max}$, e a fase estacionária foi caracterizada como aquela em que $\mu = 0$. Espera-se que o estado fisiológico da população nas fases de desaceleração e estacionária seja drasticamente diferente da fase anterior e que reflita as limitações do meio. Para caracterização fisiológica da cultura, em ambos os experimentos, amostras foram coletadas em diferentes tempos durante o cultivo, para análise morfológica da população de leveduras, atividade de β -galactosidase, consumo de lactose, produção e consumo de etanol e perfil eletroforético de β -galactosidase intra e extracelular.

3.4. Cultivo contínuo

Para estudar a fase de desaceleração, marcada por variações fisiológicas, foi realizado um experimento de cultivo contínuo, em fermentador frasco jaquetado Wheaton, ligado por conexões a dois

recipientes, um de entrada de meio SUF estéril e outro de saída da cultura. O fermentador, com um volume de trabalho de 100 mL de SUF, foi homogeneizado e aerado por agitação magnética e mantido a 30°C. A cultura foi conduzida com fluxo de 0,1, 0,15, 0,2, 0,3 e 0,4 mL/h, cada fluxo correspondendo a uma velocidade de crescimento diferente, isto é, uma condição fisiológica diferente que corresponde à fase de desaceleração do crescimento em batelada. Desta forma, cinco condições fisiológicas foram analisadas: velocidades específicas de crescimento de 0,06, 0,09, 0,12, 0,18 e 0,24 h⁻¹. A cultura contínua foi operada por oito a dez gerações, para estabelecer o regime permanente, e então foram coletadas amostras em triplicata, representativas de cada condição. As amostras coletadas foram submetidas às mesmas análises citadas no cultivo em batelada.

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Medida do crescimento

O crescimento foi avaliado pela medida da DO₆₀₀. As amostras cujos valores foram superiores a 0,7 foram diluídas, para obedecer à linearidade da relação DO₆₀₀ *versus* mg de massa celular seca (1 DO₆₀₀ = 0,68mg/mL de célula).

3.5.2. Microscopia

Amostras das diversas fases fisiológicas da cultura foram coradas com azul-de-metileno, sendo em seguida observadas ao microscópio ótico com aumento de 1.000 vezes e fotografadas. As amostras foram colhidas de diferentes bateladas, nos tempos de 10, 18, 81 e 172 horas de cultivo.

3.6. Atividade de β -galactosidase

A atividade de β -galactosidase foi determinada, segundo DIKSON e MARKIN (1980), com as seguintes modificações:

Amostras em triplicata de 1,0 mL da cultura da levedura em estudo foram centrifugadas (2.840 g, 10 min, 25°C), e os sedimentos foram ressuspensos em 1,0 mL de tampão Z (0,06 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 M de $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 M de KCl, 0,001 M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 7,0). A uma alíquota de 0,5 mL foram adicionados 0,1 mL de SDS 0,1% e 0,1 mL de clorofórmio absoluto, sendo a suspensão vigorosamente agitada por 10 segundos, para permeabilizar as células. Após 1 minuto, 0,1 mL da suspensão de células permeabilizadas foi submetido ao ensaio enzimático na presença de 0,4 mL de ortonitrofenil- β -D galactopiranosídeo (ONPG) (4mg/mL), num tempo de reação de 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1mL de solução de carbonato de sódio a 0,5 M. O produto da reação, O-nitrofenol (ONP), foi quantificado, convertendo-se a absorvância a 420 nm em μmol de ONP, utilizando uma curva-padrão de ONP.

3.7. Análise do consumo de lactose e formação e consumo de produtos metabólicos

O consumo de lactose e a produção e o consumo de metabólitos foram acompanhados pela medida da concentração desses compostos no meio de cultura durante o cultivo. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo modelo Hewlett Packard, série 1050, com detector modelo Hewlett Packard HP 1047A, e utilizando a coluna modelo HPX 87H Bio Rad (tamanho da partícula = 8 μm e dimensões de 300 x 7,8 mm). O eluente foi 0,05 M H_2SO_4 , com fluxo máximo de 1,2 mL/min e fluxo típico de 0,6 mL/min. A temperatura de operação foi de 85°C e a pressão máxima, de 69 bar. As concentrações dos açúcares (lactose, glicose e galactose) e álcool (etanol) foram medidas em triplicata mediante a

comparação com as dos padrões externos preparados nas concentrações de 5 a 50 mmol/L.

3.8. Detecção de β -galactosidase intra e extracelular

Para detecção de β -galactosidase intracelular, a cultura de células de *K. lactis* foi centrifugada a 2.840 g, 5 min, 25°C e posteriormente congelada em nitrogênio líquido, sendo armazenada a -20°C. A cultura foi então suspensa em 1 mL de tampão de lise (50 mmol/L fosfato de sódio pH 7,4, 1 mmol/L Pefablock, 1mmol/L EDTA, 5% de glicerol), rompida com a adição de 0,5 mL de partículas de vidro (*glass beads*) e agitada vigorosamente por dez ciclos de 30 segundos, com um intervalo de 30 segundos em gelo, após cada ciclo. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 5.570 g, 10 min, 4°C, obtendo-se aproximadamente 0,8 mL de lisado. Para cada 0,1 mL do lisado adicionou-se 0,05 mL de ácido tricloro acético (TCA) 50% por 10 minutos e agitação em vórtex, seguido de centrifugação (5.570 g, 10 min, 4°C) para a precipitação da proteína. Para cada 0,1 mL de lisado que foi precipitado adicionou-se 0,2 mL de acetona 100%, para ressuspender a proteína precipitada, seguida de centrifugação (14.000 rpm, 10 min, 4°C). Posteriormente, este precipitado obtido foi ressuspendido em 0,1mL de tampão glicina (63,2 g TRIS Base, 39,9 g glicina pH 8,9 para 1 L de solução). E assim, determinou-se a concentração de proteína por BRADFORD (1976), utilizando como padrão albumina de soro bovino. Dessa forma, alíquotaram-se amostras padronizadas em 50 μ g de proteína, a seguir congelou-as em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenou-as a -80°C. Para detecção extracelular, a cultura foi centrifugada (2.840 g, 5 min, 25°C) e o sobrenadante obtido foi submetido à precipitação ácida da mesma maneira, sendo armazenado nas mesmas condições.

As amostras do extrato intra e extracelular de *K. lactis*, nas diferentes fases fisiológicas do crescimento, foram analisadas em gel de poliacrilamida a 8%.

3.9. Eletroforese de proteínas

As amostras dos diferentes tempos de cultivo dos experimentos em regimes de batelada e contínuo tiveram a proteína padronizada em 50 µg .

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS, segundo LAEMMLI (1970), com o uso do aparelho Mini Protean II da Bio-Rad. As proteínas foram fracionadas no gel, utilizando-se a voltagem de 100V por 2 horas. O gel foi corado com *Coomassie blue*, conforme estabelecido por SAMBROOK et al. (1989). Para detecção de β -galactosidase intracelular, foi utilizado o padrão de massa molecular da Sigma Chemical (USA), contendo β -galactosidase de *E. coli* (116.000 Da); já para detecção de β -galactosidase extracelular foi utilizado o padrão de alto peso molecular da PROMEGA, contendo miosina (212.000 Da), β -galactosidase de *E. coli* (116.000 Da), fosforilase B (97.400 Da), albumina de soro bovino (66.200 Da), catalase (57.500 Da) e aldolase (40.000 Da).

3.10. Cinética da atividade de β -galactosidase em função da concentração de lactose no meio

A cultura de *K. lactis* foi ativada, inoculando-se 1mL do estoque em 50 mL de SUF, e incubada por 18 a 24 horas a 30°C e 200 rpm. Posteriormente, foi cultivada em frasco de 1.000 mL, contendo um volume de trabalho de 350 mL, por 25 horas, sob agitação de 200 rpm a 30°C. A DO₆₀₀ inicial foi padronizada em 0,06. Até 21 horas de cultivo, quando foi detectado o pico de atividade máxima, foram tiradas alíquotas de 1mL para leitura da DO₆₀₀, atividade enzimática e análise de metabólitos da cultura por CLAE. Em seguida, a cultura foi dividida em cinco alíquotas de 70 mL, que foram transferidas para frascos erlenmeyer de 125 mL. Um frasco foi mantido sem adição de lactose e os demais foram suplementados com lactose, para alcançar concentrações finais de aproximadamente 7, 18, 30 e 60 mM. Em intervalos de 20 minutos, as alíquotas 1,0 mL foram recolhidas para análise da

concentração de células, atividade enzimática e concentração de metabólitos por CLAE, até completar 25 horas de cultivo.

