

RAPHAEL HERMANO SANTOS DINIZ

**METABOLISMO DE LACTOSE EM**  
***Kluyveromyces marxianus* UFV-3 E *Kluyveromyces lactis* JA6**

Dissertação 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**  
**2009**

RAPHAEL HERMANO SANTOS DINIZ

**METABOLISMO DE LACTOSE EM**  
***Kluyveromyces marxianus* UFV-3 E *Kluyveromyces lactis* JA6**

Dissertação 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: 17 de fevereiro de 2009.

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Mara Soares Bazzoli  
(Coorientadora)

---

Prof. Luciano Gomes Fietto  
(Coorientador)

---

Prof. Frederico José Vieira Passos

---

Dr<sup>a</sup>. Virgínia Maria Chaves Alves

---

Prof<sup>a</sup> Flávia Maria Lopes Passos  
(Orientadora)

*“Um dia o Buda estava atravessando um rio em um barco quando um yogui aproximou-se caminhando sobre a água. O yogui perguntou:*

*-Ao acaso és tu o iluminado? Se for, deve poder fazer isso!*

*Buda respondeu:*

*-Quantos anos levaste para conseguir fazer isso?*

*O yogui respondeu:*

*- 56 anos de muita disciplina, meditando com quase nenhuma comida ou bebida.*

*Buda retrucou:*

*-Prefiro atravessar de barco.”*

*Todo abismo é navegável a barquinhos de papel. (João Guimarães Rosa)*

## AGRADECIMENTOS

Àquele(s) que tece(m) o tecido do destino.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Prof<sup>a</sup> Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação e por ter acreditado em mim desde os idos de 2003 quando nem eu mesmo sabia o que queria e muito menos tinha notas para sonhar alto.

Ao Prof<sup>o</sup> Luciano Gomes Fietto pela total presteza e disponibilidade para responder a todos os questionamentos e dúvidas (que não foram poucas) no decorrer deste projeto.

À Prof<sup>a</sup> Denise Mara Bazzolli pela compreensão, bons conselhos e apoio dados na condução do trabalho.

Ao Prof. Frederico José Vieira Passos e à Doutora Virgínia Alves pela disponibilidade de participação na banca de defesa e pelos bons conselhos dados.

Aos estudantes, pesquisadores e professores do Departamento de Microbiologia Agrícola que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que passaram e continuam no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos que muito auxiliaram e conviveram mais diretamente com minhas alterações de humor: Ancély, Mariana, Marina, Rafael Cunha, Júlio, Lygia, Valdilene,

Tatiana, Tatiane, Marisa, Gisela, Cláudia, Ximena, Fábio, Priscila, Otávio, Liliane, Marcelo, Mariana, Rafael, Cássia, Paula, Rodrigo, Adriana, Lívia.

Agradecimento especial à Talita por ser responsável por grande parte da realização deste trabalho, ao Wendel, pelos ensinamentos e pelas idéias para a realização do projeto e ao Agenor pela amizade e contribuições diversas.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia Agrícola pela disponibilidade e pelos diversos serviços realizados: Nilcéia, D. Laura, Rejane, Cássia, D. Aparecida, José Carlos, Evandro, Danilo, “Seu” Paulo e Pablo.

À todos os professores e funcionários do Colégio Sant`Anna que muito auxiliaram na formação de meu caráter no início de minha vida escolar e que são diretamente responsáveis pelas minhas vitórias acadêmicas: Padre José, “Tia” Elina, Marcio, além de todos os professores, em especial à Sibebe, Regina, Rogério, Neneca, Joana, Tibúrcio, Maria Helena, Uéslei, Elimar, Fátima, Zenáide.

À todos os professores e funcionários do CEFET-MG/Divinópolis que contribuíram para as resoluções de minha vida em um período de constantes dúvidas e indagações.

Aos que passaram pelo Cursinho Popular DCE/UFV (professores e em especial aos alunos) um local em que realmente muito aprendi.

Aos amigos que fiz e perdi no decorrer destes 26 anos de Mateus Leme, Azurita, Itaúna e principalmente de Divinópolis, Viçosa e agora Pará de Minas; que demonstraram que é possível haver pessoas que valem a pena em um mundo cada vez mais medíocre: Mangões, Léo, Pé de Pano, Jupira, Maçã, Breno, Beбето, Pai Gil, Nicks, Robert, Paulo José, Bruno, Sabrina, Clóvis, Montanha, Ferrugem, Alyne, Luiziane, Luiziete, Valda, Godas, Cabide, Tiché, John, Devil, Gerson, Gaúcho, Marcelo, Carlão, Júlio, dentre inúmeros outros que não hei de lembrar.

Aos meus pais Luiza e Zé por muito terem feito, e continuam fazendo, por mim; ao meu irmão Bruno por muito ter me ensinado sobre a vida, a meus avós principalmente Rosária, Aristeu, Terezinha, meus tio(a)s, minha madrinha Meire (pelas orações diversas) e Tio Zico, Sérgio e Sirlei.

A todos que passaram pela minha, que não foram poucos, que com certeza contribuíram para este trabalho. A falta de qualquer pessoa mudaria o rumo de tudo na minha vida

Valeu!

## **BIOGRAFIA**

RAPHAEL HERMANO SANTOS DINIZ, filho de Luiza Maria Conceição Santos Diniz e José Araújo Diniz, nasceu em 09 de março de 1983. Em 1988 começa sua vida escolar no Colégio Sant'Anna em Itaúna de onde se despede em 1997. Em 1998 ingressa no CEFET-MG/Divinópolis vindo a concluir o ensino médio em 2000.

Em março de 2002 ingressa na Universidade Federal de Viçosa, vindo a se graduar em Licenciatura em Ciências Biológicas em março de 2007.

Em março de 2007 inicia o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 17 de fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Linhagens e manutenção de leveduras .....	11
3.2. Inóculo e ativação das leveduras.....	11
3.3. Processos de fermentação .....	12
3.3.1. Em condição de aerobiose.....	12
3.3.2. Em condição de oxigênio limitante (hipoxia) .....	13
3.4. Relação entre absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) e massa celular seca ( $g L^{-1}$ ).....	14
3.5. Cinética de crescimento.....	14
3.5.1. Velocidade específica de crescimento e constantes cinéticas.....	15
3.6. Determinação da concentração de lactose e de formação de produtos metabólicos .....	15

3.7. Parâmetros fermentativos de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 e <i>Kluyveromyces lactis</i> JA6 .....	15
3.8. Atividade enzimática .....	16
3.8.1. Preparo do extrato de células .....	16
3.8.2. Proteína total .....	17
3.8.3 Ensaio enzimáticos.....	17
3.9. Análise da expressão gênica .....	19
3.9.1 Extração de RNA total .....	19
3.9.2. Desenho de oligonucleotídeos correspondente aos genes utilizados no PCR quantitativo em Tempo Real .....	20
3.9.3. Análise da expressão de genes do metabolismo de lactose por PCR quantitativo em Tempo Real .....	20
4. RESULTADOS .....	22
4.1. Cinética de crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 e <i>Kluyveromyces lactis</i> JA6 em função da concentração de lactose, sob condições aeróbias e hipóxicas. ....	22
4.2. Formação de produtos, consumo de lactose e parâmetros fermentativos de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 e <i>Kluyveromyces lactis</i> JA6 em função da concentração de lactose, sob condições aeróbias e hipóxicas. ....	24
4.3. Atividade enzimática em <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 e <i>Kluyveromyces lactis</i> JA6 nas fermentações em meio contendo lactose, sob aerobiose e hipoxia. .	27
4.4. PCR quantitativo em Tempo Real, para estudo da expressão de genes do metabolismo de lactose nas fermentações de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV3 e <i>Kluyveromyces lactis</i> JA6 em meio contendo lactose, sob aerobiose e hipoxia. ....	29
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXO .....	44

## RESUMO

DINIZ, Raphael Hermano Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Luciano Gomes Fietto.

O metabolismo fermentativo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 foi comparado ao de *Kluyveromyces lactis* JA6 em aerobiose e hipoxia por meio da análise de cinéticas de crescimento, consumo de substrato, produção de etanol e formação de biomassa, em função da concentração de lactose. Determinou-se ainda a expressão gênica e atividade de enzimas-chave do metabolismo de lactose em aerobiose e hipoxia. Nas fermentações conduzidas em aerobiose e hipoxia em concentrações de lactose de 0,25 a 64 mM, *K. marxianus* UFV-3 apresentou maior velocidade específica de crescimento e maior concentração de biomassa após 24 horas de cultivo, em relação a *K. lactis* JA6. Nas fermentações com 64 mM de lactose em aerobiose e hipoxia *K. marxianus* UFV-3 mostrou maior rendimento de etanol por lactose que *K. lactis* JA6, demonstrando que alta concentração de substrato favorece metabolismo fermentativo em *K. marxianus* UFV-3. Sob aerobiose *K. marxianus* UFV-3 possui maior atividade de piruvato desidrogenase que *K. lactis* JA6, justificando a maior formação de biomassa e maior velocidade de crescimento verificada em *K. marxianus* UFV-3 em aerobiose. Sob hipoxia as maiores atividades de  $\beta$ -galactosidase e de piruvato descarboxilase de *K. marxianus* UFV-3 em relação à *K. lactis* JA6 parecem ser os fatores que contribuem para a maior formação de etanol de *K.*

*marxianus* UFV-3 quando comparado a *K. lactis* JA6. Em hipoxia *K. marxianus* apresentou maior expressão de genes que codificam enzimas para a via de Leilor, para a enzima  $\beta$ -gal e piruvato descarboxilase quando comparado à aerobiose. Indicando que estes genes são importantes para o metabolismo de lactose em hipoxia. Já em *K. lactis* JA6 nenhum destes genes apresentou expressão aumentada em hipoxia. Tanto a maior expressão de genes que codificam enzimas chaves do metabolismo de lactose quanto à maior atividade enzimática parecem ser os responsáveis pela capacidade fermentativa de *K. marxianus* UFV-3.

## ABSTRACT

DINIZ, Raphael Hermano Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Metabolism of lactose by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 and *Kluyveromyces lactis* JA6.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Luciano Gomes Fietto.

The fermentative metabolism of lactose in *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 was compared to the *Kluyveromyces lactis* JA6 under aerobic and hypoxia through the analysis of kinetics of growth, consumption of substrate, production of ethanol and formation of biomass, depending on the concentration of lactose. It was determined the gene expression and activity of key enzymes of metabolism of lactose under aerobic and hypoxia. In fermentations carried out under aerobic and hypoxia in lactose concentrations of 0.25 to 64 mM, *K. marxianus* UFV-3 showed higher specific growth rate and higher concentration of biomass after 24 hours of cultivation, for *K. lactis* JA6. In fermentations with 64 mM lactose under aerobic and hypoxia *K. marxianus* UFV-3 showed higher yield to ethanol by *K. lactis* JA6, demonstrating that high concentrations of substrate metabolism favors fermentation in *K. marxianus* UFV-3. Under aerobic *K. marxianus* UFV-3 has more activity of pyruvate dehydrogenase than *K. lactis* JA6, justifying the formation of higher biomass and higher growth rate observed in *K. marxianus* UFV-3. Under hypoxia the highest activities of pyruvate decarboxylase and  $\beta$ -galactosidase of *K. marxianus* UFV-3 in relation to *K. lactis* JA6 seem to be the factors that contribute to the increased formation of ethanol in *K. marxianus* UFV-3 when compared to *K. lactis* JA6. In hypoxia *K. marxianus* showed higher expression of genes that encode enzymes  $\beta$ -galactosidase, pyruvate decarboxylase and the Leilor

pathway for when compared to aerobic. Indicating that these genes are important for the metabolism of lactose in hypoxia. Already in *K. lactis* JA6 none of these genes showed increased expression in hypoxia. It appears the higher expression of genes encoding key enzymes of metabolism of lactose as the major enzymatic activity is responsible for fermentation potential of *K. marxianus* UFV-3.

## 1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 33% de todo o leite industrializado no país é destinado à produção de queijos. O principal subproduto da indústria do queijo é o soro sendo sua composição aproximada de 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de lipídios, 0,2% de ácido láctico além de diversos minerais e vitaminas. Para cada quilo de queijo são produzidos cerca de nove quilos de soro, sendo que este resíduo apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO). O processamento do soro para aproveitamento de seus nutrientes não é economicamente viável para pequenas e médias indústrias e o descarte incorreto desse subproduto nos cursos d'água ocasiona um grande problema ambiental.

O principal constituinte, e responsável pela alta DBO, do soro, a lactose, pode ser convertido em etanol combustível e auxiliar na demanda energética de indústrias, se tornando, portanto uma proposta viável e ecologicamente correta. Leveduras do gênero *Kluyveromyces*, ao contrário de *Saccharomyces cerevisiae*, estão entre as poucas leveduras na natureza capazes de utilizar lactose como única fonte de carbono e energia e, portanto, aptas a fermentarem o soro de queijo. *Kluyveromyces lactis*, levedura modelo para estudos do metabolismo de lactose, possui o genoma sequenciado e é uma levedura Crabtree negativa, isto é, possui baixos rendimentos fermentativos em ambientes aeróbios, sendo considerada uma levedura respiro-fermentativa. A linhagem *Kluyveromyces lactis* JA6 é reconhecida pelas altas taxas de consumo de glicose e consequente produção de etanol, isto provavelmente devido, à presença de um gene transportador de hexose, adicional,

o *KHT2*, que não está presente em outras estirpes. Outra espécie do gênero *Kluyveromyces*, *Kluyveromyces marxianus* tem sido isolada em ambientes diversos, o que resulta em alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo intra-espécie. Um isolado do ambiente de laticínios na região da Zona da Mata Mineira que foi nomeado *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 mostrou rendimentos de etanol próximo aos valores teóricos, em condição de alta concentração de lactose e baixo nível de oxigênio indicando um potencial fermentativo superior em relação à *K. lactis*. Esta maior capacidade fermentativa ainda não foi compreendida. Sabe-se que o metabolismo de lactose em *K. lactis* inicia-se com o transporte do açúcar para o citoplasma através da permease da lactose, sendo que o dissacarídeo é hidrolisado pela enzima  $\beta$ -galactosidase, originando os monômeros, glicose e galactose. A glicose é metabolizada por meio da via glicolítica, enquanto que a galactose é primeiramente metabolizada pela via de Leloir originando o intermediário glicolítico glicose 6-fosfato. A última reação da via glicolítica forma piruvato, que dependendo das condições de cultivo da levedura, pode ser totalmente oxidado a  $\text{CO}_2$  pela via do ácido tricarbóxico ou reduzido a etanol. Por apresentar fenótipo Crabtree negativa *K. lactis* possui a resposta ao oxigênio como fator determinante para o metabolismo fermentativo.

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi analisar o metabolismo fermentativo das leveduras *Kluyveromyces lactis* JA6 e *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 em meio contendo lactose em aerobiose e hipoxia. Os resultados deste trabalho podem contribuir no sentido de fornecer informações que possibilitem subsidiar a modulação da regulação do metabolismo fermentativo da lactose via concentração de oxigênio. Com isso pode-se definir estratégias experimentais para maximizar a exploração destas leveduras na produção industrial de etanol a partir de soro de queijo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo e estima-se que em 2007 tenha produzido cerca de 26,9 milhões de litros de leite, sendo que 17,4 milhões de litros foram adquiridos por 12.880 indústrias fiscalizadas pelo governo (IBGE, 2007). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do país com um total de 6,6 milhões de litros de leite ao ano sendo que desde os anos 90 há um crescimento contínuo desta atividade. A região da Zona da Mata Mineira é a terceira maior região produtora de leite do Estado e a sexta maior mesorregião produtora do país com um total de 628.000 litros de leite por ano. Aproximadamente 33% de todo o leite industrializado no país é destinado à produção de queijos (EMBRAPA, 2007). O Brasil é o sexto maior produtor de queijo do mundo com um volume estimado de 495 mil toneladas (KIENDL, 2005) e o estado de Minas Gerais destaca-se como seu maior produtor, possuindo aproximadamente 27.000 queijarias que produzem mais de 70.000 toneladas de queijo por ano (MINAS GERAIS, 2005).

