


CLÁUDIA HELENA DE MAGALHÃES

BIBLIOTECA CENTRAL
- U F V -
134.612
21/08/97 #

DOAÇÃO

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE SORO DE QUEIJO POR
Klebsiella oxytoca M5A1, RECOMBINANTE P2

UFV	BIBLIOTECA	BBT	RG000770572
	CLASSIFICAÇÃO	T 663.13 / M188f / 1997	
TÍTULO Fermentação alcoólica de soro de queijo por			
			
134612		BBT	

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

T
663.13
M188f
1997
EX. 2

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
MAIO - 1997

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M188f
1997

Magalhães, Cláudia Helena de, 1966-
Fermentação alcoólica de soro de queijo por *Klebsiella*
oxytoca M5A1, recombinante P2. / Cláudia Helena de Ma-
galhães. - Viçosa : UFV, 1997.
40p. : il.

Orientador: Walter Vieira Guimarães
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Soro de queijo - Fermentação alcoólica. 2. *Klebsiella*
oxytoca P2 - Atividade enzimática. 3. Beta-galactosidase.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD. 19.ed. 663.13

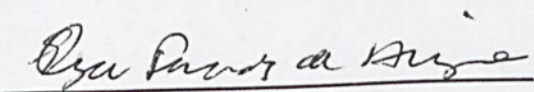
CDD. 20.ed. 663.13

CLÁUDIA HELENA DE MAGALHÃES

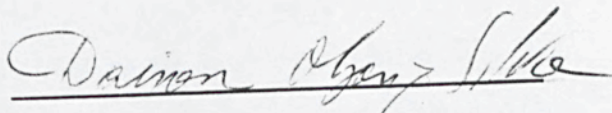
**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE SORO DE QUEIJO POR
Klebsiella oxytoca M5A1, RECOMBINANTE P2**

Tese apresentada à Universidade Federal de Vicosa, como parte das exigências do curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

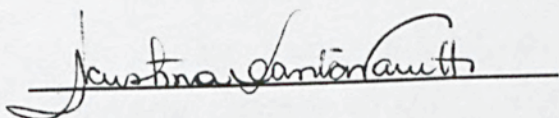
APROVADA: 25 de março de 1997.



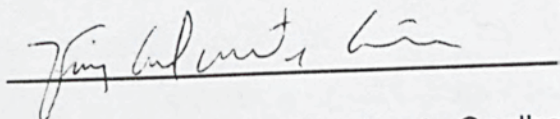
Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Conselheiro)



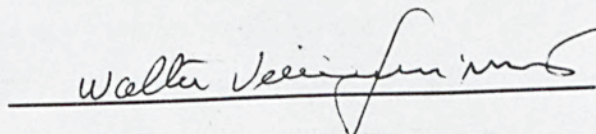
Prof. Daison Olzany Silva
(Conselheiro)



Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti



Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho



Prof. Walter Vieira Guimarães
(Orientador)

AGRADECIMENTO

A Universidade *Aos meus avós (in memoriam).* e à Coordenação de

Aperfeiçoamento de P. *Aos meus pais, Pedro e Maria José.* pela oportunidade de

realização deste curso e *Às minhas irmãs, Cátia e Christina.*

Ao professor e orientador Waller Vieira Guimarães, pela atenção, pelo incentivo, pela compreensão, pelos preciosos ensinamentos, pela acessibilidade e pela oportunidade de realizar o trabalho nesta área.

À professora Elza, pela dedicação, pelo entusiasmo, pelo incentivo, pela atenção e força de vontade, pelas valiosas sugestões e pela oportunidade de realizar o trabalho nesta área.

Ao professor Delson, por toda a sua ajuda, pelos ensinamentos, pelo estímulo, pela valiosa participação e pela orientação neste trabalho.

Aos professores Jorge e Cristina, pelo auxílio e pelas sugestões bastante oportunas.

Aos professoras Marisa, Flávia e Miliário, pela atenção e simpatia com que conduziram o curso de Microbiologia Geral.