É válido ressaltar que em toda metodologia desta pesquisa, utilizou-se o seguinte delineamento experimental: Para as análises nos experimentos realizados em duplicata, escolheu-se o experimento em que os dados foram mais representativos e nos experimentos realizados em triplicata tirou-se a média dos dados.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das fases fisiológicas de culturas de *Kluyveromyces lactis* em soro ultrafiltrado

A curva de crescimento de *K. lactis* cultivada em SUF em regime de batelada realizado em 22 horas está apresentada na Figura 1. Os três perfis correspondem às populações com DO₆₀₀ inicial de 0,1, 0,2 e 0,3. Diferentes populações iniciais foram testadas para verificar se a população inicial afeta os limites das fases de crescimento. Observou-se que as velocidades específicas de crescimento são semelhantes (0,22 h⁻¹ e 0,21 h⁻¹) para os cultivos com DO₆₀₀ inicial de 0,1 e 0,2, respectivamente. Já para o cultivo com DO₆₀₀ inicial de 0,3, a velocidade de crescimento foi de 0,18 h⁻¹. A fase de crescimento exponencial foi observada ao longo das primeiras 13 horas de cultivo após a adição do inóculo, previamente ativado no mesmo meio. A desaceleração do crescimento populacional foi observada aproximadamente a partir de 15 horas de cultivo. Neste período a DO₆₀₀ foi, respectivamente, 4,0, 6,0 e 5,0; a concentração de lactose no meio declinava, sendo respectivamente, 50, 19 e 14 mmol/L, e a de etanol aumentava, sendo 196, 270 e 282 mmol/L, respectivamente (Figura 1). A desaceleração se estendeu até 22 horas, quando foi interrompida a observação.

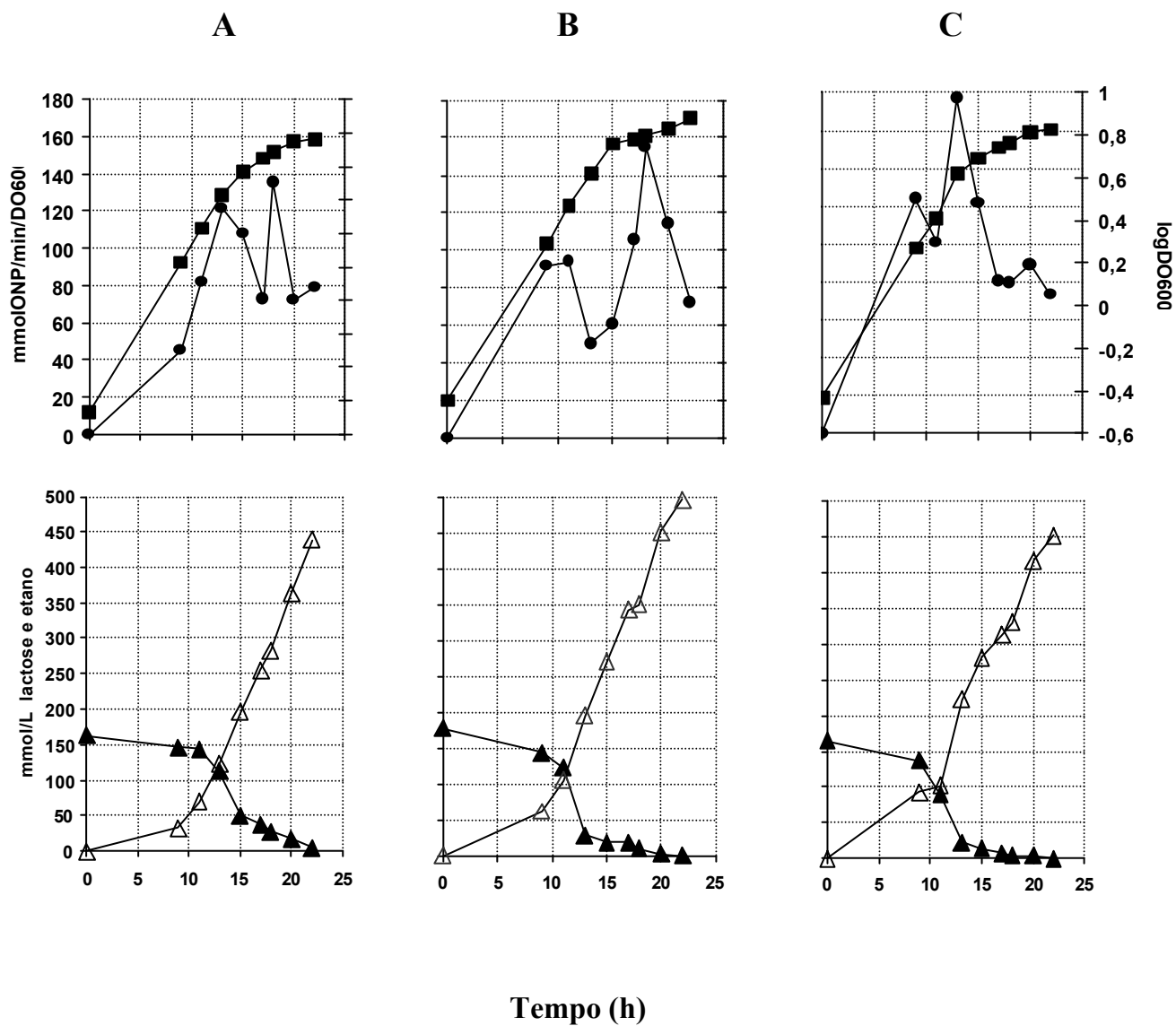


Figura 1 – Crescimento (■), atividade de β -galactosidase (●), consumo de lactose (▲) e formação de etanol (▲□) durante o cultivo de *K. lactis* em soro ultrafiltrado, sob regime de batelada a 30°C, 200 rpm, por 22 horas, em três DO₆₀₀ iniciais: A) 0,1, B) 0,2 e C) 0,3.

Para determinar a fase estacionária do crescimento de *K. lactis* em SUF, uma cultura em batelada foi conduzida por 172 horas, com DO₆₀₀ inicial de 0,04. A velocidade específica de crescimento foi de 0,37 h⁻¹ (Figura 2). A fase exponencial se estendeu até em torno de 25 horas, seguida da fase de desaceleração, observada após 25 horas de cultivo (37 horas de cultivo), que permaneceu até o início da fase estacionária, atingida em 144 horas de crescimento. Neste momento (37 horas de cultivo), as concentrações de lactose e etanol foram 0,8 e 248 mmol/L, respectivamente. A fase de desaceleração, cuja duração foi maior que 100 horas, é quase imperceptível no gráfico, mas foi detectada uma velocidade de crescimento de 0,0044 h⁻¹, o que prova que a população ainda se multiplicava, embora lentamente, consumindo etanol, que desaparece do meio a uma taxa de 2,5 mmol/h (Figura 2).

4.2. Morfologia de *Kluyveromyces lactis* durante as diferentes fases fisiológicas do crescimento

A morfologia de *K. lactis* nas diversas fases fisiológicas do crescimento foi analisada por microscopia óptica. As Figuras 3A, 3B, 4A e 4B apresentam, respectivamente, as células de *K. lactis* colhidas na fase exponencial, 10 horas de cultivo, DO₆₀₀ 1,9; na fase de desaceleração, 18 horas de cultivo, DO₆₀₀ 5,7, e 81 horas de cultivo, DO₆₀₀ 10,7; e na fase estacionária, 172 horas de cultivo, DO₆₀₀ 14,8. As células na fase exponencial apresentaram forma oval com inúmeros brotos, indicando plena divisão, o que é também evidenciado pelas poucas células inviáveis coradas pelo azul-de-metileno (Figura 3A). No início da fase de desaceleração do crescimento (Figura 3B), nota-se que o número de brotos diminui e que as células são mais redondas. Na Figura 4A, as células encontram-se no final da fase de desaceleração, onde se nota um grande número de células inviáveis, não se observa mais brotamento, e sim a presença de ascósporos, visualizados por grânulos escuros no interior da célula. As células também são redondadas e maiores. Essas alterações morfológicas são mais nítidas na fase estacionária, uma vez que não há crescimento (Figura 4B).

Figura 2 – Crescimento (■), atividade de β -galactosidase (●), consumo de lactose (▲) e formação e consumo de etanol (▲□) durante o cultivo de *K. lactis* em soro ultrafiltrado, sob regime de batelada a 30°C, 200 rpm, por 172 horas, em DO₆₀₀ inicial de 0,04.