O principal subproduto da indústria do queijo é o soro, cuja composição é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de lipídios, 0,2% de ácido láctico, além de minerais e vitaminas (GHALY e BEM-HASSAN, 1995). Para se produzir um quilo de queijo, nove quilos de soro são gerados sendo que o processamento de cerca de 100 toneladas de leite produz aproximadamente a mesma quantidade de compostos orgânicos nos efluentes que uma cidade de 55.000 habitantes (GONZÁLEZ-SISO, 1996). Estima-se que o

volume total de soro de queijo no mundo ultrapasse  $10^8$  toneladas por ano (OZMIHCI e KARGI, 2007). Apesar de a legislação ambiental proibir o descarte do soro no ambiente, solo e águas, aproximadamente a metade deste efluente é descartada sem tratamento (GONZÁLEZ-SISO, 1996). O descarte do soro de queijo sem prévio tratamento pode provocar danos ambientais devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), calculada entre 50.000 a 60.000 mg de  $O_2$  por litro de soro. Em virtude do aumento da produção de queijos, a solução do problema ambiental causado pelo soro adquire caráter de urgência para que haja o crescimento sustentável da indústria de laticínios. Atualmente simplesmente tratar o soro de queijo é economicamente inviável para grande parte das indústrias de laticínios, que é constituída por pequenas e médias empresas (GHALY, 2003).

Acoplando ao tratamento do subproduto da indústria de queijo a geração de produtos de interesse econômico seriam reduzidos os custos do tratamento. As proteínas do soro de queijo possuem aminoácidos essenciais que são facilmente digeríveis, o que as qualificam como sendo de elevado valor biológico do ponto de vista nutricional. Portanto, a recuperação da porção protéica do soro pelo processo de ultrafiltração, isto é separação e concentração das proteínas do soro sob alta pressão, é a etapa inicial para a exploração racional e econômica do soro de queijo (SILVEIRA *et al.*, 2005). Apenas a recuperação das proteínas do soro de queijo, entretanto, não resolve o problema ambiental do soro de queijo, uma vez que, não há a remoção da lactose do permeado gerado na ultrafiltração (VIENNE e STOCKAR, 1985).

A lactose representa cerca de 70% dos sólidos do soro ultrafiltrado e é responsável pela alta DBO do subproduto (GONZÁLEZ-SISO, 1996). A conversão da lactose do soro de queijo a etanol por fermentação pode ser uma alternativa promissora por não gerar impactos negativos ao ambiente e por produzir uma fonte de energia renovável e capaz de contribuir com a matriz energética da própria indústria. A produção em grande escala de etanol combustível traz benefícios ambientais, sociais e econômicos devido à redução da emissão de produtos tóxicos no ambiente, ao estímulo à atividade agropecuária e a redução da dependência de combustíveis fósseis (HACK e MARCHANT, 1998). A crescente demanda pelo etanol combustível pode tornar viável o processo de tratamento do soro, pois os custos com o tratamento seriam diluídos devido ao retorno financeiro obtido com o uso ou comercialização do etanol. A produção de etanol a partir de soro já ocorre na Irlanda, Alemanha, Estados Unidos e principalmente na Nova Zelândia, onde 50% do soro são utilizados para produzir etanol (MAWSON, 1994).

Neste contexto a fermentação, por leveduras da fermentação alcoólica da sacarose da cana-de-açúcar, é a primeira estratégia a ser avaliada. Entretanto, linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura tradicional da fermentação alcoólica da sacarose, não assimilam ou fermentam lactose. Nesse caso seria necessária a hidrólise prévia do dissacarídeo ou a busca de outra levedura capaz de fermentar lactose, dentre as quais se destacam algumas espécies do gênero *Kluyveromyces*. Apesar de possuírem o mesmo ancestral comum os gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* possuem requerimentos nutricionais e redes metabólicas distintas, devido provavelmente, a diferença de nicho ecológico destes micro-organismos. Estas diferenças metabólicas fazem de leveduras do gênero *Kluyveromyces* interessantes alternativas à levedura modelo *S. cerevisiae* (RUBIO-TEXEIRA, 2005).

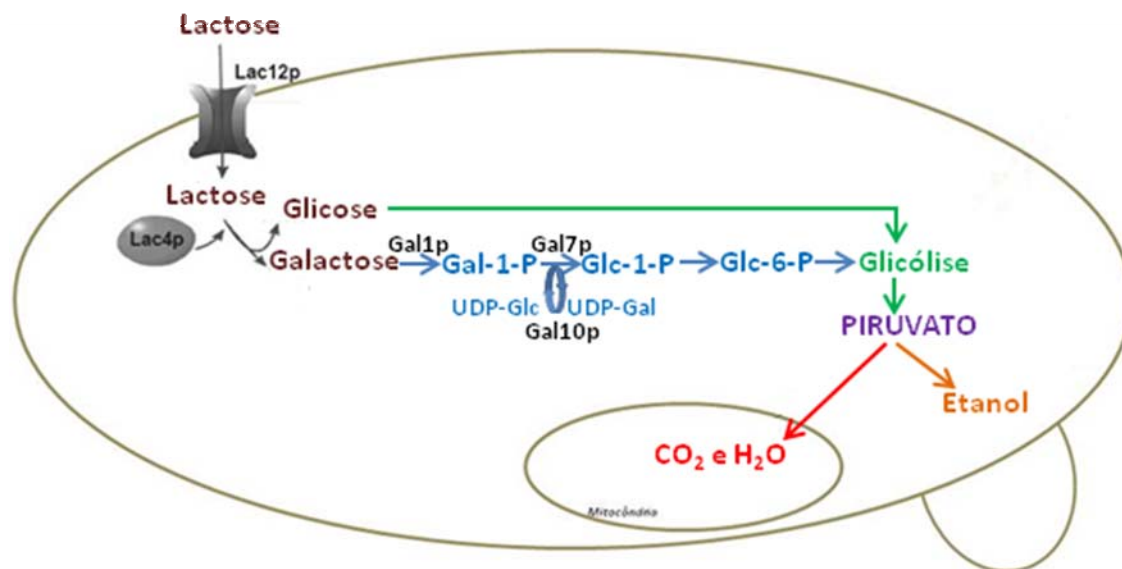
*Kluyveromyces lactis* é um ascomiceto unicelular, de forma esférica a oval, morfologicamente semelhante à levedura *S. cerevisiae* (WÉSOLOWSKI *et al.*, 1996). É comum na microbiota do queijo, onde participa dos estágios iniciais da fabricação do mesmo, modificando o pH e propiciando condições para o posterior desenvolvimento das bactérias lácticas (SULEAU *et al.*, 2006). Os estudos sobre esta levedura começaram em 1960, inicialmente com interesses puramente acadêmicos, como a regulação do metabolismo de carboidratos em eucariotos unicelulares. Desde então os interesses industriais por esse organismo têm crescido de forma considerável (FUKUHARA, 2006). A capacidade de *K. lactis* de assimilar grande variedade de compostos carbônicos, dentre eles pentoses e dissacarídeos, inclusive lactose, fazem desta levedura um interessante micro-organismo para estudos de biorremediação e na metabolização de substratos ou resíduos de baixo valor econômico. Além disso, *K. lactis* é mais adaptada a ambientes oxidativos que *S. cerevisiae* o que a qualifica como um modelo alternativo em estudos genéticos e fisiológicos de eucariotos (KURTZMAN e FELL, 1998). *K. lactis* é uma levedura *petite*-negativa cuja viabilidade é comprometida caso haja mutações no genoma mitocondrial. Essa propriedade também se relaciona com sua incapacidade de crescer em anaerobiose (SNOEK, 2005). Assim como ocorre com outros micro-organismos, *K. lactis* apresenta inúmeras linhagens sendo que a NRRL Y-1140 CBS2359, cuja sequência genômica está publicamente disponível (DUJON *et al.*, 2004), foi estabelecida como linhagem para estudos moleculares e genéticos (WÉSOLOWSKI, 1996). BREUNING e KUGER (1987) identificaram a linhagem *Kluyveromyces lactis* JA6, que apresenta consumo de glicose e produção de etanol, maior que outras linhagens, o que é atribuído

principalmente, à presença de um gene, adicional, de transportador de hexose, *KHT2* (WÉSOŁOWSKI, 1996). A dedução de aminoácidos da proteína Kht2 demonstra que ela é membro da família de proteínas Hxt (transportadores de hexose) além de possuir sequência de nucleotídeos similar (84% de identidade) à *RAG1* (transportador de baixa afinidade de glicose). A presença de *KHT2* possibilita a esta linhagem crescer em altas concentrações de glicose quando o gene *rag1* está deletado e a cadeia de transporte de elétrons bloqueada. Este fenótipo é conhecido como Rag<sup>-</sup> (resistência a antimicina A em glicose) e é pouco comum em outras linhagens de *K. lactis*. Além disso, *K. lactis* JA6 está sujeita à maior repressão catabólica por glicose se comparada a *K. lactis* CBS 2359 (WEIRICH *et al.*, 1997).

Outra levedura que se destaca em aplicações biotecnológicas, especialmente na produção industrial de β-galactosidase, é *Kluyveromyces marxianus* (FONSECA *et al.*, 2007). As leveduras *K. lactis* e *K. marxianus* possuem um ancestral comum recente, demonstrando proximidade filogenética (LACHANCE, 2007). A diferenciação entre *K. lactis* e *K. marxianus* dificilmente pode ser feita apenas a partir de estudos morfológicos, sendo necessárias análises bioquímicas e genéticas para isto. Enquanto *K. lactis* é vista como um modelo alternativo à *S. cerevisiae*, *K. marxianus* possui *status* de micro-organismo de aplicação prática (KURTZMAN e FELL, 1998). Esta levedura tem sido isolada em ambientes diversos, o que resulta em alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo intra-específico. Como consequência disto, diferentes aplicações biotecnológicas têm sido investigadas neste micro-organismo, como a produção de proteína celular (*single-cell protein*), de componentes aromáticos, de etanol e de bioingredientes a partir de soro de queijo; a redução de lactose em compostos lácteos; biorremediação; e mais recentemente hospedeiro para produção de proteínas heterólogas (FONSECA *et al.*, 2008). Assim como outros micro-organismos do gênero *Kluyveromyces*, *K. marxianus* possui a capacidade de crescer e fermentar em altas temperaturas (45 °C) o que resulta em uma diferença adicional quando comparado a *S. cerevisiae*. SINGH (1998) utilizou uma estirpe de *K. marxianus* para produzir bioetanol a partir de caldo de cana, em grandes fermentadores 60 m<sup>3</sup> e altas temperaturas (42 °C), obtendo resultados em determinadas condições superiores à *S. cerevisiae*. Devido ao grande potencial biotecnológico de *K. marxianus* o genoma da linhagem CBS 712 está sendo seqüenciado e 17% do genoma está disponível.

Foi isolada de ambientes de laticínios da Zona da Mata Mineira, uma linhagem identificada pela “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS) como *Candida kefir* (Beijerinck) Van Uden & Buckley ou de *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt em estado de não formação de ascósporos, que foi denominada como *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Esta levedura na condição de alta concentração de permeado de soro de queijo e baixo nível de oxigênio obteve rendimentos de etanol próximo aos valores teóricos, (SILVEIRA *et al.*, 2005) indicando potencial fermentativo superior em relação a *Kluyveromyces lactis*. A razão para esta maior capacidade fermentativa de *K. marxianus* ainda não foi documentada. Uma hipótese, para este maior potencial fermentativo, seria o maior fluxo no transporte e metabolismo da lactose quando comparado à *K. lactis*. Esta eficiência seria resultado tanto de maior expressão gênica quanto de maior atividade enzimática de proteínas essenciais à fermentação da lactose. Outra hipótese seria que em ambientes com restrição de oxigênio os genes e as enzimas do metabolismo da lactose seriam diferentemente expressos ou ativos em *K. lactis* e *K. marxianus* proporcionando a maior produção de etanol desta última.

No metabolismo de dissacarídeos (como a lactose) a hidrólise dos mesmos a monômeros é necessária. Dependendo da espécie de levedura e da natureza do açúcar esta hidrólise pode ocorrer extracelularmente, no espaço periplasmático ou no citoplasma após o transporte do dissacarídeo. A lactose é transportada tanto em *K. lactis* quanto em *K. marxianus* por uma permease codificada pelo gene *LAC12* induzido tanto por lactose quanto por galactose. Após o transporte a lactose é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase, também induzida por lactose, sendo codificada pelo gene *LAC4*, originando desta clivagem glicose e galactose (FLORES *et al.*, 2000). A glicose é metabolizada pela via glicolítica, enquanto que, a galactose é catabolizada pela via de Leloir (FIGURA 1) formando o intermediário glicolítico, glicose 6-fosfato.



- Via Glicolítica
- Via de Leilor
- Respiração
- Fermentação

Figura 1: Metabolismo da lactose (modificado de RUBIO-TEIXEIRA, 2005; RUBIO-TEIXEIRA, 2006).

A primeira reação da via de Leloir é catalisada pela galactocinase, Gal1p, e consiste na fosforilação dependente de ATP da galactose, gerando galactose-1-fosfato. A segunda reação envolve a ação da uridino difosfoglicose 4-epimerase, Gal10p, que permuta galactose com o grupo glicose de UDP-glicose originando UDP-galactose, que após mudança estereoquímica gera um novo UDP-glicose. Posteriormente a enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase, Gal7p, utiliza a glicose liberada na segunda reação para transformar galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato. Este metabólito é convertido na última reação da via de Leloir a glicose-6-fosfato pela ação da fosfoglucomutase, Gal5p (RUBIO-TEIXEIRA, 2005). OSTERGAARD *et al.* (2000) aumentou o consumo de galactose e formação de etanol em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* alterando a via regulatória dos genes *GAL*. Este experimento comprovou que diferenças no fluxo metabólico na via de Leloir podem ser determinantes para o metabolismo mais fermentativo ou oxidativo em leveduras.

O primeiro passo da via glicolítica em *K. lactis* consiste na fosforilação da glicose pela hexocinase, codificada pelo gene de cópia única, *RAG5*. A fosfoglicose isomerase, codificada por *RAG2*, converte glicose-6-fosfato a frutose-

6-fosfato. O mutante *rag2* em *K. lactis* cresce em glicose, diferentemente do que se verifica em *S. cerevisiae*. A fosfofrutocinase, proteína octomérica codificada pelos genes *KIPFK1* e *KIPFK2*, fosforila frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato. O duplo mutante *Klpfk1* e *Klpfk2* também é capaz de crescer em glicose, diferentemente do que se verifica em *S. cerevisiae*. Frutose-1,6-bifosfato é convertida a duas trioses, dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, pela enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase. A triose fosfato isomerase interconverte dihidroxiacetona fosfato a gliceraldeído-3-fosfato. Este último é fosforilado a gliceraldeído-1,3-bifosfato pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é cópia única em *K. lactis*, mas possui três cópias em *K. marxianus*: *KmGAP1*, aparentemente constitutiva, *KmGAP2*, induzida por glicose e *KmGAP3*, ainda não detectada. Gliceraldeído-1,3-bifosfato é convertido a 3-fosfoglicerato pela 3-fosfoglicerato cinase originando um ATP. A fosfoglicerato mutase interconverte 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato sendo que o último, pela ação da enolase, é convertido a fosfoenolpiruvato. A última reação da via glicolítica é catalisada pela piruvato cinase, gerando um segundo ATP e formando piruvato (FLORES *et al.*, 2000). O piruvato é considerado um dos intermediários mais importantes da via glicolítica, pois é a partir dele que o organismo apresentará metabolismo fermentativo ou oxidativo (FLIKWEERT, 1997). As diferentes formas de metabolização do piruvato são as principais responsáveis pela diversidade encontrada no mundo microbiano. A oxidação total ou parcial de qualquer carboidrato depende de como são constituídas as redes regulatórias das enzimas que possuem o piruvato como substrato (PRONK *et al.*, 1996). Dependendo das condições de cultivo e do micro-organismo analisado, o piruvato pode ser totalmente oxidado a CO<sub>2</sub> pela via do ácido tricarbóxico, sendo que a primeira reação, neste caso, é catalisada pela piruvato desidrogenase (PDH). Uma das alternativas a esta reação é o piruvato ser reduzido a etanol, numa primeira reação catalisada pela piruvato descarboxilase (PDC), codificada em *K. lactis*, pelo gene, cópia única, *RAG6* (FLORES *et al.*, 2000).