Ao professor Frederico Passos, pela atenção e colaboração.

A todos os demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos conhecimentos adquiridos durante todo o curso.

Aos amigos Reginaldo, Ernão, Mera, Cândido, João, Galvão, Roberto, Sati, Severina (estatística), pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo e pela ajuda.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização deste curso e pelo auxílio.

Ao professor e orientador Walter Vieira Guimarães, pela atenção, pelo incentivo, pela compreensão, pelos preciosos ensinamentos, pela acessibilidade e pela oportunidade de realizar o trabalho nesta área.

À professora Elza, pela dedicação, pelo entusiasmo, pelo incentivo, pela atenção e força de vontade, pelas valiosas sugestões e pela oportunidade de realizar o trabalho nesta área.

Ao professor Daison, por toda a sua ajuda, pelos ensinamentos, pelo estímulo, pela valiosa participação e pela orientação neste trabalho.

Aos professores Jorge e Cristina, pelo auxílio e pelas sugestões bastante oportunas.

Aos professores Marisa, Flávia e Hilário, pela atenção e simpatia com que conduziram o curso de Microbiologia Geral.

Ao professor Frederico Passos, pela atenção e colaboração.

A todos os demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos conhecimentos adquiridos durante todo o curso.

Aos amigos Reginalda, Emílio, Mara, Cândido, João, Galvão, Roberto, Safi, Silvana (estatística), pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo e pela ajuda.

Ao Gervásio, pela amizade e valiosa colaboração neste trabalho.

À Marisa, Adriana e Francilina, pelo carinho, pela amizade e pelo companheirismo nas lutas e vitórias durante todo o curso.

À Tânia, por sua amizade, pelo incentivo e pela força

Ao Eustáquio, Maurício, Lili e Vera, pela ajuda e pela disponibilidade em transmitir seus conhecimentos e suas experiências.

A todos os amigos e companheiros do curso: Amarildo, Cristina Tostes, Luciana de Abreu, Toscano, Osvaldo, Éder, Andréa, Olinto, Alessandro, João, Leonardo, Gesiane, Samuel, Natália, todas as Patrícias, Jorge, Thaís, Roberta Pícole, Polidoro, Inês, Denise, Juliana, Cida, Simone, Noêmia e Ana Paula, que participaram de diferentes maneiras na execução deste trabalho.

Ao Marcelo Laia e Júpiter, pela calma com que atenderam aos meus freqüentes pedidos de auxílio na digitação deste trabalho.

Às amigas Socorro, Marivana, Alba e Alessandra, pelo apoio e pelos conselhos do dia-a-dia.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia: Nilcéia, Rita, Laura, José Reinaldo, José Carlos, Cesário, Danilo, Sr. Raimundo, Sr. Paulo, Arlindo e Evandro, pelos serviços prestados.

À minha família, pelo apoio e carinho constantes.

Por fim, mas em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ser verdadeiramente o nosso maior mestre.

BIOGRAFIA

CLÁUDIA HELENA DE MAGALHÃES, filha de Pedro Teotônio Magalhães e Maria José de Magalhães, nasceu em Campos do Jordão, São Paulo, no dia 27 de abril de 1966.

Em agosto de 1994, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Em agosto de 1994, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 25 de março de 1977.

3. MATERIAL E METODOS	11
3.1. Microrganismo utilizado	11
3.2. Preparo do inóculo para fermentações	11
3.3. Fermentação do soro de queijo por <i>Kluyveromyces fragilis</i> M5A1, recombinante P2	12
3.4. Fermentação do soro de queijo em diferentes pHs por <i>Kluyveromyces fragilis</i> M5A1, recombinante P2	13
3.5. Determinação da concentração de etanol	13
3.6. Análise da atividade enzimática	13
3.7. Temperatura ótima de produção e atividade da enzima β -D-galactosidase de <i>Kluyveromyces fragilis</i> M5A1, recombinante P2	14
3.8. Estabilidade térmica da enzima β -D-galactosidase de <i>Kluyveromyces fragilis</i> M5A1, recombinante P2	15
3.9. Determinação do pH ótimo de atividade de β -D-galactosidase de <i>Kluyveromyces fragilis</i> M5A1, recombinante P2	15
3.10. Representação catalítica da enzima β -D-galactosidase de <i>Kluyveromyces fragilis</i> M5A1, recombinante P2	16