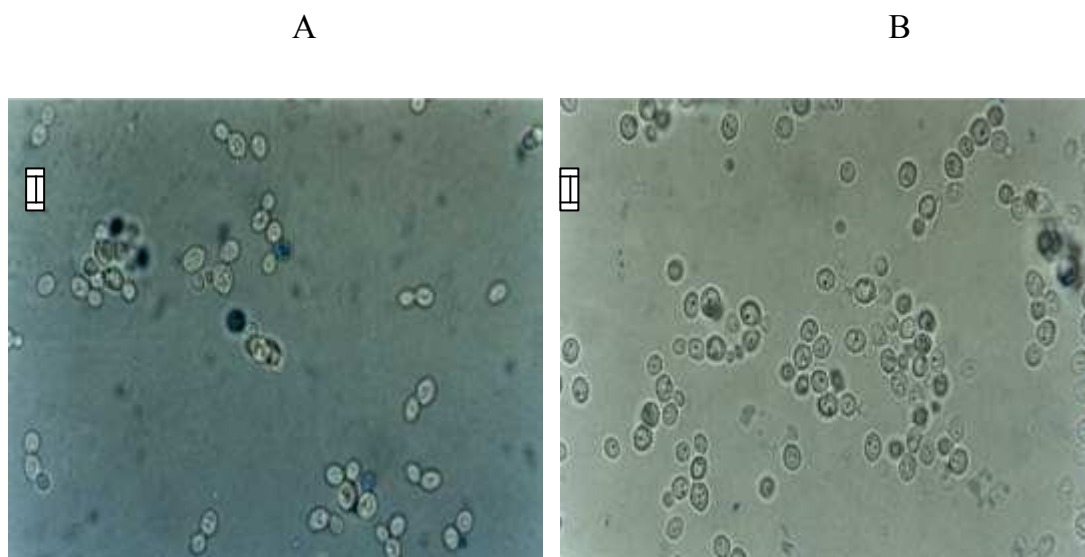


Figura 3 – Fotografia em microscópio ótico da levedura *K. lactis* corada com azul-de-metileno. A) células na fase exponencial do crescimento (10 horas de cultivo). B) células na fase de desaceleração do crescimento (18 horas de cultivo). A barra de escala corresponde a 5 μm.

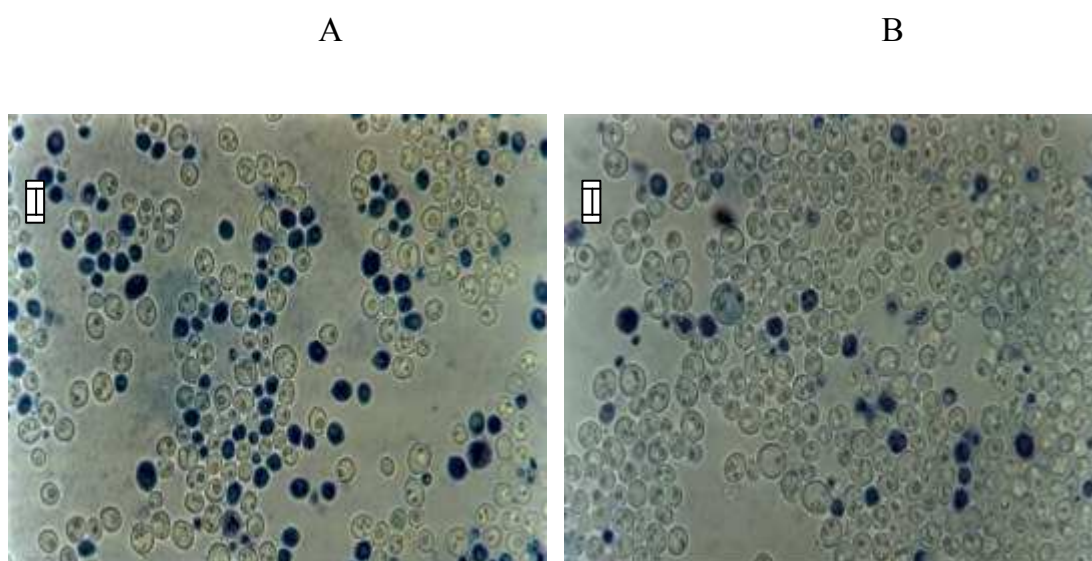


Figura 4 – Fotografia em microscópio ótico da levedura *K. lactis* corada com azul-de-metileno. A) células na fase de desaceleração do crescimento (81 horas de cultivo). B) células na fase estacionária do crescimento (172 horas de cultivo). A barra de escala corresponde a 5 μm.

4.3. Atividade de β -galactosidase, consumo de lactose, formação e consumo de etanol nas distintas fases fisiológicas de *Kluyveromyces lactis* em soro ultrafiltrado

A atividade de β -galactosidase é essencial para assimilação de lactose, principal fonte de carbono e energia no SUF. Na cultura em batelada, partindo de diferentes concentrações iniciais de células, observa-se sempre um pico que corresponde à atividade máxima de β -galactosidase por unidade de biomassa (DO_{600}). Esse pico ocorreu em 18 horas de cultivo e em seis gerações (fase de desaceleração), quando a DO_{600} inicial foi de 0,1 e 0,2, e em 13 horas de cultivo e em três gerações (final da fase exponencial), quando a DO_{600} inicial foi de 0,3 (Figura 1). Na batelada realizada em 172 horas o máximo de atividade se deu em 22 horas, o que corresponde ao final da fase exponencial, sendo seis o número de gerações (Figura 2). Em ambas as bateladas, após a indução máxima, observou-se queda na atividade.

Como foi mencionado, o consumo de lactose e a formação e o consumo de etanol durante o cultivo de *K. lactis* em SUF também foram acompanhados ao longo do cultivo (Figuras 1 e 2). Os açúcares galactose e glicose oriundos da hidrólise de lactose não foram detectados no meio em quantidades significantes durante todo o cultivo, em ambos os experimentos realizados em regime de batelada (dados não-mostrados). Quanto à lactose e ao etanol (Figura 1), verificou-se que a lactose desaparece enquanto o etanol aparece em concentrações crescentes no meio extracelular, durante os tempos de cultivo observados. Ainda nessa figura, observa-se que, quando a atividade da enzima foi máxima, isto é, A) 135, B) 155 e C) 170 mmolONP/min, as concentrações de lactose no meio foram, respectivamente, A) 28, B) 10 e C) 14 mmol/L e as concentrações de etanol correspondentes foram A) 283, B) 350 e C) 222 mmol/L. No período posterior a atividade máxima de β -galactosidase ainda havia lactose no meio (A – 18, B - 3 e C – 14 mmol/L) e etanol em concentrações crescentes (A – 363, B - 451 e C – 282 mmol/L). Sendo assim, observa-se que existe uma correlação entre o consumo de lactose e a formação

de etanol, mas essa correlação não é linear. Verificou-se também que não há uma relação direta entre as concentrações desses compostos e o aumento e a queda de atividade de β -galactosidase.

Na batelada conduzida por 172 horas, a atividade máxima da enzima (147mmolONP/min) ocorreu quando as concentrações de lactose e etanol foram 64 e 35 mmol/L, respectivamente, e sua queda foi observada quando a concentração de lactose e etanol foram 16 e 200 mmol/L, respectivamente (Figura 2). Ainda nesta figura verificou-se que, à medida que a lactose vai sendo consumida do meio, a concentração de etanol aumenta até 38 horas, quando atinge o máximo de 247 mmol/L. A partir de 44 horas de cultivo, quando a concentração de lactose é limitante (0,9mmol/L), o etanol começa a desaparecer do meio, até atingir concentrações nulas em 144 horas de cultivo.

Ainda analisando a atividade de β -galactosidase, na batelada de 22 horas (Figura 1), foram detectados no início da fase exponencial (após aproximadamente quatro a cinco gerações) um pico de 132 mmolONP/min, às 13 horas, na população inicial de DO_{600} 0,1; um pico de 93 mmolONP/min, às 11 horas, na população inicial de DO_{600} 0,2; e um pico de 123 mmolONP/min, às 9 horas, no cultivo com a população inicial de DO_{600} 0,3. Na batelada de 172 horas (Figura 2) esse pico (117 mmolONP/min) foi observado em 15 horas de cultivo. Observou-se também nessa batelada prolongada que, após a atividade máxima da enzima, 147 mmolONP/min em 22 horas, outro pico semelhante (146 mmolONP/min) voltou a ser detectado com 44 horas de cultivo, tendo as concentrações de lactose e etanol no meio sido 0,9 e 242 mmol/L, respectivamente. Mais tarde, com 76 horas de cultivo, foi constatado outro pico (124,5 mmolONP/min), sendo as concentrações de lactose e etanol, 0,66 e 176,5 mmol/L, respectivamente. Um último pico, 72 mmolONP/min, embora mais baixo que os anteriores, foi verificado em 104 horas de cultivo. Neste ponto a lactose não foi mais detectada no meio e a concentração de etanol foi de 101,2 mmol/L. Portanto, observou-se que durante o crescimento ocorrem vários picos de atividade da enzima, em uma progressão cíclica ascendente ao longo da fase exponencial e descendente após

a fase de desaceleração para estacionária. Verificou-se ainda que, mesmo já tendo concentrações limitantes de lactose no meio, ou sua exaustão com a utilização de outra fonte de carbono, são detectados picos de atividade de β -galactosidase. Foi detectada também, após os picos, a queda na atividade da enzima, onde (com exceção dos picos de 76 e 104 horas de cultivo) nesse momento ainda havia lactose no meio e concentrações crescentes de etanol.