O entendimento de como a concentração de oxigênio modula o metabolismo das leveduras é essencial para o aperfeiçoamento de processos industriais, sejam eles destinados à produção de etanol sejam eles destinados à produção de biomassa ou proteínas homólogas ou heterólogas, como é hoje um interesse global (WIEBE *et al.*, 2008). Existem leveduras aeróbias estritas, que não crescem em glicose na ausência de oxigênio e todo o piruvato é incorporado no ciclo do ácido tricarbóxico, e anaeróbias facultativas que metabolizam glicose na ausência ou

presença de oxigênio. *S. cerevisiae* é considerada anaeróbia facultativa enquanto que *K. lactis* é classificada como aeróbia estrita. (GONZALES-SISO *et al.*, 1996). Entretanto, o excesso de substrato fermentativo pode inibir a respiração, mesmo em ambientes aeróbicos, uma vez, que há a saturação da capacidade respiratória dos micro-organismos, este fenômeno é conhecido, na fisiologia das leveduras, como efeito Crabtree (GONZALES-SISO *et al.*, 2000). Há dois tipos de efeito Crabtree o *short-term* e o *long-term*. O efeito Crabtree *short-term* é caracterizado pela fermentação alcoólica durante um curto período em aerobiose devido a um pulso de açúcar após a célula ser cultivada por várias gerações com restrição de carboidrato. A razão deste fenômeno é principalmente devido à saturação do metabolismo respiratório devido ao excesso transitório de piruvato. Já o efeito Crabtree *long-term* é caracterizado pela fermentação alcoólica em aerobiose devido a altas concentrações de carboidratos no meio ou devido a cultivos em altas taxas de velocidade de crescimento (PRONK *et al.*, 1996). Há diversas hipóteses para explicar o surgimento deste efeito: baixa eficiência da rota respiratória em metabolizar o piruvato, efeito de ácidos orgânicos no desacoplamento da cadeia respiratória, capacidade limitada da acetil-CoA sintetase na rota do “piruvato desidrogenase *by-pass*” e a limitada capacidade da maquinaria anabólica. Um organismo é considerado Crabtree-positivo quando possui o efeito Crabtree *long-term* como ocorre com *S. cerevisiae*. No caso de *S. cerevisiae* o fenômeno é devido à baixa eficiência do metabolismo do piruvato pela enzima piruvato desidrogenase, uma vez que, no meio de cultura com 0,8 mM de glicose em aerobiose *S. cerevisiae* apresenta metabolismo respiro-fermentativo e com 12 mM metabolismo totalmente fermentativo (OTTERSTELD *et al.* 2004). *K. lactis* é considerado uma levedura Crabtree-negativo uma vez que não possui um efeito Crabtree *long-term*. Deste modo, a presença de oxigênio é mais determinante para o metabolismo fermentativo em *K. lactis* que em *S. cerevisiae*. Estudos com o objetivo de elucidar as diferenças entre os micro-organismos Crabtree-positivo e negativo tem demonstrado que o sistema de transporte de açúcares, a capacidade de acumular carboidrato no interior da célula e a competição entre os complexos piruvato desidrogenase e piruvato descarboxilase são a “chave” para elucidar estas diferenças (BELLAVAR *et al.*, 2004).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens e manutenção de leveduras

As fontes e características genóticas das linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho estão apresentadas na TABELA 1. As mesmas foram mantidas em meio completo YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) com glicerol 40% (v/v) a -80 °C ou quando utilizada com frequência, em placas de YPD sólido (1,5% ágar) a 4 °C.

Tabela 1. Linhagens de leveduras utilizadas no trabalho

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fonte</b>
<i>Kluyveromyces lactis</i> JA6	MAT $\alpha$ <i>ade1-600 adeT-600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 LAC12-EGFP</i>	WIEDEMUTH e BREUNING, 2005
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3	Espécie selvagem	SILVEIRA, 2005

#### 3.2. Inóculo e ativação das leveduras

O meio de cultura utilizado neste estudo foi o Yeast Nitrogen Base sem aminoácidos com 5,0 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônia (YNB Sigma, St. Louis, USA) e

lactose em concentrações de: 0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM; 4,0 mM; 64 mM. Para a linhagem *K. lactis* JA6 o mesmo meio YNB foi acrescido de uma solução de uracila a  $0,0007 \text{ g L}^{-1}$ , adenina e triptofano a  $0,0024 \text{ g L}^{-1}$  (YNB<sub>nb</sub>). O meio YNB foi preparado conforme instruções do fabricante e as soluções de nucleobases, aminoácidos, bem como, de lactose foram esterilizadas por calor úmido em autoclave 121 °C por 20 minutos.

Volume de 1,0 mL da cultura estocada a -80 °C ou uma colônia isolada da placa a 4 °C foi transferido para um volume de 20 mL de meio YNB (Sigma, St. Louis, USA) ou YNB<sub>nb</sub>, 2,0% lactose (p/v), em Erlenmeyers de 100 mL. As culturas foram incubadas sob agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por aproximadamente 24 horas, para a produção de inóculo. Após este tempo, todo o cultivo foi centrifugado a 3000 g por cinco minutos, à temperatura de 4 °C. O sedimento de célula foi lavado duas vezes em água peptonada 0,01% (p/v), antes de ser adicionado a um novo meio de cultivo.

### **3.3. Processos de fermentação**

As fermentações avaliadas nesse estudo foram conduzidas em regime de batelada sob condições aeróbicas e hipóxicas durante 24 horas quando cultivadas em Erlenmeyers. Quando cultivadas no biorreator BioFlo III (New Brunswick, EUA), com capacidade de 1500 mL, em aerobiose o tempo de cultivo foi de 6 horas e em hipoxia 9 horas. As fermentações foram iniciadas com as células ativadas, como descrito no item 3.2. As fermentações foram iniciadas com 0,08 a 0,1 de absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) quando realizados em Erlenmeyers enquanto que nas fermentações realizadas no biorreator BioFlo III (New Brunswick, EUA) a  $A_{600}$  inicial foi de 0,3 a 0,5.

#### **3.3.1. Em condição de aerobiose**

As fermentações em condições aeróbicas foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio YNB (ou YNB<sub>nb</sub>) e lactose nas concentrações pré-determinadas (item 3.2). Os frascos foram vedados com tampão de algodão para

que houvesse a possibilidade do oxigênio solubilizar-se com o meio de cultura. As fermentações foram conduzidas em incubador rotatório (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC CO, INC Modelo G76D) sob agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C, por 24 horas. Para a análise dos transcritos e das atividades enzimáticas as fermentações foram conduzidas no biorreator BioFlo III (New Brunswick, EUA) com volume de meio de 1300 mL contendo 20 g L<sup>-1</sup> de lactose, sob agitação de 250 rpm, com injeção de ar comprimido de 2 vvm, à temperatura de 30 °C, por seis hora

### **3.3.2. Em condição de oxigênio limitante (hipoxia)**

As fermentações em condições hipóxicas foram realizadas em Erlenmeyers de 100 mL com 50 mL de meio YNB (ou YNB<sub>nb</sub>) acrescido de lactose e vedado com tampão de borracha, para reduzir a permeabilidade ao oxigênio. No meio de cultura foram adicionados 1,0 g L<sup>-1</sup> de Tween 80 e 20 µg mL de ergosterol, para garantir a síntese de componentes esteróis da membrana em condições hipóxicas (GONZÁLES-SISO et al., 1996). Um filtro de 0,45 µm foi conectado a um tubo de vidro para permitir a saída de CO<sub>2</sub> proveniente da fermentação. Antes da inoculação, nitrogênio gasoso (99% de pureza) foi borbulhado por 15 minutos para expulsar o oxigênio dissolvido no meio. Após a inoculação das leveduras ativas, nitrogênio gasoso foi continuamente borbulhado durante todo o curso da fermentação. A fermentação foi conduzida em incubador rotatório (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC CO. INC Modelo G76D) sob agitação de 50 rpm, à temperatura de 30 °C, por 24 horas. Para a análise dos transcritos pré-culturas foram introduzidas no biorreator BioFlo III (New Brunswick, EUA) com volume de meio de 1300 mL contendo 20 g L<sup>-1</sup> de lactose, sob agitação de 100 rpm, com injeção contínua de nitrogênio, à temperatura de 30 °C, por 9 horas. Para garantir a hipoxia foi injetado nitrogênio gasoso a partir do momento que a dorna de fermentação do BioFlo III foi retirada da autoclave com a temperatura ao redor de 50 °C.

Durante as fermentações, amostras foram retiradas periodicamente para acompanhar o crescimento populacional pela leitura da absorvância a 600 nm e centrifugadas para a obtenção do meio extracelular. O meio extracelular foi mantido a -20 °C, para a posterior análise do consumo de substrato e formação de produtos

do metabolismo. Foram retiradas, também, amostras do sedimento celular, cerca de 10 unidades de  $A_{600}$ , para posteriores análises como atividade enzimática e da transcrição de genes relacionados ao metabolismo fermentativo. Nesses casos amostras do sedimento celular, após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Relação entre absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) e massa celular seca ( $\text{g L}^{-1}$ )**

Células de *K. marxianus* UFV-3 e *K. lactis* JA6 foram ativadas para a produção de inóculo conforme descrito no item 3.2. Em meio de cultura YNB (ou YNB<sub>nb</sub>) acrescido de  $20\text{ g L}^{-1}$  de lactose as culturas, com  $A_{600}$  inicial de 0,1 foram conduzidas em incubador rotatório (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC CO. INC Modelo G76D), sob agitação de 200 rpm, à temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 18 horas. Em seguida a cultura foi centrifugada a  $3000\text{ g}$  por cinco minutos, à temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e utilizados para o preparo de suspensão em 6 mL de água destilada. Foram retiradas quatro alíquotas de 1,0 mL da suspensão para determinação da massa celular seca a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Amostras de 1,0 mL da suspensão de células foram utilizadas para a realização das seguintes diluições, em triplicata,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $3 \times 10^{-2}$ ,  $4 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $6 \times 10^{-2}$ . A regressão linear entre a absorvância ( $A_{600}$ ) e a massa celular seca ( $\text{g L}^{-1}$ ) permitiu a determinação da massa celular seca correspondente a uma unidade de absorvância a 600 nm. Uma unidade de  $A_{600}$  mostrou ser equivalente a  $0,507\text{ g L}^{-1}$  de massa celular seca de *K. marxianus* UFV-3 e  $0,431\text{ g L}^{-1}$  de massa celular seca de *K. lactis* JA6 (ANEXO 1 A e B).

### **3.5. Cinética de crescimento**

O crescimento populacional das leveduras com o tempo de fermentação foi estimado pela medida da absorvância em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 600 nm em intervalos de tempo de 30 minutos. Os valores de  $A_{600}$  foram convertidos em massa celular seca, de acordo com a relação obtida no item 3.4.

### 3.5.1. Velocidade específica de crescimento e constantes cinéticas

As velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) nas concentrações de lactose pré-determinadas (item 3.2) em aerobiose e hipoxia foram determinadas pela regressão linear dos valores do logaritmo neperiano ( $\ln$ ) na absorvância de 600 nm, obtidos na fase exponencial de crescimento, versus o tempo, em horas a partir da fórmula:  $\ln A_{600} = \mu t + \ln A_{600in}$ , sendo que  $A_{600in}$  é a concentração inicial de células. A velocidade específica de crescimento foi expressa em  $h^{-1}$ .

Considerando as velocidades específicas de crescimento para cada concentração de lactose, as constantes cinéticas (velocidade de crescimento máxima ( $\mu_{max}$ ) e a constante de saturação ( $K_s$ )) foram determinadas, segundo Monod (1949), utilizando o programa Sigma Plot®, a partir da equação:  $\mu = (\mu_{max} * S) / (S * K_s)$ , sendo que S é a concentração de lactose.

### 3.6. Determinação da concentração de lactose e de formação de produtos metabólicos

Amostras retiradas ao longo das diversas fermentações foram centrifugadas a 13200 g por 5 min. Para a determinação da concentração de lactose, etanol e glicerol 20  $\mu$ L do sobrenadante das amostras foram aplicados em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – HP 1050 M Hewlett Packard Série 1050, detector HP 1047A, utilizando coluna BIO-RAD Aminex HPX-874 (300 x 7,8 mm) eluente 0,005 M  $H_2SO_4$ , fluxo 1,0 a 0,7 mL  $min^{-1}$ , temperatura da coluna de 60 °C. Na montagem dos métodos foram preparados padrões de 5,0 mM, 6,25 mM, 10 mM, 12,5 mM, 20 mM para lactose e 10 mM, 12,5 mM, 20 mM, 40 mM para etanol e glicerol. As amostras, quando necessário, foram diluídas. As concentrações determinadas permitiram calcular o consumo de lactose e produção de etanol e glicerol ao longo do tempo de fermentação.

### 3.7. Parâmetros fermentativos de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6

O rendimento celular ( $Y_{X/L}$ ) foi calculado ao final de 24 horas dividindo-se a diferença da concentração de biomassa celular final e inicial ( $g L^{-1}$ ) pela

concentração de lactose (mM) consumida no mesmo período ( $Y_{X/L}$  = massa celular final – massa celular inicial / concentração inicial de lactose – concentração final de lactose).

O rendimento de etanol por célula ( $Y_{E/X}$ ) foi calculado ao final de 24 horas dividindo-se a diferença entre a concentração final e inicial de etanol (mM) pela diferença da concentração de biomassa final e inicial ( $g L^{-1}$ ) no mesmo período ( $Y_{E/X}$  = concentração final de produto – concentração inicial de produto / massa celular final – massa celular inicial).

O rendimento de etanol por lactose consumida ( $Y_{E/L}$ ) foi calculado ao final de 24 horas dividindo-se a diferença da concentração final e inicial de etanol (mM) pela concentração de lactose (mM) consumida no mesmo período ( $Y_{E/L}$  = concentração final de etanol – concentração inicial de etanol / concentração inicial de lactose – concentração final de lactose).

Assume-se que o rendimento teórico máximo de etanol é de 0,538 g de etanol por 1,0 g de lactose consumida. Admitindo-se que se 1,0 mol de lactose for metabolizada pela levedura via glicólise produziria 4,0 mols de etanol, isto é 342 g de lactose produziriam 184 g de etanol, ou seja, 0,538  $g g^{-1}$ .

A produtividade volumétrica ( $Q_E$ ) foi calculada ao final de 24 horas dividindo-se a variação da concentração final e inicial de etanol (mM) pelo tempo de fermentação em horas ( $Q_E$  = concentração final de etanol – concentração inicial de etanol / tempo).