3.1.1. Transporte do substrato em <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Fermentação de soro de queijo por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	17
4.2. Concentração de produção de β-D-galactosidase em <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2, e em <i>E. coli</i> K12, quando induzidas com IPTG	20
4.3. Temperatura ótima de produção de β-D-galactosidase por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	21
4.4. Influência da temperatura na atividade e estabilidade de β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	22
4.5. Influência do pH na atividade de β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	24
4.6. Repressão da produção da enzima β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	26
4.7. Transporte do substrato em <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	26
EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Microrganismo utilizado	11
3.2. Preparo do inóculo para fermentações	11
3.3. Fermentação do soro de queijo por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	12
3.4. Fermentação do soro de queijo em diferentes pHs por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	13
3.5. Determinação da concentração de etanol	13
3.6. Análise da atividade enzimática	13
3.7. Temperatura ótima de produção e atividade da enzima β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	14
3.8. Estabilidade térmica da enzima β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	15
3.9. Determinação do pH ótimo de atividade de β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	15
3.10. Repressão catabólica da enzima β-D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	16

3.11. Transporte do substrato em <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Fermentação de soro de queijo por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	17
4.2. Comparação da produção de β -D-galactosidase em <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2, e em <i>E. coli</i> K12, quando induzidas com IPTG	20
4.3. Temperatura ótima de produção de β -D-galactosidase por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	21
4.4. Influência da temperatura na atividade e estabilidade de β -D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	22
4.5. Influência do pH na atividade de β -D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	24
4.6. Repressão da produção da enzima β -D-galactosidase de <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	26
4.7. Transporte do substrato em <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	27
4.8. Fermentação de soro de queijo por <i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1, recombinante P2	28
4.9. Fermentação de soro de queijo adicionado de extrato de levedura, a 0,5%, em diferentes valores de pH	31
5. RESUMO E CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

EXTRATO

MAGALHÃES, Cláudia Helena de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 1997. **Fermentação alcoólica de soro de queijo por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2.** Orientador: Walter Vieira Guimarães. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Daison Olzany Silva.

A produção de etanol a partir de soro de queijo suplementado com LB ou 0,5% de extrato de levedura por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2 (Kb.P2), em valores de pH controlado em 6,0; 6,5; 6,9; 7,0; e 7,3, apresentou baixo rendimento, o que indica ineficiência da estirpe Kb.P2 em utilizar a lactose do soro como substrato. A temperatura ótima para produção da enzima β -D-galactosidase foi 30°C. O pH e a temperatura de atividade ótima da enzima β -D-galactosidase foram 7,0 e 45°C, respectivamente. A enzima não apresentou estabilidade em temperatura superior a 35°C. Houve repressão catabólica da enzima, com a adição de glicose 10 minutos após a adição do indutor IPTG. A galactose adicionada em uma cultura paralela, no mesmo tempo, inibiu ligeiramente a produção da enzima. A β -D-galactosidase de Kb.P2 apresentou 37% de atividade em relação à *E. coli* K12, quando induzida com IPTG, indicando que Kb.P2 possui uma baixa expressão da enzima. As células rompidas com a prensa francesa ou as células permeabilizadas com tolueno apresentaram 1,3 vez mais atividade de β -D-galactosidase 30 minutos

após a adição do indutor, comparado a células induzidas e não tratadas, o que indica baixa eficiência na entrada do substrato nas células. Os resultados permitem evidenciar que a fermentação de soro de queijo por Kb.P2 depende, ainda, do conhecimento e da manipulação do sistema da bactéria, visando utilizar lactose.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Cláudia Helene de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 1997. Alcoholic fermentation of cheese whey by *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinant P2. Adviser: Walter Vieira Guimarães. Advisory Committee Members: Elza Fernandes de Araújo and Daison Olzany Silva.