4.4. Cinética da atividade de β -galactosidase em função da concentração de lactose no meio

Na tentativa de esclarecer se, dentre as condições culturais, a concentração de lactose é importante para estabelecer a atividade máxima de β -galactosidase, foram conduzidas culturas após seis gerações, adicionando-se diferentes concentrações de lactose ao meio, com o intuito de proporcionar chances de ser atingida a concentração ideal de galactose/glicose no interior da célula. Objetivou-se também verificar se a atividade máxima da enzima era recuperada. Foi realizada uma batelada, e após 21 horas de cultivo o meio foi distribuído em cinco frascos, tendo a lactose sido adicionada nas concentrações de 7, 18, 30, 60 mmol/L e uma fração da cultura sido mantida como controle. A Figura 5A mostra o crescimento populacional na batelada até 21 horas de cultivo, fase exponencial, seis gerações, tendo a atividade máxima de β -galactosidase sido alcançada em 15 horas de cultivo, com 4,23 gerações, o que está dentro da faixa encontrada nas bateladas anteriores.

Após a adição de lactose, o crescimento e a atividade de β -galactosidase (Figura 5B), além do consumo de lactose e da produção e consumo de etanol (Figura 6), foram observados a cada 20 minutos. Nota-se que após a adição de lactose a atividade não variou muito em relação ao controle, não tendo sido novamente atingida a atividade máxima observada anteriormente (Figura 5B). Em relação ao crescimento, observa-se que a população continuou na fase de desaceleração (Figura 5B), mesmo consumindo a lactose adicionada (Figura 6), isto é, a célula consumiu a

lactose, porém não houve aumento no número de células. Verificou-se também que o etanol continuou aumentando no meio, até nas últimas observações tomadas.

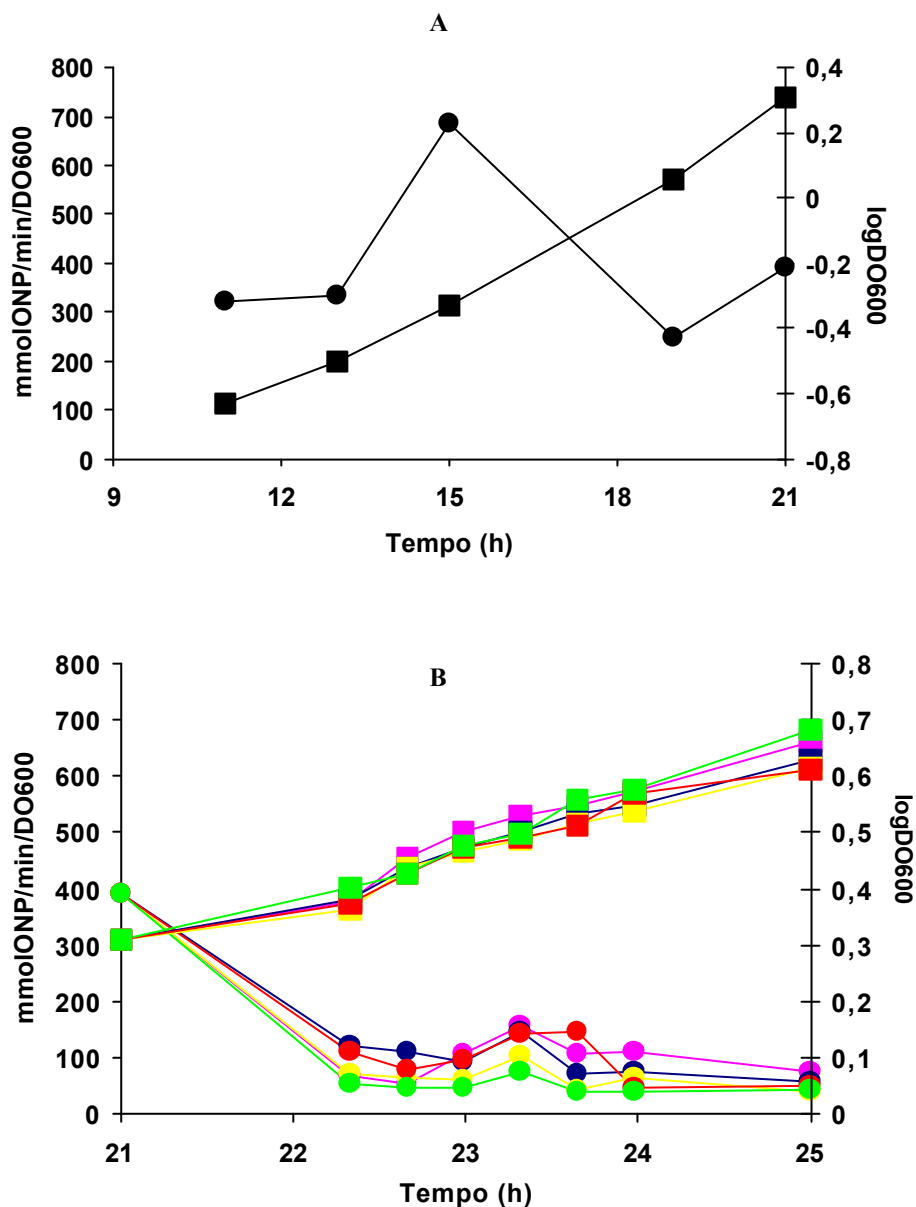


Figura 5 – A) Crescimento (■) e atividade de β -galactosidase (●) durante o cultivo de *K. lactis* em soro ultrafiltrado a 30°C, a 200 rpm por 21 horas, sob regime de batelada. B) Crescimento (■, ■, ■, ■ e ■) e atividade de β -galactosidase (●, ●, ●, ● e ●) durante cinco cultivos de *K. lactis* em soro ultrafiltrado, a 30°C, a 200 rpm sob regime de batelada, onde foram adicionados 7, 18, 30, 60 e 0 mmol/L de lactose após 21 horas de cultivo. A ordem das concentrações de lactose adicionada é respectiva a ordem das cores dos símbolos de crescimento e atividade de β -galactosidase.

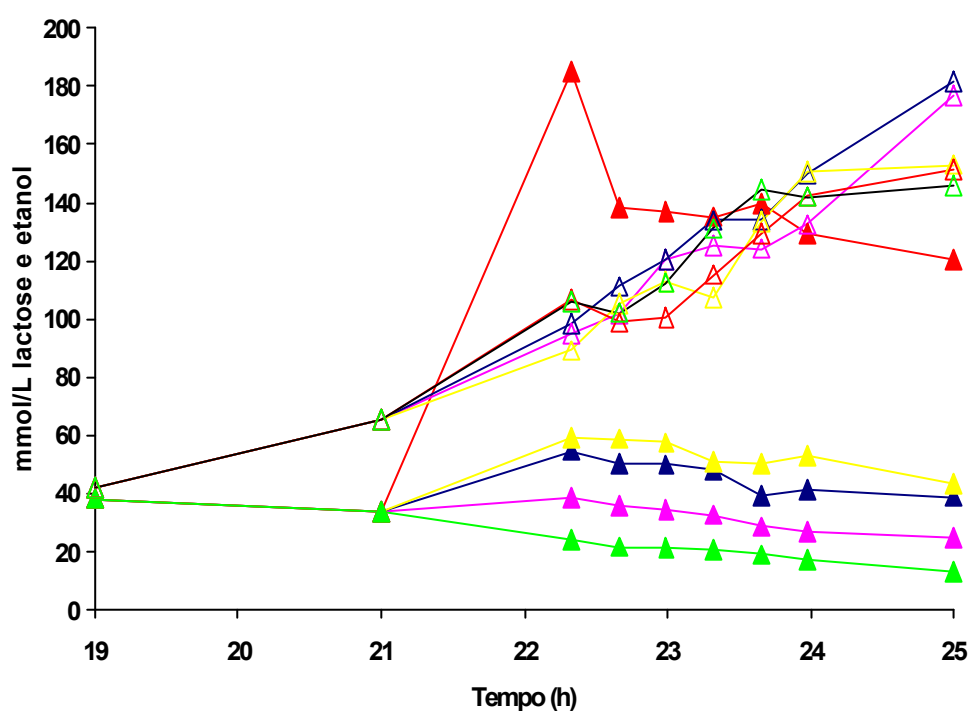


Figura 6 – Consumo de lactose $\blacktriangle$, $\blacktriangle$, $\blacktriangle$, $\blacktriangle$ e $\blacktriangle$ e formação de etanol $\blacktriangle$, $\blacktriangle$, $\blacktriangle$, $\blacktriangle$ e $\blacktriangle$ durante cinco cultivos de *K. lactis* em soro ultrafiltrado, a 30°C, a 200 rpm sob regime de batelada, onde foram adicionados 7, 18, 30, 60 e 0 mmol/L de lactose após 21 horas de cultivo. A ordem das concentrações de lactose adicionada é respectiva a ordem das cores dos símbolos de consumo de lactose e formação de etanol.