### **3.8. Atividade enzimática**

#### **3.8.1. Preparo do extrato de células**

O sedimento de células das amostras, aproximadamente 10 unidades de  $A_{600}$ , obtidas nas fermentações (item 3.3.) foi descongelado e centrifugado a 3000 g por cinco minutos, à temperatura de 4 °C em tubo de micro-centrífuga. O sedimento de célula foi lavado duas vezes em solução tamponante (tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 ajustado com KOH 20%; 2,0 mM  $MgCl_2$ ; 1,0 mM ditiotreitol). As células foram rompidas adicionando-se pérolas de vidro (diâmetro de 400-600 nm) ao tubo, agitando-se vigorosamente por 60 segundos e em seguida descansando o tubo no gelo por 60 segundos. Este procedimento se repetiu cinco vezes. Posteriormente o

tubo foi centrifugado a 13200 g por 2 minutos e o sobrenadante armazenado em um novo tubo sendo mantido no gelo até a sua utilização.

### 3.8.2. Proteína total

Para quantificar a proteína total presente no extrato celular foi adicionado 33  $\mu\text{L}$  do extrato, obtido como descrito em 3.8.1, a 1000  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford (Sigma, St. Louis, USA). A mistura de reação foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por cinco minutos. Foi realizada leitura da reação em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 595 nm. A unidade da proteína total foi expressa em mg de proteína por mL de acordo com a curva padrão feita com o soro albumina bovina (BSA, St. Louis, USA) nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,4 mg mL<sup>-1</sup> (ANEXO 2A).

### 3.8.3 Ensaio enzimáticos

**$\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal):** A atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase foi medida de acordo com o protocolo de RALSER *et al.* (2005). Foi acrescentado 14  $\mu\text{L}$  do extrato celular (3.8.1) a 686  $\mu\text{L}$  de tampão H (100 mM HEPES/KOH pH 7,0; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 1% BSA). A atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase foi medida acrescentado de 125  $\mu\text{L}$  da solução de O-nitrofenil- $\beta$ -d-galactopiranosídeo, (ONPG; Sigma, St. Louis, USA), 4 mg mL<sup>-1</sup>. A mistura de reação foi incubada de 5 a 7 minutos à temperatura de 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 400  $\mu\text{L}$  de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0 M. O produto da reação foi detectado em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 420 nm (A<sub>420</sub>). A unidade da atividade de  $\beta$ -galactosidase foi expressa em milimoles de o-nitrofenol (ONP) formada por minuto, de acordo com a curva padrão (ANEXO 3A e 4A).

**Piruvato descarboxilase (PDC):** A atividade da piruvato descarboxilase (PDC) foi medida como descrito por BIANCHI *et al.* (1996). Acrescentou-se 50  $\mu\text{L}$  de extrato celular (3.8.1) a 900  $\mu\text{L}$  da mistura de reação contendo 40 mM de Imidazol pH 7,0; 0,2 mM de tiamina pirofosfato; 1,5 mM NADH; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 U da enzima álcool desidrogenase (Sigma, St. Louis, USA). A reação foi incubada por 10 minutos à

temperatura de 30°C. O ensaio foi iniciado adicionando-se 50 mM de piruvato que foi rapidamente homogeneizado na reação. Foi realizada leitura contínua da reação em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 340 nm. Foi determinada a regressão linear dos valores obtidos da absorvância a 340 nm versus tempo (minutos) na fase exponencial da reação. A unidade da atividade da piruvato descarboxilase foi expressa em  $\mu$ moles de acetaldeído formado por minuto (ANEXO 5A).

**Piruvato desidrogenase (PDH):** A detecção da atividade da piruvato desidrogenase foi realizada como descrito por FLIKWEERT et al. (1997). Acrescentou-se 50  $\mu$ L de extrato celular (3.8.1) a 900  $\mu$ l da reação experimental contendo 50 mM de tampão fosfato pH 7,0; 1,0 mM de tiamina pirofosfato; 4,0 mM  $\text{NAD}^+$ ; 1,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM ditiotreitol. A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura de 30°C. O ensaio foi iniciado acrescentado-se 0,4 mM de piruvato que foi rapidamente homogeneizado na reação. Foi realizada leitura contínua da reação em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 340 nm. Foi determinada a regressão linear dos valores obtidos pela absorvância a 340 nm versus o tempo em minutos na fase exponencial da reação. A unidade da atividade da piruvato desidrogenase foi expressa em  $\mu$ moles de acetil-CoA formado por minuto (ANEXO 6A).

**Álcool desidrogenase (ADH):** A atividade da álcool desidrogenase foi medida de acordo com o protocolo de POSTMA et al. (1989). Acrescentou-se 50  $\mu$ L de extrato celular (3.8.1) a 900  $\mu$ l da mistura de reação contendo 25 mM de tampão Tris-HCl pH 8,8; 1,0 mM  $\text{NAD}^+$ . A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura de 30 °C. O ensaio foi iniciado adicionando-se 100 mM de etanol que foi rapidamente homogeneizado. Foi realizada leitura contínua da reação em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 340 nm. Foi determinada a regressão linear dos valores obtidos da absorvância a 340 nm versus o tempo em minutos, na fase exponencial da reação enzimática. A unidade da atividade da piruvato desidrogenase foi expressa em  $\mu$ moles de acetaldeído formado por minuto (ANEXO 7A).

### 3.9. Análise da expressão gênica

#### 3.9.1. Extração de RNA total

O RNA total das amostras foi isolado de acordo com o protocolo de SCHMITT *et al.* (1990) com algumas modificações.

O sedimento estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (item 3.3) foi submetido à centrifugação por 12000 *g* e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para remoção do sobrenadante. O sedimento de células foi, então, ressuscitado em 500  $\mu\text{L}$  de tampão AE (50 mM Acetato de Sódio pH 5,3 e 10 mM EDTA pH 8) e 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10%. Um volume de fenol ácido foi adicionado com posterior incubação a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por uma hora, seguida de vigorosa agitação das amostras a cada 15 minutos. Após o período de incubação, colocou-se as amostras no gelo por 5 minutos, seguido de centrifugação a 12000 *g* e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo de micro-centrífuga. Em seguida, um volume de fenol ácido foi adicionado com posterior centrifugação a 12000 *g* e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a ele adicionou-se um volume de clorofórmio seguido pela centrifugação a 12000 *g* e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

Após a etapa de extração, o RNA total foi precipitado pela adição de 0,1 volume de uma solução 3 M de acetato de sódio pH 5,2 e de 2,5 volumes de etanol absoluto. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12000 *g* e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos e foi posteriormente lavado com 1 mL de etanol 80%. Uma vez parcialmente seco, foi feita a ressuspensão do sedimento em 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase.

A integridade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TEB (Trizma base  $54\text{ g L}^{-1}$ , ácido bórico  $27,5\text{ g L}^{-1}$  EDTA 0,5 M pH 8). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Todas as amostras foram tratadas com DNase RQ1- RNase Free (Promega) utilizando-se 0,25 U para cada  $\mu\text{g}$  de RNA. A inativação da enzima deu-se pelo calor, juntamente com a solução *stop solution*, a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para averiguar a contaminação por DNA genômico utilizando-se o gene constitutivo *ACT1* como controle, o qual codifica para a actina.

### 3.9.2. Desenho de oligonucleotídeos correspondentes aos genes utilizados no PCR quantitativo em Tempo Real

As sequências dos genes de interesse deste trabalho e utilizados na análise do PCR em Tempo Real estão disponíveis no site <http://www.genolevures.org/index.html#>. Os genes escolhidos foram: -  $\beta$ -galactosidase (*LAC4*), galactocinase (*GAL1*), galactose-1-fosfato uridiltransferase (*GAL7*), epimerase (*GAL10*), piruvato descarboxilase (*RAG6*) e o controle - actina1 (*ACT1*). Os oligonucleotídeos apresentados na TABELA 2 foram construídos com o auxílio do *software* Primer Express®.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no PCR em tempo real

Gene	<i>K. marxianus</i> UFV-3	<i>K. lactis</i> JA6
<b>ACT1</b>	CCAGAAGCTTTGTTCCATCCA ACCGGACATGACGATGTTACC	CCAGAAGCTTTGTTCCATCCA ACCGGACATGACGATGTTACC
<b>LAC4</b>	CCACACCCTCAAATCTCAACCT TCCCAATCGACATCCCAAAT	TCTTCCAAAAGGAGAAGCCATT GGATTGCATGGTCCAACCTTA
<b>GAL1</b>	CACTACCGACACGAGGTTTGG ACACCGTGGAGTCAGTCAAGAA	GCATGTTTATTCGGAGGCTTTG TTGTCACAAGATTCTGCGATT
<b>GAL7</b>	CCCATGGCAGTACCCTTATTCT GGACATCACCAACGTCGTTTC	AGAACTTCGCGAAAAGGAAAGA AAGGATGGGATGCGACGTT
<b>GAL10</b>	ACGAATACAAGGACCCAAGCA CAGCGGAAACGGTCAACTG	CACCGGTGATTACGTCGATGT GGAAGAACGACGCTCGATTT
<b>RAG6</b>	ACCTCCGCTTTCGGTATCAAC AGCAGCGAAAGCAGCACCTA	TGACCACTGACGAAAAGTTCCA GCGTTGGTAGCAGCAGTCAA

### 3.9.3. Análise da expressão de genes do metabolismo de lactose por PCR quantitativo em Tempo Real

A partir do RNA extraído nas condições do item 3.9.1, a síntese da primeira fita do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do Kit transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen). A síntese do cDNA, foi confirmada por meio de uma reação de PCR utilizando-se oligonucleotídeos do gene constitutivo actina1.

Os cDNAs sintetizados foram submetidos ao PCR, utilizando o sistema SYBR® Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems). As leituras foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). Para as reações incubadas no ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) foram realizadas as seguintes misturas, com as respectivas concentrações e volumes finais: 7 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; 1 µL de Rox (1:400); 0,68 µL dH<sub>2</sub>O; 0,66 µL de primer reverso (0,66 µM); 0,66 µL de primer direto (0,66 µM) e 1 µL de cDNA (5 ng) utilizado como molde. A placa foi selada, centrifugada e colocada no equipamento ABI 7500. O seguinte ciclo foi utilizado: programa de desnaturação (95 °C, 10 minutos), anelamento dos oligonucleotídeos e amplificação, com programa de quantificação, repetido por 40 ciclos (95 °C, 15 segundos e 60 °C, 30 segundos), curva de separação (60-95 °C com aumento de 0,2°C por segundo com a contínua medição da fluorescência) e o último passo o resfriamento para 4,0 °C. Para a determinação do nível de expressão dos genes foi necessário determinar os pontos de cruzamento (C<sub>T</sub>) de cada transcrito. O C<sub>T</sub> é definido como o ponto em que a fluorescência aumenta linearmente acima da fluorescência basal (*background*). O cálculo da eficiência do PCR e sua respectiva inclinação foram feitas de acordo com os modelos matemáticos recomendado pelo fabricante do sistema SYBR® Green PCR-Master Mix e do equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). A expressão relativa dos genes descritos no item 3.9.2 foi calculado baseado no método C<sub>T</sub> (Método  $\Delta\Delta C_T$ ).

1. Foi realizada a média C<sub>T</sub> de todos os genes de interesse nos tempos 1, 3, 6 em aerobiose e 1, 3, 6 e 9 em hipoxia.
2. Foi calculada a diferença da média C<sub>T</sub> dos genes de interesse pela média C<sub>T</sub> da actina (controle exógeno), resultando no  $\Delta C_T$ .
3. Foi calculada a diferença do  $\Delta C_T$  do gene em hipoxia pelo  $\Delta C_T$  do gene em aerobiose (controle endógeno).
4. Para definir a relação de expressão do gene em aerobiose e hipoxia foi definida a equação  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ .

Assim a expressão dos genes em aerobiose adquiriram o valor 1. A expressão dos genes em hipoxia que apresentaram valores menores que 1 foram menos expressos que em aerobiose, já os que apresentaram valores maiores que 1 foram mais expressos que em aerobiose.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cinética de crescimento de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 em função da concentração de lactose, sob condições aeróbias e hipóxicas.

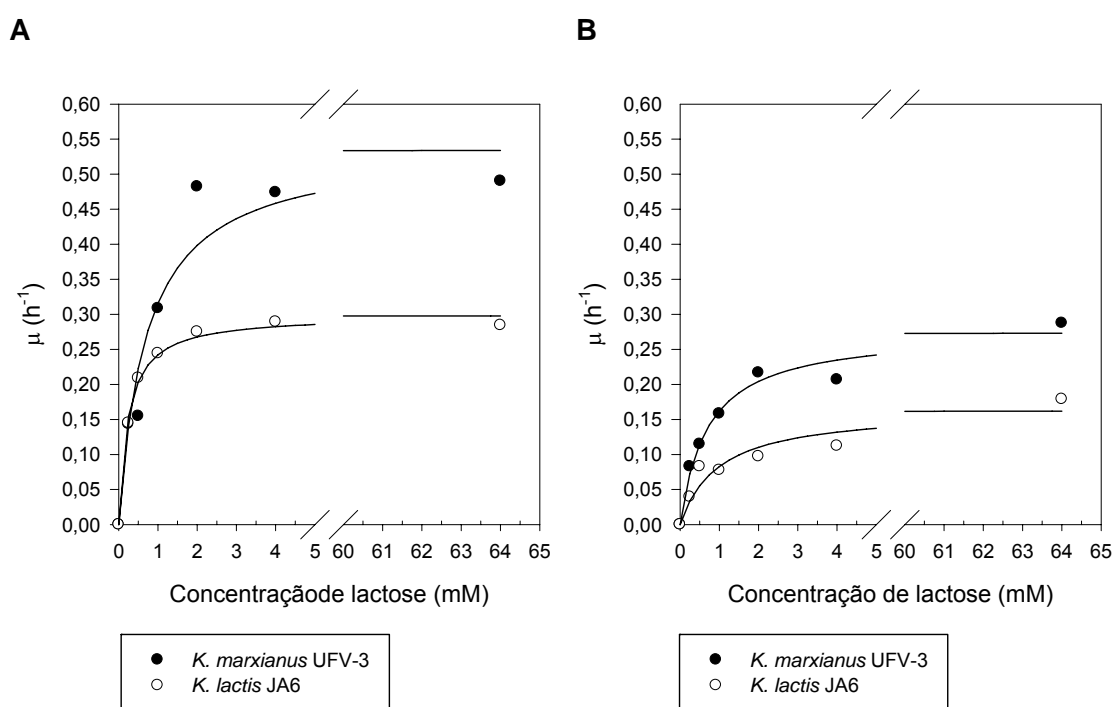
Em aerobiose, nas menores concentrações iniciais de lactose (0,25 e 0,5 mM) *K. lactis* JA6 e *K. marxianus* UFV-3 apresentaram velocidades de crescimento próximas. Entretanto, com o aumento das concentrações iniciais de lactose ficou evidente a tendência de *K. marxianus* apresentar velocidades de crescimento até 76% superiores a de *K. lactis* JA6 (FIGURA 2A).

Em hipoxia *K. marxianus* UFV-3 apresentou velocidades de crescimento superiores à *K. lactis* JA6 em todas as concentrações de lactose testadas. A diferença da velocidade de crescimento das duas células variou até 112%. (FIGURA 2B).

*K. marxianus* UFV-3 apresentou a velocidade específica máxima de crescimento maior que *K. lactis* tanto em aerobiose quanto em hipoxia (FIGURA 2 A e B). Em aerobiose a diferença foi de 86,1% enquanto que em hipoxia esta diferença foi de 54,19%.

Em aerobiose, a constante de saturação ( $K_s$ ) de *K. marxianus* UFV-3 foi maior que de *K. lactis* JA6. O  $K_s$  de *K. marxianus* UFV-3 foi de 0,694 mmol L<sup>-1</sup> de lactose e de *K. lactis* JA6 0,287 mmol L<sup>-1</sup> de lactose, uma diferença de quase 160%.