The fermentation of cheese whey, supplemented with LB or 6.5% yeast extract, by ethanologenic *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinant P2 (Kb.P2), in media with the pH controlled at 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, and 7.2, resulted in low ethanol yield. These results indicated that Kb.P2 was not expressing the *Lac*-operon efficiently. The optimum temperature for β -D-galactosidase production was 30°C. The best pH and temperature for β -D-galactosidase activity were 7.0 and 45°C, respectively. However, enzyme stability was reduced at temperatures higher than 35°C. The addition of glucose repressed β -D-galactosidase more than the addition of galactose. When compared to *Escherichia coli* K12, β -D-galactosidase induction with IPTG in Kb.P2 corresponded to only 37% of the activity observed for K12. This result showed that the expression of *Lac*-operon genes was weak. Cultures induced for 30 min with IPTG, and then, treated in a French press of ethyltoluene had 1.3 times more β -D-galactosidase activity than induced cells that were not ruptured, showing significant transport of the substrate into the cells. The

ABSTRACT

MAGALHÃES, Cláudia Helena de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 1997. **Alcoholic fermentation of cheese whey by *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinant P2.** Adviser: Walter Vieira Guimarães. Advisory Committee Members: Elza Fernandes de Araújo and Daison Olzany Silva.

The fermentation of cheese whey, supplemented with LB or 0.5% yeast extract, by ethanologenic *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinant P2 (Kb.P2), in media with the pH controlled at 6.0; 6.5; 6.9; 7.0, and 7.3, resulted in low ethanol yield. These results indicated that Kb.P2 was not expressing the *Lac*-operon efficiently. The optimum temperature for β -D-galactosidase production was 30°C. The best pH and temperature for β -D-galactosidase activity were 7.0 and 45°C, respectively. However, enzyme stability was reduced at temperatures higher than 35°C. The addition of glucose repressed β -D-galactosidase more than the addition of galactose. When compared to *Escherichia coli* K12, β -D-galactosidase induction with IPTG in Kb.P2 corresponded to only 37% of the activity observed for K12. This result showed that the expression of *Lac*-operon genes was weak. Cultures induced for 30 min with IPTG, and, then, treated in a French press or with toluene had 1.3 times more β -D-galactosidase activity than induced cells that were not ruptured, showing inefficient transport of the substrate into the cells. The

possibility of Kb.P2 use for cheese whey fermentation depends on a better understanding of *Lac*-operon.

1. INTRODUÇÃO

O soro é um subproduto do processamento de queijo, caseína e outros produtos do leite acidificado, possuindo parte das proteínas do leite, a maioria das vitaminas hidrossolúveis, lactose e alguns sais minerais. A produção do soro depende, principalmente, da manufatura e do tipo de queijo envolvido. Aproximadamente 75 a 85% do volume do leite destinado à fabricação de queijos é convertido em soro.

A produção de soro de queijo, no Brasil, é estimada em 3 milhões de toneladas/ano. O soro, do ponto de vista biológico, é um dos resíduos mais poluentes, apresentando uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 40.000 e 60.000 ppm. Como o soro é normalmente descartado nos cursos d'água, ele causa sérios problemas de poluição ambiental.

A utilização do soro "in natura" na alimentação de animais está limitada tanto por seu baixo conteúdo proteico como por seu elevado teor de lactose, que tem efeito laxativo sobre os animais.

Os processos de utilização do soro, com base na fermentação por microrganismos como *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., *Lactococcus* spp. etc., têm sido estudados. Entretanto, a produção de etanol não tem sido eficiente por diversas razões, como baixa taxa de conversão, baixa resistência dos organismos à concentração de etanol e açúcares, entre outras.

1. INTRODUÇÃO

O soro é um subproduto do processamento de queijo, caseína e outros produtos do leite acidificado, possuindo parte das proteínas do leite, a maioria das vitaminas hidrossolúveis, lactose e alguns sais minerais. A produção do soro depende, principalmente, da manufatura e do tipo de queijo envolvido. Aproximadamente 78 a 85% do volume do leite destinado à fabricação de queijos é convertido em soro.