4.5. Detecção de β -galactosidase intra e extracelular

Para auxiliar no entendimento sobre o aumento e a queda na atividade de β -galactosidase ao longo do cultivo em SUF, amostras de tempos diferentes dos experimentos realizados em batelada foram analisadas em gel SDS-PAGE, com o intuito de visualizar uma estrutura protéica que pudesse ser β -galactosidase. Foi investigada a presença de β -galactosidase intracelular e, eventualmente, extracelular durante o cultivo. A enzima β -galactosidase é uma proteína dimérica composta por subunidades idênticas de 135.000 Da (DICKSON et al., 1979). A mesma concentração de proteína foi analisada em todos os tempos.

Do cultivo em batelada realizado por 22 horas foram confeccionados géis para detectar a banda correspondente a β -galactosidase intracelular de amostras do cultivo com DO_{600} inicial de 0,1, dos tempos 11 (fase exponencial), 15, 18, 20 e 22 (fase de desaceleração) horas de cultivo (Figura 7). Ainda analisando a Figura 7, nota-se que apesar de ocorrer queda na atividade entre o tempo 11 e 15 horas a intensidade da banda no gel não variou. No tempo 18, quando a atividade foi máxima, houve aumento da banda em relação ao tempo 15. Posteriormente ocorre a queda na atividade (20 - 22 horas), e as bandas mostraram menor intensidade em relação ao tempo 18 horas.

Amostras dos tempos 15, 17, 22 (fase exponencial), 44, 52, 66, 76, 92, 102, 120 (fase de desaceleração) e 172 (fase estacionária) horas de cultivo de extratos celulares da batelada realizada por 172 horas foram submetidas ao gel, para análise de β -galactosidase intracelular (Figura 8). Do tempo 15 horas para 17 horas, quando a atividade caiu, a banda no gel aumentou a intensidade. No tempo 22 horas, quando a atividade foi máxima, houve aumento da banda em relação ao tempo 17 horas. Na queda de atividade, em 26 horas, houve aumento na intensidade da banda. No tempo 44, quando houve outro pico de atividade máxima, a densidade da banda não se modificou em relação ao tempo 26 horas.

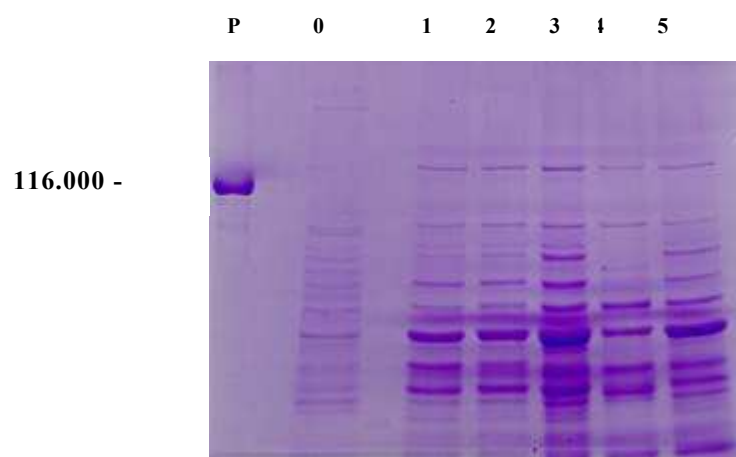


Figura 7 – SDS-PAGE de proteínas intracelulares de cultura de *K. lactis* cultivada em regime de batelada por 22 horas. P é o padrão de peso molecular β -galactosidase de *E. coli*; 0 refere-se ao controle onde *K. lactis* foi cultivada em YNB, contendo glicose como fonte de carbono e energia e 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se, respectivamente, a amostras dos tempos de cultivo de 11, 15, 18, 20 e 22 horas.

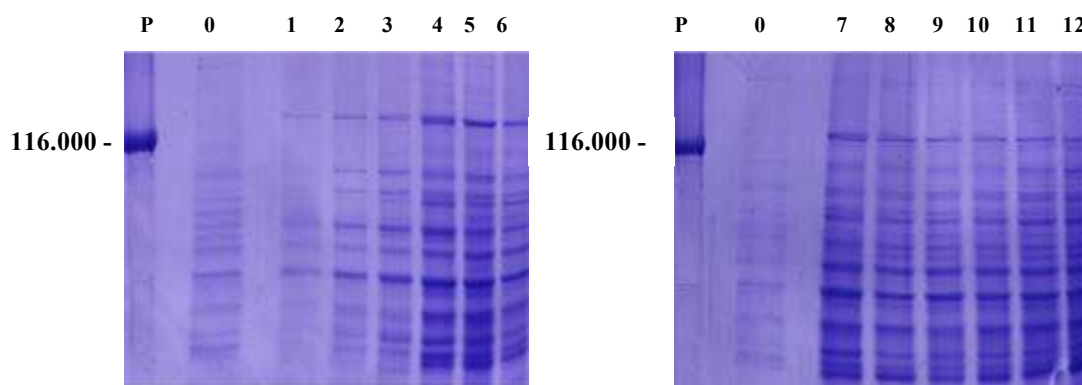


Figura 8 – SDS-PAGE de proteínas intracelulares de cultura de *K. lactis* cultivada em regime de batelada por 172 horas. P é o padrão de peso molecular β -galactosidase de *E. coli*; 0 refere-se ao controle onde *K. lactis* foi cultivada em YNB, contendo glicose como fonte de carbono e energia; 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se, respectivamente, a amostras dos tempos de cultivo de 15, 17, 22, 26, 44, 52 horas e 7, 8, 9, 10, 11 e 12 referem-se, respectivamente, a amostras dos tempos de cultivo de 66, 76, 92, 102, 120 e 172 horas.

Nos tempos 52 e 66 horas, quando a atividade caiu novamente, as bandas apresentaram-se menos densas. Com 76 horas, quando ocorreu outro pico, verificou-se diminuição da banda. Nos tempos posteriores, quando a atividade caiu gradativamente, não houve alteração da intensidade da banda.

A enzima β -galactosidase não foi encontrada no meio de cultivo em ambas as bateladas (dados não-mostrados).

4.6. Cultivo contínuo

Para ser mais preciso quanto aos dados obtidos nos cultivos conduzidos em regime de batelada, na fase de desaceleração do crescimento, realizou-se um cultivo em regime contínuo com diferentes fluxos de alimentação, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3 e 0,4 mL/h, que correspondem às velocidades específicas de crescimento (μ) de 0,06, 0,09, 0,12, 0,18, 0,24 h⁻¹, respectivamente. Essas condições de diferentes velocidades de crescimento estratificam cada condição fisiológica que muda com o tempo na fase de desaceleração do crescimento em batelada, sendo cada condição mantida em regime permanente. Assim, a fase de desaceleração foi analisada sob condições de regime constante.

Pela Figura 9A nota-se que a atividade foi máxima (214 mmolONP/min), com uma velocidade de crescimento de 0,09 h⁻¹ (distante do $\mu_{\text{máx}}$ 0,3 h⁻¹). Nestas condições, as concentrações de lactose e etanol foram, respectivamente, 7 e 315 mmol/L e o tempo de geração foi 8 horas (Figura 9B, Quadro 1). Uma redução no fluxo foi acompanhada por uma correspondente redução na concentração de lactose e aumento na concentração de etanol (Figura 9B). Na menor taxa de diluição, 0,1 mL/h, a concentração de etanol no meio foi 330,4 mmol/L e a de lactose foi 0,26 mmol/L, o que correspondeu à queda na atividade.

Comparando esses dados com os obtidos nos cultivos realizados em regime de batelada, observa-se que a taxa de diluição de 0,1 mL/h ($\mu = 0,06$ h⁻¹) corresponde à fase de desaceleração mais próxima à fase estacionária, enquanto a taxa de diluição de 0,4 mL/h ($\mu = 0,24$ h⁻¹) mais próxima à fase exponencial.

A

B

Figura 9 – *K. lactis* cultivada em regime contínuo em soro ultrafiltrado a 30°C, a 200 rpm, sob diferentes taxas de diluições. A) Crescimento (■), atividade de β -galactosidase (●), B) Atividade de β -galactosidase (●), consumo de lactose (▲) e formação de etanol (▲□)

Quadro 1 – Parâmetros culturais de *K. lactis* em soro ultrafiltrado sob regime de cultura contínuo

Fluxo	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4
Lactose (mmol/L)	0,26	7	23	118	130
Etanol (mmol/L)	330,4	315	179	53	14
DO ₆₀₀	5,5	4,6	3	2	0,5
Atividade mmolONP/min	47	213,2	88	56	116
μ (h ⁻¹)	0,06	0,09	0,12	0,18	0,24
Tempo de geração (h)	12	8	6	4	3

Na Figura 10 observa-se o perfil protéico da β -galactosidase intracelular das amostras obtidas nas diferentes taxas de diluição. Da taxa de diluição de 0,4 para a de 0,3 mL/h verificou-se uma queda na atividade da enzima que não é detectada no gel, pois as bandas aparecem com a mesma intensidade. Da taxa de diluição de 0,2 para a de 0,15 mL/h, em que a atividade foi máxima, foi nítido o aumento na intensidade da banda que permaneceu com a mesma intensidade na taxa de diluição de 0,1 mL/h, em que houve queda da atividade enzimática.