Ao contrário, em hipoxia o  $K_S$  de *K. lactis* JA6 foi maior que de *K. marxianus* UFV-3. O  $K_S$  de *K. lactis* JA6 foi de 1,295 mmol L<sup>-1</sup> de lactose, enquanto que de *K. marxianus* UFV-3 apresentou  $K_S$  de 0,703 mmol L<sup>-1</sup> de lactose, uma diferença de 84,31%. Assim nota-se que *K. marxianus* UFV-3 apresentou valores de  $K_S$  semelhantes tanto em hipoxia quanto em aerobiose, enquanto que, o  $K_S$  de *K. lactis* JA6 para a lactose em hipoxia foi 485% superior ao  $K_S$  em aerobiose.



Aerobiose	$\mu_{max.}(h^{-1})$	$K_S$	Equação	$r^2$	F	P
<i>K. marxianus</i> UFV-3	0,534	0,694	$\mu = 0,54*S/(0,69+S)$	0,95	79,72*	0,0003
<i>K. lactis</i> JA6	0,287	0,267	$\mu = 0,30*S/(0,27+S)$	0,99	801,57*	<0,0001
Hipoxia	$\mu_{max.}(h^{-1})$	$K_S$	Equação	$r^2$	F	P
<i>K. marxianus</i> UFV-3	0,276	0,703	$\mu = 0,28*S/(0,70+S)$	0,98	211,24*	<0,0001
<i>K. lactis</i> JA6	0,179	1,295	$\mu = 0,18*S/(1,30+S)$	0,91	52,62*	0,0008

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Figura 2. Velocidades específicas máxima de crescimento [ $\mu_{max} (h^{-1})$ ] e constante de saturação [ $K_S$  (mmol L<sup>-1</sup>)] de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 em YNB e YNB<sub>nb</sub> lactose em aerobiose (A) e hipoxia (B).

*K. marxianus* UFV-3 apresentou maior formação de biomassa que *K. lactis* JA6 tanto em aerobiose quanto em hipoxia, em todas as concentrações de lactose (TABELA 3). Na medida em que a concentração de lactose no meio aumentou houve aumento na diferença de formação de biomassa em favor de *K. marxianus*

UFV-3. Em aerobiose na menor concentração de lactose, 0,25 mM, a diferença entre as duas biomassas foi de 23,81% chegando a 290% a 64 mM de lactose. Em hipoxia na concentração de 0,25 mM a diferença foi de 51,19% chegando a 176,23% quando a célula cresceu em 64 mM de lactose.

Tabela 3. Massa celular acumulada por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 em YNB e YNB<sub>nb</sub> contendo lactose em aerobiose (A) e hipoxia (B) após 24 horas de cultivo.

<b>A</b>			<b>B</b>		
<b>So<sup>a</sup></b>	<b>X<sup>b</sup><sub>max</sub></b> <b><i>K. marxianus</i> UFV3</b>	<b>X<sup>b</sup><sub>max</sub></b> <b><i>K. lactis</i> JA6</b>	<b>So<sup>a</sup></b>	<b>X<sup>b</sup><sub>max</sub></b> <b><i>K. marxianus</i> UFV-3</b>	<b>X<sup>b</sup><sub>max</sub></b> <b><i>K. lactis</i> JA6</b>
0,25	0,114	0,092	0,25	0,126	0,083
0,50	0,151	0,121	0,50	0,173	0,082
1,00	0,253	0,187	1,00	0,196	0,094
2,00	0,397	0,287	2,00	0,298	0,120
4,00	0,730	0,500	4,00	0,289	0,218
64,00	4,081	1,046	64,00	2,095	0,759

<sup>a</sup> Concentração inicial de lactose em mM

<sup>b</sup> Massa celular após 24 horas de cultivo em g L<sup>-1</sup>

#### 4.2. Formação de produtos, consumo de lactose e parâmetros fermentativos de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 em função da concentração de lactose, sob condições aeróbias e hipóxicas.

Sob aerobiose, apenas na fermentação na concentração inicial de 64 mM de lactose houve a formação de etanol e glicerol por *K. marxianus* UFV-3 e *K. lactis* JA6. *K. marxianus* UFV-3 produziu 300% mais etanol em aerobiose que *K. lactis* JA6; 72,06 mM de etanol contra 25,20 mM. A produção de glicerol foi semelhante em ambas as leveduras (TABELA 4A).

Sob hipoxia nas concentrações iniciais de lactose de 2 e 4 mM, *K. lactis* JA6 produziu mais etanol e glicerol do que *K. marxianus* UFV-3. Por outro lado, na concentração de 64 mM de lactose, *K. marxianus* UFV-3 produziu aproximadamente 400% mais etanol e glicerol que *K. lactis* JA6 (TABELA 4B).

Tabela 4. Concentrações máximas de etanol e glicerol obtido por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 nas fermentações em YNB e YNB<sub>nb</sub> acrescido de lactose, sob condições aeróbicas (A) e hipóxicas (B).

A					B				
<i>K. marxianus</i> UFV-3			<i>K. lactis</i> JA6		<i>K. marxianus</i> UFV-3			<i>K. lactis</i> JA6	
So <sup>a</sup>	Glicerol <sup>b</sup>	Etanol <sup>c</sup>	Glicerol <sup>b</sup>	Etanol <sup>c</sup>	So <sup>a</sup>	Glicerol <sup>b</sup>	Etanol <sup>c</sup>	Glicerol <sup>b</sup>	Etanol <sup>c</sup>
0,25	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	0	1,21	0	0
2	0	0	0	0	2	0,52	1,70	0,19	5,37
4	0	0	0	0	4	0,48	7,12	0,67	12,14
64	2,13	72,06	1,41	25,20	64	11,23	203,83	4,06	62,52

<sup>a</sup> Concentração inicial de lactose em mM

<sup>b</sup> Concentração máxima de glicerol em mM

<sup>c</sup> Concentração máxima de etanol em mM

Os parâmetros fermentativos foram analisados após 24 horas de cultivos tanto em aerobiose quanto em hipoxia. Após este tempo a lactose foi totalmente consumida em todas as fermentações.

Sob aerobiose na fermentação com concentração inicial de 64 mM de lactose o rendimento de etanol por substrato ( $Y_{E/L}$ ) foi de 1,23 mM mM<sup>-1</sup> em *K. marxianus* UFV-3 e de 0,62 mM mM<sup>-1</sup> em *K. lactis* JA6. O rendimento de biomassa ( $Y_{X/L}$ ) de *K. marxianus* UFV-3 também foi maior que o de *K. lactis* JA6 em aerobiose. À medida que se aumentou a concentração de lactose nas fermentações ocorreu redução no rendimento de biomassa em ambas as leveduras. Na fermentação com menor concentração de lactose, 0,25 mM, o  $Y_{X/L}$  de *K. marxianus* UFV-3 foi de 0,24 g mM<sup>-1</sup> e na fermentação com 64 mM foi de 0,07 g mM<sup>-1</sup>. Em *K. lactis* JA6 a diminuição foi mais acentuada o  $Y_{X/L}$  foi de 0,24 g mM<sup>-1</sup> na concentração com 0,25 mM para 0,02 g mM<sup>-1</sup> na fermentação com 64 mM de lactose.

Sob hipoxia devido ao aumento na formação de etanol e diminuição da formação de biomassa, os rendimentos fermentativos de ambas as leveduras diferiram em relação à aerobiose. Nas menores concentrações de lactose (0,25 e 0,5 mM) em hipoxia não houve formação de etanol em *K. marxianus* UFV-3 ou *K. lactis* JA6. Também não foi detectada a formação de etanol ou glicerol por *K. lactis* JA6 na fermentação contendo 1 mM de lactose. Nas concentrações de 2 e 4 mM de lactose os rendimentos  $Y_{E/L}$ , o  $Y_{E/X}$  e a  $Q_E$  em *K. marxianus* UFV-3 foram menores que em *K. lactis* JA6. Na concentração de 64 mM de lactose o resultado foi oposto,

isto é os rendimentos  $Y_{E/L}$ ,  $Y_{E/X}$  e  $Q_E$  foram maiores em *K. marxianus* UFV-3 que em *K. lactis* JA6. Sob hipoxia, as fermentações com concentrações de 2 e 4 mM de lactose, o  $Y_{E/L}$ , foram cerca de 300% maiores em *K. lactis* JA6 que em *K. marxianus* UFV-3. Na concentração de 64 mM de lactose, observa-se o inverso, isto é o  $Y_{E/L}$  de *K. marxianus* UFV-3 foi 350% maior que em *K. lactis* JA6, chegando próximo (86%) ao rendimento teórico. O rendimento de etanol por massa celular  $Y_{E/X}$ , de *K. lactis* JA6 nas concentrações contendo 2 e 4 mM de lactose foi até 72% maiores que de *K. marxianus* UFV-3. Na concentração inicial de 64 mM de lactose o  $Y_{E/X}$  *K. marxianus* UFV-3 apresentou valores 10% superiores à *K. lactis* JA6. A produtividade volumétrica ( $Q_E$ ) apresentada por *K. lactis* JA6 nas concentrações de 2 e 4 mM de lactose foi até 300% superiores a apresentada por *K. marxianus* UFV-3. Na concentração de 64 mM de lactose *K. marxianus* UFV-3 apresentou valores de  $Q_E$  300% superiores à *K. lactis* JA6. O rendimento celular de *K. marxianus* UFV-3 foi sempre superior ao de *K. lactis* JA6 em todas as concentrações de lactose analisadas em hipoxia, chegando a ser até 200% maior (TABELA 5).

*K. marxianus* UFV-3, com estes resultados, demonstra ser um micro-organismo onde a concentração de substrato é uma importante influência para o comportamento fermentativo.

Tabela 5. Rendimento celular ( $Y_{X/L}$ ) g mM<sup>-1</sup>; rendimento de etanol por substrato ( $Y_{E/L}$ ) mM mM<sup>-1</sup> com respectivo rendimento teórico; rendimento de etanol por massa celular ( $Y_{E/X}$ ) mM g<sup>-1</sup> e produtividade volumétrica ( $Q_E$  máximo) mM h<sup>-1</sup> obtidos por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 nas fermentações realizadas em YNB e YNB<sub>nb</sub> lactose, sob condições aeróbicas e hipóxicas após 24 horas.

<i>K. marxianus</i> UFV-3 aerobiose						<i>K. lactis</i> JA6 aerobiose					
So <sup>a</sup>	$Y_{X/L}$ <sup>b</sup>	$Y_{E/L}$ <sup>c</sup>	$Y_{E/L}\%$ <sup>d</sup>	$Y_{E/X}$ <sup>e</sup>	$Q_E$ <sup>f</sup>	So <sup>a</sup>	$Y_{X/L}$ <sup>b</sup>	$Y_{E/L}$ <sup>c</sup>	$Y_{E/L}\%$ <sup>d</sup>	$Y_{E/X}$ <sup>e</sup>	$Q_E$ <sup>f</sup>
0,25	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,5	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	4	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
64	0,07	1,23	30,64	17,84	3,00	64	0,02	0,62	15,40	24,67	1,05

<i>K. marxianus</i> UFV-3 hipoxia						<i>K. lactis</i> JA6 hipoxia					
So <sup>a</sup>	Y <sub>X/L</sub> <sup>b</sup>	Y <sub>E/L</sub> <sup>c</sup>	Y <sub>E/L</sub> % <sup>d</sup>	Y <sub>E/X</sub> <sup>e</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>f</sup>	So <sup>a</sup>	Y <sub>X/L</sub> <sup>b</sup>	Y <sub>E/L</sub> <sup>c</sup>	Y <sub>E/L</sub> % <sup>d</sup>	Y <sub>E/X</sub> <sup>e</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>f</sup>
0,25	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,5	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,15	1,49	37,23	0,45	9,68	1	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,10	0,85	21,29	0,38	8,19	2	0,04	2,71	67,79	74,42	0,22
4	0,06	2,17	54,32	1,58	34,39	4	0,05	3,43	85,65	72,08	0,51
64	0,03	3,44	85,92	4,53	98,22	64	0,01	1,02	25,57	88,78	2,61

<sup>a</sup> Concentração inicial de lactose em mM

<sup>b</sup> Rendimento máximo de biomassa por substrato em g mM<sup>-1</sup>

<sup>c</sup> Rendimento máximo de etanol por substrato em mM mM<sup>-1</sup>

<sup>d</sup> Consumo de lactose em%

<sup>e</sup> Rendimento máximo de etanol em relação à massa celular mM g<sup>-1</sup>

<sup>f</sup> Produtividade volumétrica máxima mM h<sup>-1</sup>

### 4.3. Atividade enzimática em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 nas fermentações de em meio contendo lactose, sob aerobiose e hipoxia.

Todas as atividades enzimáticas foram realizadas após as células serem cultivadas em meio YNB (ou YNB<sub>nb</sub>) contendo 20 g L<sup>-1</sup> de lactose. Nos experimentos realizados em hipoxia o meio de fermentação foi borbulhado por nitrogênio (99% de pureza) e mantido em baixa agitação (50 rpm). Em aerobiose o meio de fermentação foi mantido sob alta agitação (200 rpm) para a manter o meio aerado.

Em aerobiose a atividade específica da enzima β-galactosidase (β-gal) em *K. marxianus* UFV-3 foi estatisticamente igual à de *K. lactis* JA6 (TABELA 6A) sendo que a atividade enzimática de ambas as células diminuiu com o tempo de fermentação.

Sob aerobiose a atividade específica de piruvato desidrogenase (PDH) foi maior em *K. marxianus* UFV-3 que em *K. lactis* JA6 (TABELA 6A). A atividade do complexo PDH em ambas as células diminuiu com o tempo de fermentação, mas a diferença das atividades entre as células permaneceu na ordem de mais de 1000% em favor de *K. marxianus* UFV-3. Não foi detectada a atividade desta enzima em hipoxia.

Sob hipoxia a atividade β-galactosidase de *K. marxianus* UFV-3 foi estatisticamente superior que a de *K. lactis* JA6, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A atividade específica de β-gal em *K. marxianus* UFV-3 foi, entre 315 e 443%, maior que em *K. lactis* JA6 (TABELA 6B). Uma característica antagônica

entre as duas leveduras analisadas é que, em hipoxia *K. marxianus* UFV-3 apresentou maior atividade de  $\beta$ -gal do que em aerobiose, enquanto que, em *K. lactis* JA6 o resultado foi oposto, houve maior atividade da enzima em aerobiose do que em hipoxia.

Em hipoxia a atividade específica da piruvato descarboxilase (PDC) foi maior em *K. marxianus* UFV-3 que em *K. lactis* JA6 (TABELA 6B). Inicialmente *K. lactis* JA6 apresentou maior atividade de PDC, entretanto nos tempos posteriores, *K. marxianus* apresentou atividade até 480% superior de PDC quando comparado com *K. lactis* JA6. Não foi detectada a atividade desta enzima em aerobiose.

Em hipoxia a atividade específica da enzima álcool desidrogenase (ADH) em *K. lactis* JA6 foi maior que a de *K. marxianus* UFV-3, em todos os tempos analisados (TABELA 6B). Somente a partir de quatro horas a atividade da ADH em *K. marxianus* UFV-3 foi detectada, entretanto, os valores sempre foram inferiores aos encontrados em *K. lactis* JA6. As diferenças das atividades sempre foram superiores a 700%. Não foi detectada a atividade desta enzima em aerobiose.

Tabela 6. Atividade enzimática (U/mg proteína) das enzimas  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal), piruvato desidrogenase (PDH), piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 em fermentações em meio YNB (ou YNB<sub>nb</sub>) 20 g L<sup>-1</sup> lactose em aerobiose (A) e em hipoxia (B).