A produção de soro de queijo, no Brasil, é estimada em 3 milhões de toneladas/ano. O soro, do ponto de vista biológico, é um dos resíduos mais poluentes, apresentando uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 40.000 e 60.000 ppm. Como o soro é normalmente descartado nos cursos d'água, ele causa sérios problemas de poluição ambiental.

A utilização do soro "in natura" na alimentação de animais está limitada tanto por seu baixo conteúdo protéico como por seu elevado teor de lactose, que tem efeito laxativo sobre os animais.

Os processos de utilização do soro, com base na fermentação por microrganismos como *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., *Lactobacillus* spp. etc., têm sido estudados. Entretanto, a produção de etanol não tem sido eficiente por diversas razões, como baixa taxa de conversão, baixa resistência dos organismos à concentração de etanol e açúcares, entre outras.

Pelo uso das metodologias de DNA recombinante, foi possível clonar os genes de *Zymomonas mobilis* que codificam as enzimas de produção do etanol, em bactérias que utilizam uma diversidade de açúcares, obtendo-se as bactérias etanologênicas. Foram obtidos recombinantes etanologênicos para *Escherichia coli*, Kb.P2, *Erwinia* sp., entre outros. Os estudos de fermentações, utilizando *E. coli* recombinante, mostraram que a eficiência de conversão de açúcares como glicose, xilose, celobiose em etanol foi elevada, em alguns casos chegando a 100%. Resultados semelhantes foram observados com a bactéria Kb.P2, na fermentação desses açúcares.

De acordo com a literatura, a bactéria Kb.P2 utiliza a lactose como única fonte de carbono. Considerando que o soro de queijo contém entre 4 e 5% de lactose e que ele é um subproduto da indústria de laticínios, objetivou-se estudar a fermentação do soro de queijo por Kb.P2, visando a produção de etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O soro é um subproduto do processamento de queijo, caseína ou outros produtos do leite acidificado (KOSIKOWSKI e WZOREK, 1977). Constitui cerca de 85 a 90% do volume de leite transformado em queijo e retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, incluindo proteínas, lactose, sais minerais e vitaminas. Contém, também, nitrogênio insolúvel e quantidades variáveis de ácido láctico.

O soro originado da produção de queijo processado é doce, possuindo pH entre 5,9 e 6,3; já o soro ácido é obtido de queijo fresco e contém maiores teores de ácido láctico, cálcio, fósforo e lactose, apresentando pH 4,4 e 4,6.

Quando o soro de queijo, rico em nutrientes, é descartado diretamente no meio ambiente, pode causar sérios problemas de poluição. Segundo BEN-HASSAN e GHALY (1994), o soro de queijo possui uma demanda bioquímica de oxigênio que pode variar de 40.000 a 60.000 ppm. A lactose é o principal componente, sendo responsável por 80% da poluição causada pelo soro, contra 20% da fração protéica (FERRAT, 1980). Segundo WOYCHICK et al. (1979), dois terços do soro de queijo produzido no mundo são descartados sem qualquer tratamento. No Brasil, o aproveitamento do soro está aquém do desejado. A produção de 15 milhões de toneladas de leite, em 1992, resultou na produção de 3 milhões de toneladas de soro (BEN-HASSAN e GHALY, 1994).

O descarte contínuo de soro de queijo sobre o solo pode mudar sua composição física e química. O nitrogênio do soro de queijo é solúvel em água, e quando lançado ao solo apresenta o risco de contaminar a água do solo, tornando-se uma ameaça à saúde humana e animal (Marwaha et al., 1984; Sinkiewicz et al., 1986; Ghaly et al., 1988; Jones, 1974, citados por BEN-HASSAN e GHALY, 1994).

Os sistemas biológicos podem ser usados para o tratamento de resíduos orgânicos, sendo capazes de reduzir os níveis de poluentes. Entretanto, um dos métodos mais comumente usados, o sistema de lodo ativado, não é recomendado para o soro de queijo, em razão da grande quantidade de energia requerida para aeração, o que aumenta muito os custos (CEREDA et al., 1986).