A enzima β -galactosidase também não foi encontrada no meio de cultivo (dados não-mostrados).

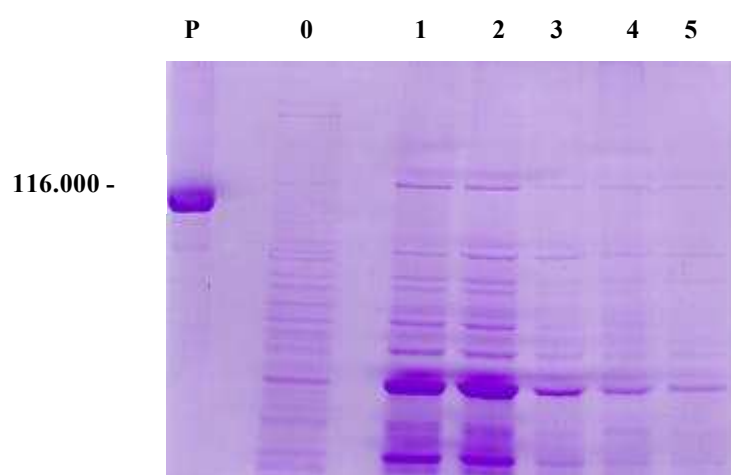


Figura 10 – SDS-PAGE de proteínas intracelulares de cultura de *K. lactis* cultivada em regime contínuo. P é o padrão de peso molecular β -galactosidase de *E. coli*; 0 refere-se ao controle onde *K. lactis* foi cultivada em YNB, contendo glicose como fonte de carbono e energia e 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se, respectivamente, a amostras dos fluxos 0,1, 0,15, 0,2, 0,3 e 0,4.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal investigar o aumento e a queda da atividade de β -galactosidase de populações de *K. lactis* na fase de desaceleração do crescimento em SUF.

Para padronizar as condições experimentais, foi investigada a concentração inicial de células na cultura. Concentrações na ordem de 0,1 e 0,2 de DO₆₀₀ parecem ter pouco efeito na velocidade específica de crescimento. Já uma concentração de DO₆₀₀ de 0,3 alterou a velocidade de crescimento, embora a extensão das fases de crescimento tenha permanecido semelhante.

Conforme estabelecido por BRANDI et al. (1996), o crescimento de *K. lactis* em SUF é função da concentração da massa de célula. Segundo os autores, somente em DO₆₀₀ acima de 2,0 a velocidade de crescimento se mantém inalterada, embora muito baixa (0,15 h⁻¹).

Para determinar a fase estacionária, uma batelada mais prolongada foi realizada, tendo uma população inicial de células de 0,04, onde foram obtidas uma velocidade de crescimento maior e uma fase exponencial bem mais extensa. Desta forma, conclui-se que não houve diferença na delimitação das fases entre as DO₆₀₀ 0,1 a 0,3, porém com a DO₆₀₀ inicial menor que 0,1 ocorreu uma fase exponencial mais extensa, com maior número de dados, o

que permitiu investigar melhor a atividade de β -galactosidase durante o cultivo.

Embora a fase estacionária ($\mu = 0$) seja estabelecida em 144 horas de cultivo, anteriormente a fase de desaceleração encontrada possuía, uma velocidade de crescimento tão baixa quanto $0,004 \text{ h}^{-1}$, o que é praticamente desprezível. Tal fato pode explicar a afirmação de que a atividade máxima de β -galactosidase pode ocorrer no início da fase estacionária (de 8 a 20 horas de cultivo), como é descrito por outros autores (MAHONEY et al., 1974; DICKSON e MARKIN, 1980; INCHAURRONGO et al., 1994). Porém, neste trabalho enquanto a velocidade de crescimento não foi nula consideramos fase de desaceleração de crescimento.

É válido ressaltar que a delimitação das fases fisiológicas, caracterizadas pelas diferentes velocidades de crescimento, é importante na definição dos fatores que afetam o aumento e a queda da atividade de β -galactosidase. Diferentes velocidades de crescimento geram diferentes estados fisiológicos da célula, isto é, metabolismo, composição e morfologia celular diferentes. Portanto, na fase de desaceleração, quando a velocidade de crescimento varia com o tempo, há também vários estados fisiológicos. A fase estacionária caracteriza-se pela ausência de crescimento, com a população microbiana permanecendo viável graças a um metabolismo de manutenção. Nessa fase, vários eventos independentes do crescimento celular podem ocasionar variabilidade genética (HEIDENRICH et al., 2001).

Estudos anteriores evidenciaram que o aumento da atividade de β -galactosidase seria determinado por uma concentração ideal do indutor (galactose) no interior da célula, que levaria à ativação máxima ou apenas a ativação do lac-gal regulon, em diferentes graus, enquanto a queda na atividade de β -galactosidase tem sido explicada pela exaustão da lactose (INCHAURRONGO et al., 1994). Alguns estudos mostraram que essa queda ocorria ainda quando a lactose estava presente em concentrações significativas no meio (MAHONEY et al., 1974; DICKSON e MARKIN, 1980). Outros autores sugerem que a queda na atividade é o resultado de concentrações

limitantes de lactose e concentrações crescentes de etanol, que desvia o metabolismo para um crescimento diáuxico, diminuindo, portanto, a necessidade da síntese da enzima (HOLMBERG et al., 1984; GENARI, 2000). DICKSON E MARKIN (1980) propuseram ainda que a redução da atividade da enzima poderia ser explicada pela sua inativação.

Os resultados aqui apresentados confirmam picos de atividade máxima no final da fase exponencial e no início da fase de desaceleração, em culturas conduzidas sob regime de batelada e, em regime contínuo, na velocidade específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$, que corresponde a um ponto na fase de desaceleração do crescimento próximo a fase estacionária. Entretanto, a atividade máxima da enzima não está diretamente relacionada com uma concentração definida de lactose no meio, mas talvez com a hidrólise intracelular e a utilização mais imediata da glicose, o que segundo SCHAFFRATH e BREUNIG (2000) garante uma relação galactose/glicose maior e a conseqüente ativação do lac-gal regulon. A queda na atividade de β -galactosidase não está relacionada ao crescimento diáuxico, como foi proposto por HOLMBERG et al. (1984) e GENARI (2000), pois na sua ocorrência em todas as culturas estudadas (batelada e contínua) *K. lactis* ainda consumia lactose enquanto produzia etanol. Desta forma, ainda no momento em que foi detectada a queda de atividade da enzima havia lactose no meio, o que indica que a queda não está relacionada também com a sua exaustão no meio. Segundo DICKSON E MARKIN (1980), uma taxa de indução máxima da β -galactosidase é possível com um mínimo de 2mmol/L de lactose no meio. Assim, fortalece-se a idéia de que é o balanço entre galactose e glicose no interior da célula responsável pela indução. A máxima indução poderia ser causada pelo máximo de vezes que a concentração ideal do indutor (galactose) é estabelecida no interior da célula.

DICKSON e MARKIN (1980), cultivando *K. lactis*, observaram que o máximo de atividade de β -galactosidase era apenas alcançado se as células tivessem passado por sete a nove gerações na presença do indutor. No cultivo de *K. lactis*, em regimes de batelada e contínuo em SUF, o máximo de

atividade da enzima não coincidiu com o mesmo intervalo de número de gerações. Diante deste resultado, conclui-se que provavelmente exista um fator, além da idade fisiológica proposta por DICKSON e MARKIN (1989), que levaria a atividade a ser máxima, que não é a relação galactose/glicose no interior da célula, uma vez que no experimento em que foram adicionadas diferentes concentrações de lactose a atividade não retornou ao pico máximo.

Durante o cultivo em batelada também foram observados picos de atividade anterior e posterior ao pico máximo. Na ocorrência desses picos também houve variação na concentração de lactose no meio, e em alguns casos até a sua exaustão. Na queda da atividade, a lactose estava presente no meio (na maioria dos picos) e o etanol estava sendo produzido enquanto a concentração de lactose no meio não foi limitante. Após o estabelecimento do crescimento diáuxico, dois picos de atividade foram observados, o que reforça a idéia de que mesmo utilizando uma rota metabólica alternativa (oxidação do etanol) e a lactose sendo limitante no meio *K. lactis* tendo a galactose superior à glicose no seu interior ativa o lac-gal regulon.

Analisando os resultados da eletroforese de β -galactosidase intracelular dos experimentos realizados em regimes de batelada e contínuo, observaram-se as seguintes situações : 1) queda na atividade da enzima sem alteração da banda protéica no gel, 2) queda na atividade da enzima com aumento da banda protéica no gel, 3) queda na atividade da enzima com queda da banda protéica no gel, 4) atividade máxima da enzima com aumento da banda protéica no gel, 5) atividade máxima da enzima sem alteração da banda protéica no gel e 6) aumento da atividade da enzima com queda na banda protéica no gel.