**A.**

Tempo	$\beta$ -gal		PDH	
	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>
2	17343 $\pm$ 9054 <sup>aA</sup>	19269 $\pm$ 1452a <sup>aA</sup>	53,53	1,87
4	12154 $\pm$ 2235 <sup>aA</sup>	22160 $\pm$ 756 <sup>aB</sup>	nd	nd
6	9669 $\pm$ 1113 <sup>aA</sup>	10618 $\pm$ 523 <sup>aC</sup>	7,82	0,61
8	11949 $\pm$ 1649 <sup>aA</sup>	9678 $\pm$ 513 <sup>aC</sup>	nd	nd

**B.**

Tempo	$\beta$ -gal		PDC		ADH	
	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>
2	20996 $\pm$ 4894 <sup>aA</sup>	5149 $\pm$ 85 <sup>bA</sup>	6,82	7,03	0	82,3
4	21642 $\pm$ 5692 <sup>aA</sup>	6264 $\pm$ 1260 <sup>bA</sup>	7,23	2,34	18,45	116,99
6	19228 $\pm$ 2826 <sup>aA</sup>	6089 $\pm$ 683 <sup>bA</sup>	2,24	2,77	26,59	81,67
8	30454 $\pm$ 3955 <sup>aB</sup>	6870 $\pm$ 107 <sup>bA</sup>	17,52	3,63	18,1	127,03

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Letras maiúsculas representam comparação entre tempos.

Letras minúsculas representam comparação entre células.

nd: não determinado

#### 4.4. PCR quantitativo em Tempo Real, para estudo da expressão de genes do metabolismo de lactose nas fermentações de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6 em meio contendo lactose, sob aerobiose e hipoxia.

Para comparar o perfil da expressão gênica entre as duas leveduras pelo PCR quantitativo em Tempo Real seria necessário que os oligonucleotídeos de *K. marxianus* UFV-3 e de *K. lactis* JA6 fossem idênticos. Entretanto, a sequência do genoma de *K. marxianus* UFV-3 não está totalmente disponível, sendo assim, não foi possível realizar o alinhamento das seqüências para a construção dos mesmos oligonucleotídeos para as duas leveduras. Assim as comparações só puderam ser realizadas entre as próprias células na condição de cultivo em aerobiose e hipoxia.

Foram determinados os pontos de cruzamento ( $C_T$ ) de cada gene do metabolismo de lactose e actina nos tempos de 1, 3 e 6 horas em aerobiose e 1, 3, 6 e 9 horas hipoxia, sendo que a média destes pontos foi determinada. Ainda foram realizados calculados para se determinar o valor da relação da expressão dos genes em hipoxia pela expressão dos mesmos genes em aerobiose. Deste modo, os valores da expressão gênica em aerobiose foram padronizados para 1. Quando a relação entre a expressão do gene em hipoxia e aerobiose foi maior que 1 o gene foi mais expresso em hipoxia do que em aerobiose. Quando a relação entre a expressão do gene em hipoxia e aerobiose foi menor que 1 o gene foi mais expresso em aerobiose do que em hipoxia.

Em *K. marxianus* UFV-3 apenas o gene da galactocinase (*GAL1*) não apresentou aumento de expressão em hipoxia (TABELA 7). Dos genes da via de Leloir *GAL1* apresentou expressão 84% menor em hipoxia do que em aerobiose, já galactose-1-fosfato uridiltransferase (*GAL7*) e epimerase (*GAL10*) apresentaram expressão 359% e 697% superiores em hipoxia do que em aerobiose.

A expressão de  $\beta$ -galactosidase *LAC4* foi superior, 249%, em hipoxia do que em aerobiose. Já o gene que codifica a enzima piruvato descarboxilase (*RAG6*) exibiu expressão cerca 866% maior em hipoxia do que em aerobiose.

Estes dados demonstram que a diminuição da concentração de oxigênio no meio de cultivo aumentou de forma significativa a expressão dos genes do metabolismo de lactose em *K. marxianus* UFV-3, com exceção de *GAL1*.

Tabela 7. Relação do nível de expressão relativa dos genes alvo - galactocinase (*GAL1*), galactose-1-fosfato uridiltransferase (*GAL7*), epimerase (*GAL10*),  $\beta$ -galactosidase (*LAC4*) e piruvato descarboxilase (*RAG6*) - em aerobiose e em hipoxia em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 em meio YNB com 20 g L<sup>-1</sup> de lactose.

Célula	Cultivo	<i>GAL1</i>	<i>GAL7</i>	<i>GAL10</i>	<i>LAC4</i>	<i>RAG6</i>
		Relação	Relação	Relação	Relação	Relação
<i>K. marxianus</i>	aerobiose	1	1	1	1	1
	hipoxia	0,16±0,21	3,59±0,96	6,97±2,14	2,49±1,5	8,66±2,84

Em *K. lactis* JA6 os genes do metabolismo da lactose foram menos expressos em hipoxia do que em aerobiose (TABELA 8).

Os genes da via Leloir *GAL1* e *GAL10* apresentaram expressão cerca de 50% menor em hipoxia que em aerobiose enquanto que *GAL7* apresentou expressão 35% inferior.

A expressão de *LAC4* seguiu a mesma tendência dos genes da via de Leloir, apresentando uma expressão 34% menor em hipoxia. O gene *RAG6* também apresentou uma diminuição de expressão em hipoxia, de cerca de 20%.

Estes dados demonstram que diferentemente do que ocorreu com *K. marxianus* UFV-3 a diminuição da concentração de oxigênio no meio de cultivo diminuiu a expressão dos genes do metabolismo de lactose em *K. lactis* JA6.

Tabela 8. Relação do nível de expressão relativa dos genes alvo - galactocinase (*GAL1*), galactose 1-fosfato uridiltransferase (*GAL7*), epimerase (*GAL10*),  $\beta$ -galactosidase (*LAC4*) e piruvato descarboxilase (*RAG6*) - em aerobiose e em hipoxia em *Kluyveromyces lactis* JA6 em meio YNB<sub>nb</sub> contendo 20 g L<sup>-1</sup> lactose.

<b>Célula</b>	<b>Cultivo</b>	<b><i>GAL1</i></b>	<b><i>GAL7</i></b>	<b><i>GAL10</i></b>	<b><i>LAC4</i></b>	<b><i>RAG6</i></b>
		<b>Relação</b>	<b>Relação</b>	<b>Relação</b>	<b>Relação</b>	<b>Relação</b>
<b><i>K. lactis</i></b>	aerobiose	1	1	1	1	1
	hipoxia	0,55±0,21	0,65±0,46	0,51±0,68	0,76±0,37	0,81±0,48

## 5. DISCUSSÃO

Para auxiliar a compreensão do metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, levedura com interessante potencial fermentativo, e *Kluyveromyces lactis* JA6, levedura que apresenta produção de etanol maior que outras linhagens quando crescida em glicose devido a um transportador adicional de hexose, *KHT2*, realizou-se um estudo da cinética de crescimento destas leveduras sob aerobiose e hipoxia. Foi analisado o consumo de substrato e formação de produtos metabólitos em fermentações conduzidas em ambas às concentrações de oxigênio, em diversas concentrações de lactose, sendo esta a única fonte de carbono e energia presente no meio de cultivo. Nestas mesmas condições foi determinada a expressão gênica e a atividade de enzimas-chave do metabolismo de lactose nos ambientes aeróbio e em hipoxia.

As velocidades de crescimento e de produção de metabólitos são respostas de uma rede metabólica que interage entre si para culminar na divisão celular e formação de biomassa. Apesar da velocidade de crescimento e a massa celular máxima de *K. marxianus* UFV-3 e *K. lactis* JA6 nas fermentações contendo 0,25 e 0,25 mM de lactose em aerobiose serem semelhantes, a constante de saturação ( $K_s$ ) destas duas células foram diferentes. O menor  $K_s$  de *K. lactis* JA6 indica que essa levedura é mais eficiente no transporte de menores concentrações de lactose. Com maior  $K_s$  de *K. marxianus* UFV-3 em aerobiose a célula apresentou maiores velocidades de crescimento.

Os resultados demonstram que há produção de etanol em *K. marxianus* UFV-3 e *K. lactis* JA6 a partir de 64 mM de lactose, sendo que *K. marxianus* UFV-3 exibe maior rendimento de etanol por substrato que *K. lactis* JA6. Esta característica denota que a maior concentração de carboidrato no meio extracelular parece modular o metabolismo para fermentação nas duas leveduras, mas que *K. marxianus* UFV-3 aparentemente responde mais à maior concentração de lactose. Em concentrações acima de 64 mM de lactose espera-se que haja acúmulo de piruvato intracelularmente. De acordo com o modelo de Holzer (1960) para *S. cerevisiae* em baixas concentrações intracelular de piruvato, este é metabolizado inteiramente pelo complexo piruvato desidrogenase. Já em altas concentrações de piruvato é ativado o complexo piruvato descarboxilase propiciando a fermentação alcoólica. Aparentemente o complexo piruvato descarboxilase de *K. marxianus* UFV-3 mostra-se mais ativo fazendo com que na concentração de 64 mM de lactose haja a formação de etanol mesmo em aerobiose.

Sob hipoxia *K. marxianus* UFV-3 apresenta maiores velocidades de crescimento e formação de biomassa que *K. lactis* JA6 além de maiores rendimentos celulares ( $Y_{X/L}$ ). À medida que a concentração de lactose aumenta, ocorre uma redução dos rendimentos de biomassa por lactose consumida. Sob hipoxia a lactose é principalmente convertida a etanol, ao invés de biomassa, evidenciando assim o deslocamento no metabolismo da célula.

A afinidade por lactose de *K. marxianus* UFV-3 em aerobiose e em hipoxia é semelhante, sugerindo que a afinidade a lactose não é afetada pela presença de oxigênio. Por outro lado a afinidade por lactose de *K. lactis* JA6 em hipoxia é 4 vezes maior que em aerobiose sugerindo que o oxigênio influencia a afinidade de *K. lactis* JA6 por lactose.

Nas concentrações de 2 e 4 mM lactose em hipoxia *K. lactis* JA6 exibe maior produção de etanol e maiores rendimentos ( $Y_{E/L}$ ,  $Y_{E/X}$  e  $Q_E$ ) que *K. marxianus* UFV-3. Aparentemente o deslocamento do metabolismo para a produção de etanol em *K. marxianus* UFV-3 é mais dependente da concentração de lactose que *K. lactis* JA6. A produção de etanol dependente da concentração de carboidrato é uma característica já bem descrita em *S. cerevisiae*, sendo que aparentemente *K. marxianus* UFV-3 se assemelha a esta levedura no tocante desta característica (OTTERSTEDT *et al.*, 2004). Assim, não seria necessário apenas um ambiente hipóxico para que *K. marxianus* UFV-3 obtenha altos rendimentos de etanol, mas concentrações elevadas de lactose. Uma vez que em ambientes com baixas

concentrações de lactose os rendimentos de *K. marxianus* UFV-3 ficam abaixo de *K. lactis* JA6.

*K. marxianus* UFV-3 exibe maiores atividades de  $\beta$ -galactosidase em hipoxia quando comparado a *K. lactis* JA6. Isto indica que a lactose ao ser transportada por sua respectiva permease é mais prontamente metabolizada por *K. marxianus* UFV-3. Os genes *LAC4* e *LAC12* que codificam respectivamente  $\beta$ -galactosidase e a permease da lactose sendo que são divergentemente transcritos com uma região intergênica comum. Nesta região intergênica há cerca de quatro sítios de ativação *upstream* (UAS) comum aos dois genes, que são locais onde se liga a proteína ativadora GAL4p (GÖDECKE *et al.*, 1991). Maior atividade de  $\beta$ -galactosidase pode indicar maior capacidade de transporte de lactose devido à co-regulação dos genes *LAC4* e *LAC12*. A rápida hidrólise da lactose propicia maior fluxo glicolítico e consequentemente maior velocidade de crescimento e formação de biomassa ou formação de etanol.

Sob aerobiose *K. marxianus* UFV-3 apresenta maior atividade da enzima piruvato desidrogenase o que significa que maiores quantidades de acetil-CoA são formados o que aumenta a geração de energia na célula. Em aerobiose *K. lactis* CBS 2359 é capaz de metabolizar totalmente o piruvato a acetil-CoA devido às altas atividades de PDH (ZEEMAN *et al.*, 1998). Este fato contrasta com a limitada capacidade respiratória de *S. cerevisiae* que é devida principalmente à baixa capacidade da enzima piruvato desidrogenase em metabolizar o piruvato (GONZALES-SISO *et al.*, 2000). A maior capacidade de formar biomassa em aerobiose por *K. marxianus* UFV-3 pode ser resultado da maior atividade de PDH em comparação à *K. lactis* JA6.

Sob hipoxia *K. marxianus* UFV-3 apresenta maior atividade da piruvato descarboxilase do que *K. lactis* JA6 indicando que a fermentação alcoólica é realizada de forma mais eficiente em *K. marxianus* UFV-3. A piruvato descarboxilase é a enzima chave da fermentação alcoólica é responsável pela conversão do piruvato a acetaldeído que é logo reduzido a etanol. Não foi detectada a atividade desta enzima em aerobiose indicando que o oxigênio dissolvido no meio tem particular influência na regulação de piruvato descarboxilase não só em *S. cerevisiae*, mas também em *K. marxianus* UFV-3 e *K. lactis* JA6. (PRONK *et al.*, 1996).

Em hipoxia a atividade da enzima álcool desidrogenase foi superior em *K. lactis* JA6 quando comparado à *K. marxianus* UFV-3, sendo que este resultado aparentemente contradiz a maior capacidade fermentativa de *K. marxianus* UFV-3.

Por outro lado, como a PDC é menos ativa em *K. lactis* JA6 isto significa que há menor formação de acetaldeído no meio intracelular. Desta forma apesar da maior atividade de ADH, *K. lactis* JA6 não possui rendimentos de etanol tão altos quanto *K. marxianus* UFV-3 devido à atividade da ADH estar sendo limitada pela baixa concentração de acetaldeído.

A maior expressão dos genes *GAL*, presentes na via de Leloir, aumenta o consumo de galactose e formação de etanol em *Saccharomyces cerevisiae* (OSTERGAARD *et al.* 2000). Como a galactose é um dos produtos da hidrólise da lactose foi analisada a expressão dos genes da *GAL* para se verificar se há aumento da expressão desses genes nas fermentações em aerobiose e na transição de aerobiose para hipoxia.

Em *K. marxianus* UFV-3 apenas o gene *GAL1* não apresentou aumento de sua expressão. Em *K. lactis* JA6 a expressão dos genes da via de Leloir em hipoxia foi inferior que em aerobiose. Isto sugere que a maior expressão dos genes da via de Leloir pode ser um fator determinante para o metabolismo mais fermentativo de *K. marxianus* UFV-3 quando comparado à *K. lactis* JA6, uma vez que com a maior expressão destes genes pode gerar maior formação do intermediário glicolítico glicose 6-P.

Sob hipoxia o gene *RAG6* – piruvato descarboxilase - apresentou expressão elevada em *K. marxianus* UFV-3. Já foi demonstrado que a expressão piruvato descarboxilase em *S. cerevisiae* é aumentada em baixas concentrações de oxigênio no meio. Esta característica pode explicar o porquê de *K. marxianus* apresenta expressão em hipoxia de *RAG6* mais de 800% maior que em aerobiose. Em *K. lactis* JA6 a expressão de *RAG6* pouco se alterou independente se o cultivo foi feito em aerobiose ou em hipoxia. *RAG6* também parece estar diretamente relacionado ao maior potencial fermentativo de *K. marxianus* UFV-3 em comparação a *K. lactis* JA6. Isto pode ser reforçado pelo fato de *K. lactis* CBS 2359 apresentar somente um gene *RAG6* o que parece ser verdade para a maioria das leveduras do gênero *Kluyveromyces*. Assim expressão de *RAG6* é considerada essencial para que a célula desenvolva o metabolismo fermentativo uma vez que a deleção deste gene impede a fermentação alcoólica em *K. lactis* CBS 2359 (BIANCHI *et al.*, 1996).