Um dos principais problemas de utilização do soro provém do seu alto conteúdo de água (94% de água) (JUENGST, 1979). A ultrafiltração é o processo mais usado para obtenção do concentrado protéico de soro solúvel (ZALL, 1984). Este processo consiste na extração das proteínas do soro na forma hidrossolúvel, por meio de bombeamento do soro, sob alta pressão, através de uma membrana. Os poros da membrana permitem a passagem de moléculas menores, como a água, a lactose e os sais, e impedem a passagem de moléculas maiores, como as proteínas. As moléculas menores vão constituir o permeado, ou ultrafiltrado, ao passo que as maiores vão constituir o resíduo (ZEIKUS, 1986). Os concentrados protéicos em pó, obtidos a partir de ultrafiltração do soro de queijo, têm um considerável custo, por ser a ultrafiltração uma operação que exige alto consumo de energia, sendo, portanto, uma solução pouco econômica (BARFORD et al., 1986).

Segundo COLOMBAM et al. (1993), a limitação quanto ao uso do processo de ultrafiltração é a obtenção de elevado volume do permeado, que é constituído de água, lactose e minerais, apresentando uma carga poluidora bastante alta, semelhante à do soro de queijo.

O uso de processos fermentativos como uma solução para o aproveitamento do soro de queijo tem merecido a atenção dos pesquisadores. Vários processos têm sido propostos, com base na fermentação por microrganismos como *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., *Lactobacillus* spp.

etc. (JANSSENS et al., 1984). Entretanto, a taxa de fermentação de lactose por *Kluyveromyces fragilis* é reduzida em concentrações de açúcar acima de 2% e pelo acúmulo de etanol (BOTHAST et al., 1985; HAHN-HÄGERDAL, 1985; VIENNE e STOCKAR, 1985), uma vez que *Kluyveromyces* spp. é altamente sensível ao etanol (GAWEL e KOSIKOWSKI, 1978; MOULIN et al., 1980).

Zymomonas mobilis é uma bactéria gram-negativa, com potencial para produção comercial de etanol, e é geralmente reconhecida como superior às leveduras, por causa da eficiência de conversão de glicose e a produtividade de etanol (SWINGS e DELEY, 1977; ROGERS et al., 1982). Entretanto, as maiores limitações no seu uso incluem a pouca quantidade de substratos que podem ser fermentados (glicose, frutose e sacarose).

Por meio de manipulação genética, foi verificada a possibilidade de ampliar os substratos utilizados por *Z. mobilis*. O operon da lactose foi introduzido nesse organismo, utilizando o plasmídeo pGC9114. Este plasmídeo é derivado de RP1, que contém genes que conferem resistência a vários antibióticos e carrega um transposon lactose. A presença do plasmídeo pGC9114 contendo o operon *lac* em *Z. mobilis* (estirpe designada L14) foi confirmada em placas X-gal, indicando a produção de β -D-galactosidase. Foram obtidas transferências secundárias de pGC9114 de *Z. mobilis* L14 para *E. coli* JC3272, e detectada resistência à tetraciclina e fenótipo lactose positivo, em uma frequência de 10^{-6} por célula receptora. Embora tenha sido inserido um operon *lac* funcional em *Z. mobilis*, a estirpe L14 não cresceu em meio que continha somente lactose como fonte de carbono, provavelmente em virtude da expressão insuficiente do operon *lac*. O nível de atividade enzimática obtido por *Z. mobilis* L14 foi somente 1/12 do obtido por *E. coli* JC3272 (PGC914) durante o crescimento em lactose (CAREY et al., 1983).

Estudos recentes têm associado as características fermentativas de *Z. mobilis* com a capacidade de utilização de diferentes substratos pelas bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*, entre outras. Os genes envolvidos na via fermentativa de produção de etanol de *Z. mobilis* já foram clonados em *E. coli* e *K. oxytoca* (INGRAM et al., 1987; INGRAM e CONWAY, 1988; LAW Ford e ROUSSEAU, 1991; OHTA et al., 1991a,b).