Três situações distintas explicam a queda na atividade. A primeira situação pode ser explicada por haver inativação da enzima e a segunda por haver aumento da produção da enzima, seguido de inativação. CHEN et al. (1985) observaram inibição competitiva pela D-galactose e inibição não-competitiva pela D-glicose durante ensaios de hidrólise enzimática de lactose por β -galactosidase em *K. lactis*. Desta forma, a queda de atividade no início da fase de desaceleração, não-detectada no gel, pode ser devido à inativação

da enzima pelos produtos da reação, que por algum sinal celular não foram totalmente consumidos, permanecendo elevados no interior da célula. Quando essa situação ocorre no final do cultivo, a queda na atividade pode ser explicada pela repressão da síntese devido à exaustão do indutor, e a permanência da intensidade da banda significa que não houve degradação. Já a queda na atividade com o aumento da intensidade da banda no gel provavelmente ocorre porque neste momento a célula atinge a relação ideal galactose/glicose, ativando o lac-gal regulon, ocorrendo a síntese de β -galactosidase, no entanto indica que a enzima foi inativada. Também houve uma terceira situação em que a queda na atividade da enzima correspondeu a uma diminuição na intensidade da banda protéica, o que evidencia repressão catabólica no lac-gal regulon. Se a queda ocorreu no início da fase de desaceleração do crescimento ou se a queda foi verificada no final da fase de desaceleração, conclui-se que houve falta do indutor ou degradação.

Quando a atividade máxima corresponde a um aumento na intensidade da banda protéica, indica o máximo de ativação, isto é, a relação intracelular ideal de galactose/glicose o que permite a máxima indução do lac-gal regulon. Ainda com relação a atividade máxima detectou-se um pico de atividade semelhante ao máximo porém a intensidade de sua banda era maior no gel. Sendo assim, houve uma nova indução máxima do lac-gal regulon, que aumentou a concentração da enzima, porém estas se tornaram inativas o que permitiu a atividade ser semelhante. Possivelmente isso ocorreu devido a um aumento nos produtos da reação (galactose e glicose).

E ainda, houve uma situação onde um aumento na atividade da enzima correspondeu a diminuição na intensidade da banda no gel. Esse fato ocorreu no final da fase de desaceleração do crescimento, onde já não havia lactose no meio, as células já consumiam etanol e a concentração de β -galactosidase declinava. Portanto, esse aumento na atividade pode ser atribuído por haver reativação das enzimas existentes.

Finalmente nas amostras de sobrenadante dos respectivos tempos de cultivo de ambas as bateladas e cultura contínua submetidas ao gel, não se

encontrou β -galactosidase, indicando que o etanol produzido não permeabilizou a cultura de *K. lactis* utilizada neste trabalho. Foi notável a produção de etanol por *K. lactis* em SUF tanto em regime de batelada quanto em regime contínuo, onde cerca de 55 a 69% da lactose foi convertida a etanol. Outras pesquisas (MAHONEY et al., (1974); HOLMBERG et al., 1984) mostraram resultados semelhantes onde, mais de 30% da lactose metabolizada foi convertida em etanol por *K. lactis* CBS2360, *K. marxianus* e *K. fragilis*, cultivadas em SUF ou em meio YPL em regime de batelada, o que resultou em baixo rendimento da biomassa e crescimento diáuxico após a entrada na fase estacionária. Em um outro estudo, INCHAURRONDO et al. (1994) cultivaram, em regime de batelada, várias linhagens de *K. lactis* em meio sintético contendo lactose, e afirmaram que menos de 5% da lactose do meio foi convertida a etanol. Essa variação no metabolismo respirofermentativo de *K. lactis* está relacionada à aeração durante o cultivo, pois *K. lactis* é considerada uma levedura Crabtree negativa, isto é, se houver um ambiente com excesso de açúcar e saturado de oxigênio ela respira e não fermenta. A fermentação somente ocorrerá quando a concentração de oxigênio for limitante.

Diante desses resultados, conclui-se que para haver aumento da atividade da enzima a glicose deve ser efetivamente utilizada pela via glicolítica (evitando a inativação e repressão catabólica) e a galactose, pela via Leloir, evitando a inativação e também agindo na produção de β -galactosidase, pois no passo inicial da via a enzima galactoquinase (enzima de natureza bifuncional), além de fosforilar a galactose, muda de conformação e se liga ao regulador negativo do lac-gal regulon, a proteína LAC10, causando a liberação da proteína reguladora positiva LAC9, que irá se auto-ativar, além de ativar os genes do lac-gal regulon. A diferença entre os picos de atividade e o pico máximo observado está na concentração do substrato (galactose) ainda presente no interior da célula, que corresponderá à amplitude da ativação, pois observa-se que quando a atividade foi máxima em todos os experimentos

houve aumento da intensidade da banda protéica no gel, isto é, aumento de síntese da enzima.

Já a queda pode ser causada por repressão catabólica (glicose>galactose), por inativação da enzima de forma competitiva (excesso de galactose) ou não-competitiva (excesso de glicose). É válido ressaltar que quando a queda na atividade da enzima ocorre nos estádios finais do crescimento, possivelmente esteja ocorrendo um processo de degradação enzimática.

Sendo assim, a união dos eventos de indução e repressão do lac-gal regulon, bem como da inativação e degradação da enzima, explica o fato de a atividade de β -galactosidase ser cíclica durante o cultivo em regime de batelada e sob taxas de diluição baixas e altas no cultivo contínuo.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Kluyveromyces lactis (*K. lactis*) foi cultivada em soro de queijo ultrafiltrado (SUF) em regimes de batelada e contínuo, com o objetivo de investigar as condições fisiológicas que levam ao aumento e à queda da atividade de β -galactosidase na entrada da fase de desaceleração do crescimento populacional.

Para investigar a variação da atividade de β -galactosidase durante o crescimento, caracterizaram-se as fases fisiológicas do crescimento no cultivo em batelada. Para padronizar a investigação, observou-se que as concentrações iniciais de células A) DO_{600} 0,1, B) DO_{600} 0,2 e C) DO_{600} 0,3 afetam a velocidade de crescimento A) $0,22\ h^{-1}$, B) $0,21\ h^{-1}$ e C) $0,18\ h^{-1}$, porém a delimitação das fases de crescimento é semelhante (a extensão da fase exponencial foi observada até 13 horas de cultivo, sendo a fase de desaceleração iniciada em 15 horas de cultivo aproximadamente). Uma batelada mais prolongada com uma população inicial menor (DO_{600} inicial de 0,04, $\mu = 0,37\ h^{-1}$, extensão da fase exponencial de 25 horas) foi realizada para determinar com maior precisão a fase estacionária, estabelecida em 144 horas de cultivo, e obter uma maior extensão da fase exponencial, permitindo uma observação mais criteriosa do comportamento da atividade da enzima.

A cultura contínua foi conduzida com fluxos de 0,1, 0,15, 0,2, 0,3 e 0,4 mL/h, que correspondem às velocidades específicas de crescimento $\mu = 0,06, 0,09, 0,12, 0,18, 0,24 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. O objetivo foi estratificar a fase de desaceleração do crescimento, o que auxiliou na análise dos dados obtidos no cultivo em batelada.

Durante os cultivos acompanharam-se os picos e as quedas da atividade de β -galactosidase, consumo de lactose, a formação e o consumo de etanol e perfil eletroforético de β -galactosidase intra e extracelular por *K. lactis*. Os resultados demonstraram picos de atividade máxima da enzima no final da fase exponencial e início da fase de desaceleração nas culturas conduzidas em regime de batelada. Já no cultivo contínuo, o pico de atividade ocorreu na taxa de diluição de $0,09 \text{ h}^{-1}$ (distante do $\mu_{\text{máx}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$). Nestas condições, as concentrações de lactose no meio nem sempre se correlacionam com o máximo da atividade da enzima, mas indicaram, como demonstrado por vários autores, que a relação galactose>glicose no interior da célula deve ser responsável pela máxima indução do lac-gal regulon.

Observou-se, ao longo de todo o experimento, que mesmo nos momentos de queda na atividade enzimática, após os picos de atividade máxima, a lactose ainda era detectada no meio e continuava sendo consumida, enquanto o etanol era detectado em concentrações crescentes. Essas observações indicam que a queda na atividade não está relacionada com a exaustão de lactose no meio, nem com o crescimento diáuxico à custa do etanol, embora durante a fase de desaceleração do crescimento da cultura em batelada tenha sido observada diauxia quando as concentrações de lactose no meio eram insignificantes.

Outros picos de atividade foram evidenciados antes e após o pico máximo, e os dados obtidos reforçaram a idéia de que o aumento na atividade não está relacionado diretamente com a concentração de lactose no meio, assim como a queda não está relacionada com a exaustão da lactose ou com a assimilação de etanol. A diferença entre os picos de atividade e o pico máximo observado está na concentração do substrato (galactose) ainda presente no

interior da célula, que corresponderá à amplitude da ativação, pois observa-se que quando a atividade foi máxima em todos os experimentos houve aumento da intensidade da banda protéica no gel, isto é, aumento de síntese da enzima.