As altas atividades da  $\beta$ -galactosidase assim como a alta expressão de seu gene codificador (*LAC4*) gene em aerobiose quanto em hipoxia definitivamente contribuem para que *K. marxianus* UFV-3 seja capaz de alcançar concentrações de

biomassa e velocidade de crescimento, superior a *K. lactis* JA6 em aerobiose e altas taxas de formação de etanol em hipoxia. Além de que a alta atividade/expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase sugerir maior capacidade de transporte pela permease da lactose de *K. marxianus* UFV-3 s comparado com *K. lactis* JA6.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As cinéticas de crescimento de *K. marxianus* UFV-3 e de *K. lactis* JA6 em função da concentração de lactose obedeceram o modelo cinético proposto por Monod (1949). Em aerobiose *K. marxianus* UFV-3 possui velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) de  $0,53 \text{ h}^{-1}$  e uma constante de saturação ( $K_S$ ) de  $0,69 \text{ mmol L}^{-1}$ , enquanto *K. lactis* JA6 nas mesmas condições, revelou um  $\mu_{\max}$  de  $0,29 \text{ h}^{-1}$  e  $K_S$  de  $0,27 \text{ mmol L}^{-1}$  de lactose. Em hipoxia *K. marxianus* apresentou  $\mu_{\max}$  de  $0,28 \text{ h}^{-1}$  e  $K_S$  de  $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$  enquanto *K. lactis* JA6 o  $\mu_{\max}$  foi de  $0,179 \text{ h}^{-1}$  e  $K_S$  de  $1,295 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Em aerobiose e hipoxia *K. marxianus* UFV-3 apresentou maior formação de biomassa comparada a *K. lactis* JA6 em todas as fermentações com concentrações de lactose de 64 mM. Em aerobiose *K. marxianus* UFV-3 produziu 4,081 gramas de célula por litro de meio, enquanto que *K. lactis* JA6 produziu um quarto disso ou  $1,046 \text{ g L}^{-1}$ . Em hipoxia *K. marxianus* UFV-3 produziu 2,095 gramas de célula por litro de meio enquanto que *K. lactis* JA6 produziu cerca de três vezes menos ou  $0,759 \text{ g L}^{-1}$ . Nas fermentações em hipoxia com concentrações de lactose baixas como 2 e 4 mM *K. lactis* JA6 apresenta maior formação de etanol quando comparado a *K. marxianus* UFV-3. Entretanto, tanto em aerobiose quanto em hipoxia quando a fermentação é conduzida com concentração de lactose 64 mM *K. marxianus* UFV-3 apresenta maior formação de etanol que *K. lactis* JA6. Esse fato

demonstra que não somente baixas concentrações de oxigênio são necessárias para que *K. marxianus* UFV-3 possua altos rendimentos de etanol, mas há também a necessidade de maiores concentrações de lactose.

Em aerobiose a atividade específica de  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) de *K. marxianus* UFV-3 e de *K. lactis* JA6 foram estatisticamente iguais. Ainda em aerobiose a atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) foi até 1000% maior em *K. marxianus* UFV-3 do que em *K. lactis* JA6. A maior atividade de PDH em aerobiose podem ser as razões que fazem *K. marxianus* UFV-3 apresentar maior velocidade de crescimento e formação de biomassa quando comparado à *K. lactis* JA6.

Sob hipoxia a atividade de  $\beta$ -gal de *K. marxianus* UFV-3 foi estatisticamente maior (até 400%) que a de *K. lactis* JA6. Ainda em hipoxia a atividade da enzima piruvato descarboxilase (PDC) foi até 500% vezes maior em *K. marxianus* UFV-3 do que em *K. lactis* JA6. A maior atividade de  $\beta$ -gal e PDC em hipoxia podem ser as razões que fazem *K. marxianus* UFV-3 apresentar maior produção de etanol quando comparado à *K. lactis* JA6.

A expressão do gene *RAG6* (gene que codifica a piruvato descarboxilase) em *K. marxianus* UFV-3 foi superior em hipoxia quando comparada à aerobiose. O mesmo gene em *K. lactis* JA6 não teve sua expressão alterada nem em aerobiose nem em hipoxia. Os genes da via de Leloir – *GAL7* e *GAL10* – e o gene *LAC4* também apresentaram maior expressão em hipoxia em *K. marxianus* UFV-3. Em *K. lactis* JA6 esses genes foram menos expressos em hipoxia quando comparada à aerobiose. Assim a maior expressão dos genes da via de Leilor, de *LAC4* e *RAG6* parecem ser responsáveis pela maior capacidade fermentativa de *K. marxianus* UFV-3 comparada com *K. lactis* JA6.

Com os resultados apresentados pode-se perceber que a enzima piruvato descarboxilase possui um importante papel para fermentação alcoólica de *K. marxianus* UFV-3. Esta maior atividade de PDC e a alta expressão de *RAG6* parecem indicar que não apenas em lactose *K. marxianus* UFV-3 apresentaria altos rendimentos fermentativos, mas também com outros tipos carboidratos como glicose. A capacidade de *K. marxianus* UFV-3 fermentar de forma eficiente, outros tipos açúcares deve ser estudada em uma vez que essa levedura pode se tornar uma opção para a realização de fermentações onde tradicionalmente se utiliza outras espécies de leveduras como *S. cerevisiae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **Yeast research**, v. 4, p.691-698, 2004.

BIANCHI, M. M.; TIZZANI, L.; DESTRUELLE, M.; FRONTALI, L.; WÉSOLOWSKI-LOUVEL, M. The petite negative yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. **Molecular Microbiology**, v.19, n.1, p.27-36, 1996.

BREUNIG, K. D.; KUGER, P. Functional homology between the yeast regulatory proteins GAL4 and LAC9: LAC9-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the GAL4 protein-binding site. **Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 4400-4406, 1987.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVÉGLISE, C.; TALLA, E.; GOFFARD, N.; FRANGEUL, L.; AIGLE, M.; ANTHOUARD, V.; BABOUR, A.; BARBE, V.; BARNAY, S.; BLANCHIN, S.; BECKERICH, J. M.; BEYNE, E.; BLEYKASTEN, C.; BOISRAMÉ, A.; BOYER, J.; CATTOLICO, L.; CONFANIOLERI, F.; DE DARUVAR, A.; DESPONS, L.; FABRE, E.; FAIRHEAD, C.; FERRY-DUMAZET, H.; GROPPA, A.; HANTRAYE, F.; HENNEQUIN, C.; JAUNIAUX, N.; JOYET, P.; KACHOURI, R.; KERREST, A.; KOSZUL, R.; LEMAIRE, M.; LESUR, I.; MA, L.; MULLER, H.; NICAUD, J. M.; NIKOLSKI, M.; OZTAS, S.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; PELLENZ, S.; POTIER, S.; RICHARD, G. F.; STRAUB, M. L.; SULEAU, A.; SWENNEN, D.; TEKAIA, F.; WÉSOLOWSKI-LOUVEL, M.; WESTHOF, E.; WIRTH, B.; ZENIOU-MEYER, M.; ZIVANOVIC, I.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; THIERRY, A.; BOUCHIER, C.; CAUDRON, B.; SCARPELLI, C.; GAILLARDIN, C.; WEISSENBAACH, J.; WINCKER, P.; SOUCIET, J. L. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v.430, p.35-44, 2004.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2007. Disponível em <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>. Acesso em 09.02.2008.

FLORES, C. L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.507-529, 2000.

FLIKWEERT, M. T.; VAN-DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. **Applied and environmental microbiology**, v.63, n.9, p.3399-3404, 1997.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast research**, v.7, n. 3, p.422-435, 2007.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.79, n.3, p.339-354, 2008.

FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* – a retrospective. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.323-324, 2006.

GHALY, A. E.; BEN-HASSAN, R. M. Kinetics of bath production of single-cell protein from cheese whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.50, n.1, p.79-92, 1995.

GHALY, A. E.; KAMAL, M.; AVERY, A. Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.741–749, 2003.

GÖDECKE, A.; ZACHARIAE, W.; ARVANITIDIS, A.; BREUNIG, K. D. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and beta-galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. **Nucleic acids research**, v.19, n.19, p.5351-5358, 1991.

GONZÁLEZ-SISO, M. I. The Biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

GONZÁLEZ-SISO, M. I.; RAMIL, E.; CERDÁN, M. E.; FREIRE-PICOS, M. A. Respiro-fermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and Crabtree effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.585-591, 1996.

GONZÁLEZ-SISO, M. I.; FREIRE-PICOS, M. A.; RAMIL, E.; GONZÁLEZ-DOMINGUES, M.; TORRES, A. R.; CERDÁN, M. E. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 699-705, 2000.

HACK, C. J.; MARCHANT, R. Characterization of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.20, p.323–327, 1998.

HOLZER, H.; GOEDDE, H. W.; GOEGGEL, K.H.; ULRICH, B. Identification of alpha-hydroxyethyl thiamine pyrophosphate ("active acetaldehyde") as an intermediate in the oxidation of pyruvate by pyruvic oxidase from yeast mitochondria. **Biochemical and biophysical research communications**, v.3, p. 599-602, 1960.

IBGE. Quantidade de leite cru ou resfriado adquirido, segundo os meses - Brasil -3º Trimestre de 2007. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão**, 2007. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/defaulttab.shtml>>. Acesso em 09.02.2008.

KIENDL, P. Dairy: World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**, 2005. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2005/05-12Dairy/toc.htm>>. Acesso em 09.02.2008

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts: a Taxonomic Study**. ed. 4, press. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

LACHANCE, M. A. Current status of *Kluyveromyces* systematics. **FEMS Yeast Research**, v.7, n.5, p.642-645, 2007.

LAI, K.; KLAPA, M.I. Alternative pathways of galactose assimilation: could inverse metabolic engineering provide an alternative to galactosemic patients? **Metabolic Engineering**, v.6, p. 239-244, 2004.

MINAS GERAIS. Franceses dão suporte à certificação do queijo mineiro. **Governo de Minas Gerais**, 2005. Disponível em <<https://www.mg.gov.br/portalmg/do/noticias?op=estruturaConteudo&opMenu=&coConteudo=23550&coSeqPagina=18&coSeqOrigemAcesso=1>> . Acesso em 09.02.2008

MONOD, J. The growth of bacteria cultures. **Annual Review Microbiology**, v.3, p. 371-394, 1949.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; JOHNSTON, M.; NIELSEN, J. Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the GAL gene regulatory network. **Nature biotechnology**, v.18, p.1283-1286, 2000.

OTTERSTELD, K.; LARSSON, C.; BILL, R.M.; STÄHLBERG, A.; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Report**, v.5, n.5, p. 532-537, 2004.

OZMIHCI, S.; F. KARGI. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.169-174, 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p.2002-2007, 2001.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied an Environmental Microbiology**, v.55, n.2, p.468-477, 1989.

PRONK, J.T.; STEENSMA, H.Y.; VAN DIJKEN, J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.12, p.1607-1633, 1996.

RUBIO-TEXEIRA, M. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so distant cousins - *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.1115–1128, 2005.

SCHMITT, M. E.; BROWN, T. A.; TRUMPOWER, B. L. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.10, p. 3091-3092, 1990.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.930-936, 2005.

SINGH, D.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; MCHALE, A. P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II - Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p.823-834, 1998.

SNOEK, I. S. I.; STEENSMA, H. Y. Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. **FEMS Yeast**, v.6, p.393-403, 2005.

SULEAU, A.; GOURDON, P.; REITZ-AUSSEUR, J.; CASAREGOLA, S. Transcriptomic analysis of extensive changes in metabolic regulation in *Kluyveromyces lactis* strains. **Eukaryotic cell**, v.5, n.8, p.1360–1370, 2006.

VIENNE, P. e STOCKAR, U. V. An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v.7, n.7, p.521-526, 1985.

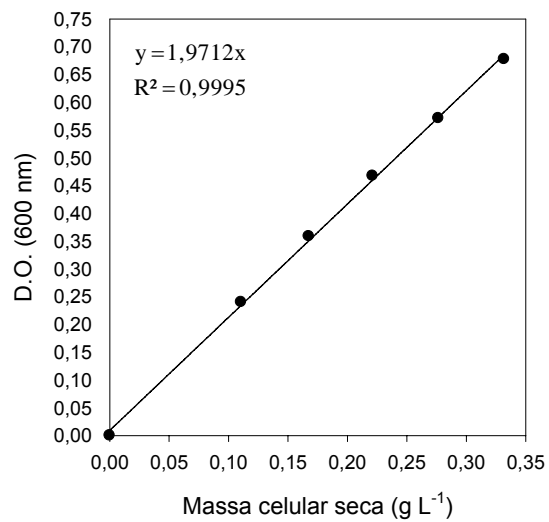
WÉSOŁOWSKI, M. L., BREUNIG, K. D., FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis*, in **Non-conventionul yeasts in biotechnology**, ed. Wolf K., press. Springer-Verlag, Heidelberg, 1996.

WIEBE, M.G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJÄRVI, L.; TOIVARI, M.; KOKKONEN, J.T.; KIURU, J.; KETOLA, E.A.; JOUHTEN, P.; HUUSKONEN, A.; MAAHEIMO, H.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxigen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast research**, v.8, n.1, p.140-154, 2008.

ZEEMAN, A-M.; LUTTIK, M. A. H.; THIELE, C.; DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; STEENSMA, H. Y. Inactivation of the *Kluyveromyces lactis* *KIPDA1* gene leads to loss of pyruvate dehydrogenase activity, impairs growth on glucose and triggers aerobic alcoholic fermentation. **Microbiology**, v.144, p.3437-3446, 1998.

## ANEXO

### A. *K. marxianus* UFV-3



### B. *K. lactis* JA6

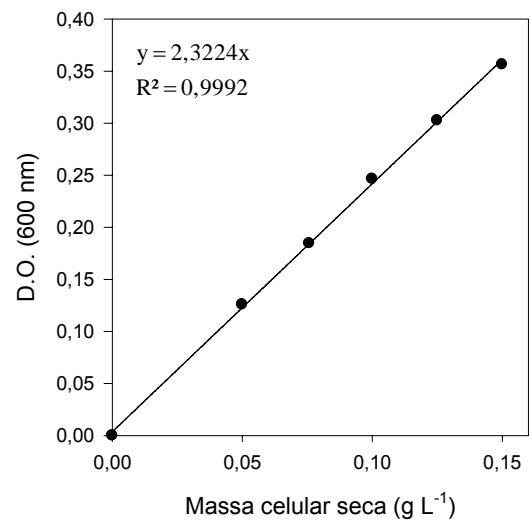


Figura 1A: Curva padrão de massa celular seca (g L<sup>-1</sup>) de *K. marxianus* UFV-3 (A) e *K. lactis* JA6 (B) em meio YNB e YNB<sub>hb</sub>, respectivamente, acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de lactose.

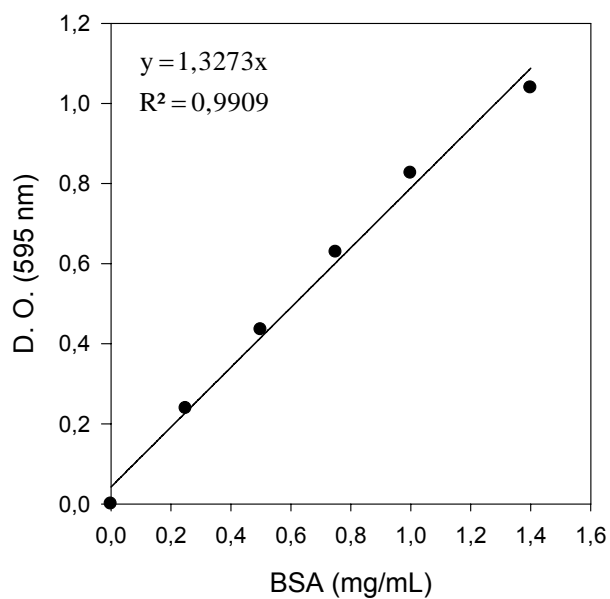


Figura 2A: Curva padrão de proteína total (mg/mL) realizada com soro albumina bovina (BSA, St. Louis, USA) adicionada ao reagente de Bradford (Sigma, St. Louis, USA).