β -galactosidase das amostras das culturas em batelada e contínua foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante e indicaram que não existe uma relação direta entre a atividade da enzima e a concentração da proteína, com exceção nos tempos em que a atividade é máxima, quando houve aumento da intensidade da banda protéica no gel. Nas amostras de sobrenadante de ambas as bateladas e cultura contínua submetidas ao gel, não se encontrou β -galactosidase, indicando que o etanol produzido não permeabilizou a cultura de *K. lactis* utilizada neste trabalho. Foi notável a produção de etanol por *K. lactis* em SUF tanto em regime de batelada quanto em regime contínuo, onde cerca de 55 a 69% da lactose foi convertida a etanol.

As observações permitem concluir que o aumento seguido da queda na atividade de β -galactosidase esteja relacionado com a relação galactose/glicose intracelular, de acordo com o modelo proposto anteriormente. Também, os eventos de regulação que envolvem indução e repressão da síntese de β -galactosidase, associada à regulação da atividade por inibição ou degradação da enzima, explicam a variação cíclica da cinética da atividade de β -galactosidase durante o cultivo em regime de batelada e sob taxas de diluição baixas e altas no cultivo contínuo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBA, D, BEOLCHINI, F., Del Re, G., GIACOMO, G. Di., VEGLIÓ, F. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. **Process Biochemistry**, n.36, p. 531-536, 2001.
- BONEKAMP, F.J., OOSTERON, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, n.1, p.1-3, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- BRANDI, I.V., PASSOS, F.M.L., SILVA, D.O. Modeling of the growth and β - galactosidase synthesis by *Kluyveromyces lactis* in whey permeate. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 25, 1996, Caxambu. **Resumos...** CNPq, FINEP.
- BREUNIG, K.D., FUKUHARA, M.B., BIANCHI, M.M., BOURGAREL, D., FALCONE, C., FERRERO, I., FRONTALI, L., GOFFRINI, P., KRIJGER, J.J., MAZZONI, C., MILKOWSKI, C., STEENSMA, H.Y., WESOŁOWSKI-LOUVEL, M., ZEEMAN, A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, n.26, p. 771-180, 2000.
- BRUNO, L.M. **Secreção de proteínas nativas por *Kluyveromyces lactis*, *marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae***. Viçosa, MG:UFV, 1999. 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Viçosa.

- CARVALHO, L.S. **Crescimento de *Kluyveromyces lactis marxianus* var. *lactis* em soro de queijo e atividade de β -galactosidase.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Viçosa.
- CHAMPAGNE, C.P., GOULET, J. Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed cheese-whey ultrafiltrate. **Food Science Technology**, n. 21, p. 545-548, 1988.
- CHEN, K.C., HOUNG, J.Y, LING, A.C. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.9, p.300-302, 1985.
- DICKSON, R.C, DICKSON, L.R., MARKIN, J. S. Purification and properties of inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.137, n.1, p.51-61, 1979.
- DICKSON, R.C, MARKIN, J.S. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.142, n.3, p.777-785, 1980.
- DICKSON, R.C., RILEY, M.I. The lactose-Galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. In: Barr, P.J., Brake, A.J.; Valenzuela, P. **Yeast Genetic Engineering Butterworth**. Boston, p 19-40, 1989.
- DORAN, P.M., BAILEY, J.E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, n.1, p.73-87, 1986.
- ENCARNACIÓN, F. DOMÍNGUEZ, A. Heterologous protein secretion directed by a repressible acid phosphatase system of *Kluyveromyces lactis*: Characterization of upstream region-activating sequences in the *KLPHO5* gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.7, p.2403-2408, 1998.
- GENARI, N.A. **Configuração de um Biorreator de leito fixo para hidrólise da lactose.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 62p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Viçosa.
- GRIFFIN, H.D. **Fungal Physiology**. Second Edition. USA: Wiley-Liss Inc, 1994. 458p.
- HEIDENREICH, E.; WINTERSBERGER, U. Adaptive reversions of a frameshift mutation in arrested *Saccharomyces cerevisiae* cells by simple deletions in mononucleotide repeats. **Mutation Research**, n.473, p.101-107, 2001.
- HOEK, P.V., DIJKEN, J.P.V, PRONK, J.T. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p.4226-4233, 1998.

- HOLMBERG, G.A., Oy, R., OJAMA, H., PERTTULA, M., RANTA, J. Utilization of models in the prediction and optimization of yeast beta-galactosidase production. In: **Third European Congress of Biotechnology**, v.1, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, p. 699-704
- INCHAURRONDO, A.V., YANTORNO, M.O., VOGET, E.C. Yeast Growth and β -Galactosidase Production During Aerobic Batch Cultures in Lactose-Limited Synthetic Medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994
- INCHAURRONDO, V.A., FLORES, M.V., VOGET, C.E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.20, n.1, p.291-298, 1998.
- JEONG, Y.S., VIETH, W.R., MATSUURA, T. Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in a immobilized yeast membrane bioreactor. **Biotechnol. Bioengng**, n.37, p.587-590, 1991.
- KAISER, C. et al. Nitrogen-Regulated sorting of membrane proteins. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 29, 2000, Caxambu. **Resumos...** Cambridge: SBBq, 2000.
- KIERS, J., ZEEMAN, A.M., LUTTIK, M., THIELE, C., CASTRILLO, J., STTENSMA, H.Y., DIJKEN, J.P.V., PRONK, J.T. Regulation of Alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, n.14, p. 459-469, 1998.
- KENNEDY, J.P. Utilization of whey ans products. **Journal of Culture Dairy Products**, v.1, n.1, p.13-15, 1985.
- KULIKOVA, A.K., GOMARTELI, M.M., TSERETELI, A.K. et al. β -galactosidase of lower eukaryotes (Fungi and Yeast) (Review). **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, oscow, v.25, n.6, p.734-746, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, n. 227, 680-685, 1970.
- MAHONEY, R.R., NICKERSON, T.A., WHITAKER, J.R. Selection of strains, growth condictiones and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal Dairy Science**, v.58, n.11, p. 1620-1629, 1974.
- MOAT, A.G., FOSTER, W.J. **Microbial Physiology**. Third Edition. Wiley-Liss Inc. 1995, p.580
- NEIDHART, F.C., INGRAHAM, J. L., SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell. A molecular approach**. Cap15, Sinaver associates, Inc. Publlishers Sundeland. MA, 1990.

- NUNES, M.F.A., MASSAGUER, S., ALEGRE, R.M. Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.29, n.1, p.25-30, 1993.
- RICHMOND, M.L., GRAY, J.I., STINE, C.M. Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1579-771, 1981.
- RIOU, C., NICAUD, J.M., BARRE, P.GAILLARDIN, C. Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **Yeast**, v.13, n.1, p. 903-915, 1997.
- ROMANOS, M. A., SCORER, C.A., CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v.8, n.6, p. 423-488, 1992.
- SAMBROOK, J., FRTSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SCRAFFRATH, R., BREUNIG, K.D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, n.30, p.173-190, 2000.
- SISO, M.I.G., CERDAN, E., PICOS, M.A.F. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: A comparison of different treatments. **Biotechnology Techniques**, v.6, n.4, p.289-292, 1992.
- SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, n.57, p.1-11, 1996.
- SISO, M.I.G, RAMIL, E., Cerdán, M.E., FREIRE-PICOS, M.A. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the crabtree effect. **Enzyme and Microbial Technology**, n.18, p.585-591, 1996.
- SISO, M.I.G., FREIRE-PICOS, M.A., RAMIL, E., GONZÁLEZ-DOMINGUEZ, M., TORRES, A.R., CERDÁN, M.E. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis* insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, n26, p. 699-705, 2000.
- SMITHERS, G.W., BALLARD, F.J., COPELAND, A.D. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.1, p.1454-1459, 1996.
- SOMKUTI, G.A., HOLSINGER, V.H. Microbial technologies in the production of low-lactose dairy foods. **Food Science and Technology International**, v.3, p.163-169, 1997.

- WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. New York, Wiley, 1998.
- WASHBURN, M.W., BRAUN, E., JOHNSTON, G.C.; SINGER, R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v.57, n.2, p.383-401, 1993.
- WHITTIER, O.E, WEBB, B.H. **By products from milk** Reinhold Publishing Corporation, cap.1, p.1-17, 1950.
- WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.1, p.597-608, 1998.
- ZAICHAIRE, P.K., BREUNIG, K.D. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator Lac9 (*KL GAL4*). **Nucleic Acids Research**, v.21, n.1, p.69-77, 1993.
- ZENKE, F.T., ZACHARIAE, W., LUNKES, A., BREUNIG, K.D. Gal 80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. **Molecular and Cellular Biology**, v.13, n.12, p.7566-7576, 1993.