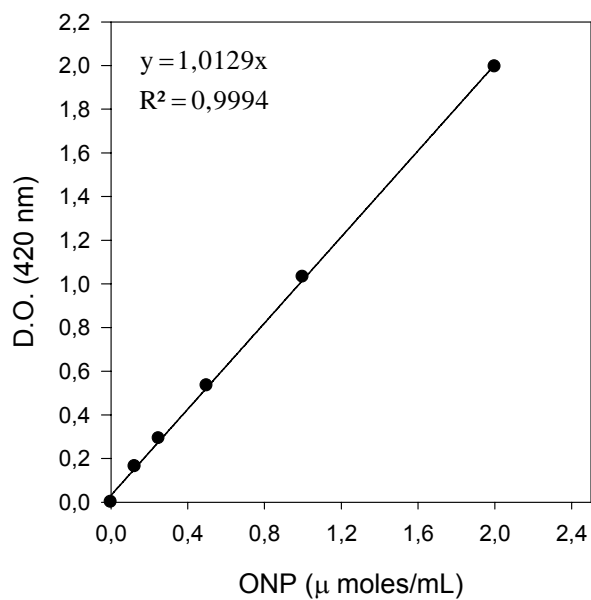


Figura 3A: Curva padrão da atividade de  $\beta$ -galactosidase ( $\mu$ moles de ONP/mL) realizada com orto-nitrofenol (ONP; Sigma, St. Louis, USA).

#### 4A. Fórmulas para a detecção da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase:

Atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $(1000 * A_{420}) / (t * V)$ .

$A_{420}$  foi a leitura da reação realizada a 420 nm;  $t$  foi tempo de incubação da reação a 37 °C,  $v$  foi o volume de extrato celular utilizado na reação. A unidade desta atividade foi expressa em milimoles de o-nitrofenol (ONP) formada por minuto.

A atividade específica da enzima  $\beta$ -galactosidase foi calculada de acordo com a fórmula: Atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase / concentração de proteína.

A *concentração de proteína* foi calculada conforme o item 3.10.2. A unidade desta atividade específica foi expressa em milimoles de o-nitrofenol (ONP) formada por minuto (U) por miligrama de proteína celular.

#### 5A. Fórmulas para a detecção da atividade da enzima piruvato descarboxilase:

A atividade da enzima piruvato descarboxilase foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $(1000 * TV * D * dA/dt) / (\epsilon * V)$ .

$TV$  foi o volume total utilizado na cubeta,  $D$  foi a diluição do extrato celular,  $dA/dt$  foi a diferença entre a regressão linear dos valores obtidos pela absorvância a 340 nm, na fase exponencial da reação experimental e do controle negativo,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar do  $NAD^+/NADH$  (6,22 L/mol por largura da cubeta de 1,0 cm),  $V$  foi o volume do extrato celular utilizado no ensaio. A unidade da atividade da piruvato descarboxilase foi expressa em  $\mu M$  de acetaldeído formado por minuto.

A atividade específica da enzima piruvato descarboxilase foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Atividade da enzima piruvato descarboxilase / concentração de proteína.

A *concentração de proteína* foi calculada conforme o item 3.10.2. . A unidade da atividade da piruvato descarboxilase foi expressa em  $\mu M$  de acetaldeído formado por minuto (U) por miligrama de proteína celular.

## 6A. Fórmulas para a detecção da atividade da enzima piruvato desidrogenase:

A atividade da enzima piruvato desidrogenase foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $(1000 * TV * D * dA/dt) / (\epsilon * V)$ .

$TV$  foi o volume total utilizado na cubeta,  $D$  foi a diluição do extrato celular,  $dA/dt$  foi a diferença entre a regressão linear dos valores obtidos pela absorvância a 340 nm, na fase exponencial da reação experimental e do controle negativo,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar do  $NAD^+/NADH$  (6,22 L/mol por largura da cubeta de 1,0 cm),  $V$  foi o volume do extrato celular utilizado no ensaio. A unidade da atividade da piruvato desidrogenase foi expressa em  $\mu M$  de acetil-CoA formado por minuto.

A atividade específica da enzima piruvato desidrogenase foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Atividade da enzima piruvato desidrogenase / concentração de proteína.

A *concentração de proteína* foi calculada conforme o item 3.10.2. A unidade da atividade da piruvato desidrogenase foi expressa em  $\mu M$  de acetil-CoA formado por minuto (U) por miligrama de proteína celular.

## 7A. Fórmulas para a detecção da atividade da enzima álcool desidrogenase:

A atividade da enzima álcool desidrogenase foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $(1000 * TV * D * dA/dt) / (\epsilon * V)$ .

$TV$  foi o volume total utilizado na cubeta,  $D$  foi a diluição do extrato celular,  $dA/dt$  foi a diferença entre a regressão linear dos valores obtidos pela absorvância a 340 nm, na fase exponencial da reação experimental e do controle negativo,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar do  $NAD^+/NADH$  (6,22 L/mol por largura da cubeta de 1,0 cm),  $V$  foi o volume do extrato celular utilizado no ensaio. A unidade da atividade de álcool desidrogenase foi expressa em  $\mu M$  de acetaldeído formado por minuto.

A atividade específica da enzima álcool desidrogenase foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Atividade da enzima álcool desidrogenase / concentração de proteína

A *concentração de proteína* foi calculada conforme o item 3.10.2. . A unidade da atividade de álcool desidrogenase foi expressa em  $\mu\text{M}$  de acetaldeído formado por minuto (U) por miligrama de proteína celular.

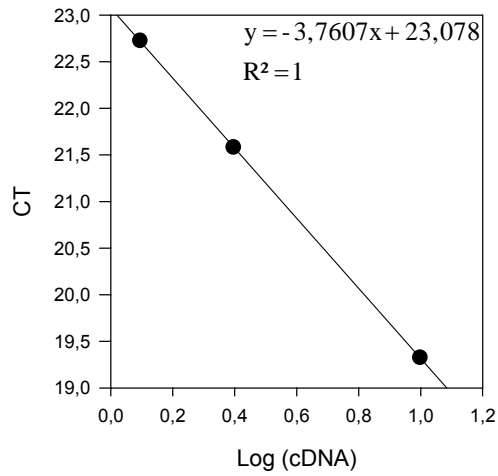
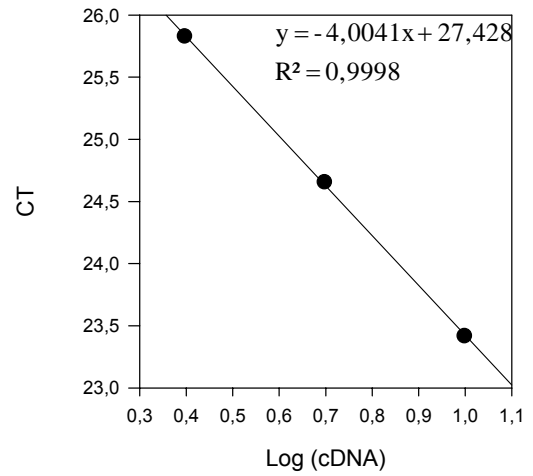
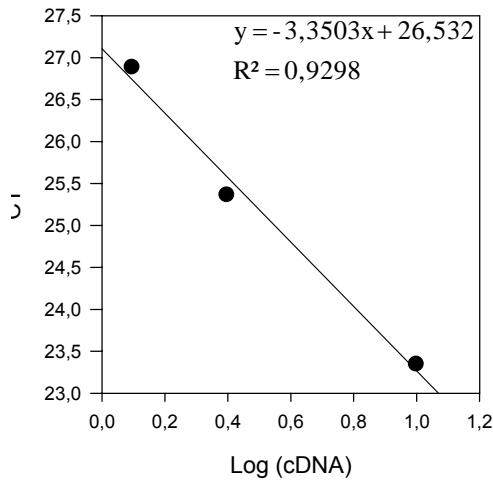
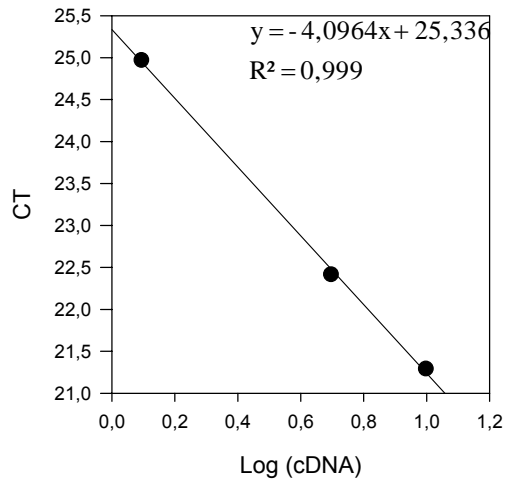
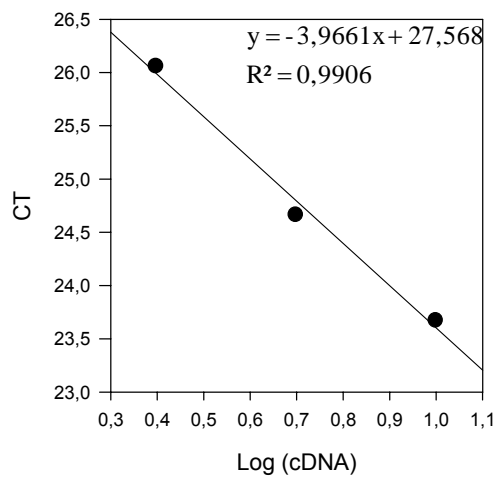
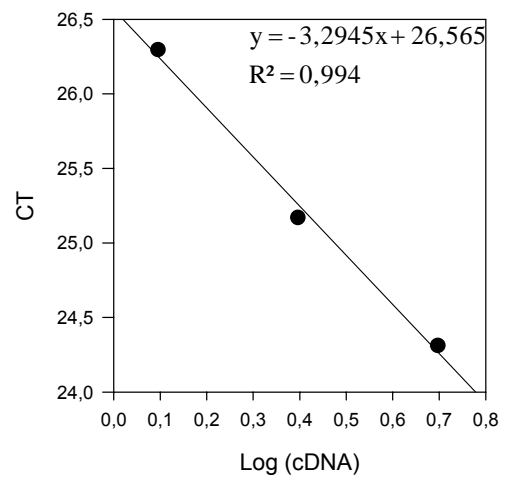
**A.****D.****B.****E.****C.****F.**

Figura 8A: Curva padrão da eficiência dos primers de *K. marxianus* para o PCR em Tempo Real. Foram analisados os primers dos genes : ACT1 (A), GAL1 (B), GAL7 (C), GAL10 (D), LAC4 (E) e RAG6 (F).

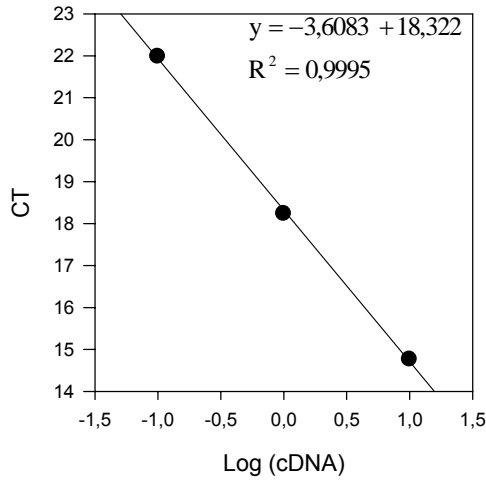
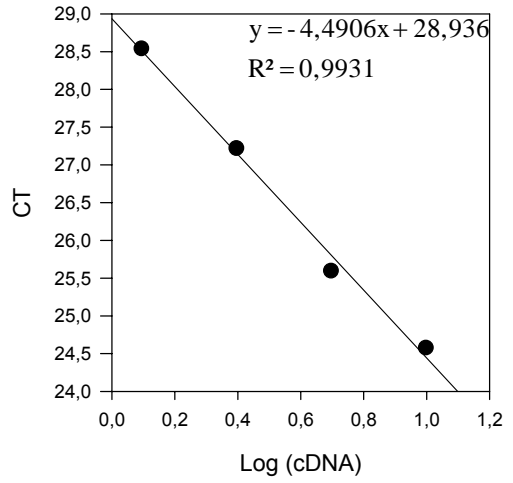
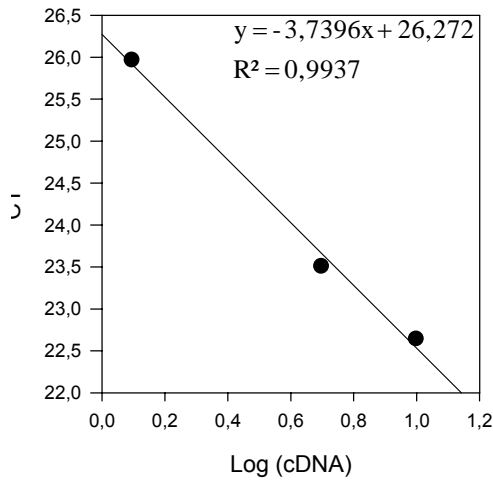
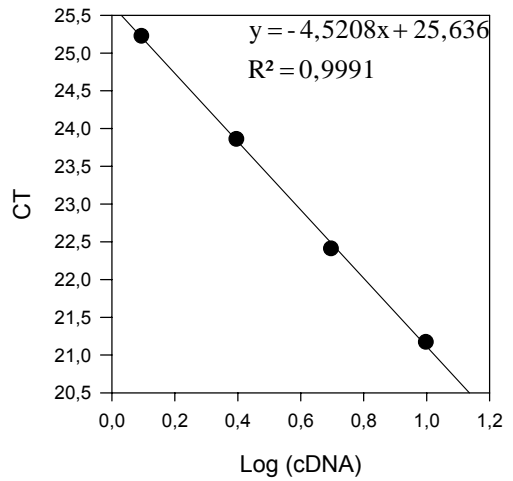
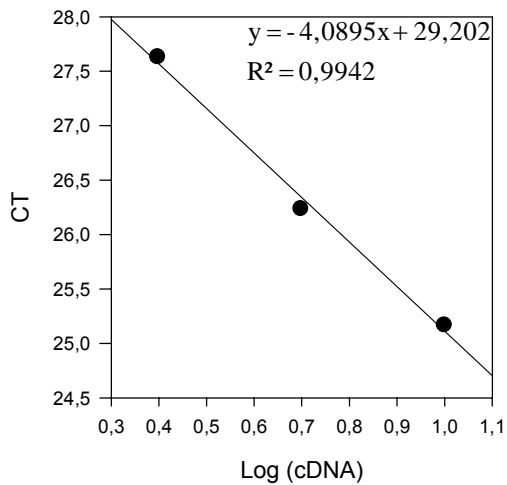
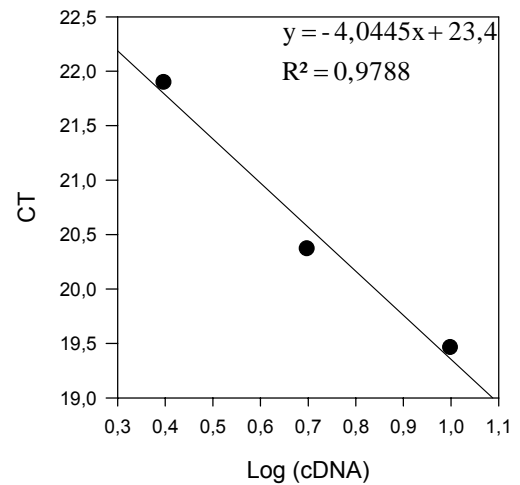
**A.****D.****B.****E.****C.****F.**

Figura 9A: Curva padrão da eficiência dos primers de *K. lactis* JA6 para o PCR em Tempo Real. Foram analisados os primers dos genes : ACT1 (A), GAL1 (B), GAL7 (C), GAL10 (D), LAC4 (E) e RAG6 (F).