BRAU e SAHNM (1986) descreveram a clonagem do gene do piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* e observaram alto nível de expressão deste gene em *E. coli*. Entretanto, o desvio metabólico de piruvato a etanol não foi completo. Uma concentração mais elevada de produção de etanol foi alcançada em mutantes de *E. coli*, que superproduziram a enzima álcool desidrogenase, em comparação aos recombinantes que continham somente piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*.

Estudos preliminares indicaram que a lactose e vários outros açúcares são eficientemente convertidos para etanol, por linhagens recombinantes de *E. coli*, que contêm os genes *pdh* e *adhB*, clonados em plasmídeo. *Escherichia coli* B, ATCC 11303 (pLOI 297), produziu 39 g/L de etanol em 120 horas de fermentação, utilizando 80 g de xilose por litro de LB (ALTERTHUM e INGRAM, 1989).

Um operon artificial que continha os genes da via fermentativa do piruvato a etanol, *pdh* e *adhB*, denominado Pet operon, foi integrado na região do gene que codifica a enzima piruvato formato liase do cromossoma de *E. coli*. O gene *pfl* foi selecionado para ser o sítio de integração, por duas razões: o gene *pfl* é bem caracterizado, tendo sido clonado e seqüenciado (RODEL et al., 1988); e a enzima PFL é responsável pela transformação do piruvato em ácido fórmico, diminuindo a possibilidade de produção de etanol. A integração conferiu a estabilidade dos genes de *Z. mobilis* em *E. coli*. Recombinantes que contêm o Pet operon apresentam um desvio metabólico que favorece a formação de acetaldeído e a sua conversão a etanol, como produto dominante da fermentação. Com o desenvolvimento do recombinante *E. coli* B, ATCC 11303, linhagem KO11, a concentração de etanol obtida a partir da fermentação de 10% de glicose e 8% de xilose foi 54,4 e 41,6 g/L, respectivamente (OHTA et al., 1991a).

OHTA et al. (1991b) redirecionaram o metabolismo de *Klebsiella oxytoca* para produção de etanol, a partir de açúcares. O plasmídeo que continha os genes *adhB*, *pdh* e *cat*, originados do plasmídeo pLOI510, foi transformado em *Klebsiella oxytoca*, com seleção para resistência ao cloranfenicol (OHTA et al., 1991b). O melhor recombinante, M5A1 (pLOI555), fermentou xilose a etanol mais eficientemente que o recombinante *E. coli*,

estudado anteriormente (OHTA et al., 1991a). A produtividade volumétrica máxima (2,1 g de etanol por litro/hora) é quase duas vezes à obtida com *E. coli* recombinante original e mantém similaridades na eficiência e concentração final de etanol. Diferente de *E. coli*, *K. oxytoca* M5A1 (pLOI555) fermenta xilose e glicose em taxas equivalentes (OHTA et al., 1991b). Sendo a proporção de substratos para M5A1 equivalente para proporção requerida por *E. coli*, M5A1 oferece vantagens para a produção de etanol.

Recentemente, foi desenvolvido o recombinante *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, Kb.P2 (WOOD e INGRAM, 1992). Semelhante à *E. coli*, o Pet operon que contém os genes *adhB*, *pdc* de *Z. mobilis* e *pfl* (piruvato formato liase) foi usado para promover a recombinação homóloga com o gene *pfl* do cromossoma de *K. oxytoca* (WOOD e INGRAM, 1992). O gene *pfl*, que codifica a enzima piruvato formato liase, foi selecionado como sítio de integração com o objetivo de promover sua inativação, uma vez que essa enzima é responsável pela transformação de piruvato em ácido fórmico, diminuindo o rendimento alcoólico. De acordo com INGRAM (1990), as cópias de genes integrados no cromossomo hospedeiro possuem a vantagem de ser mais estáveis que os recombinantes que contêm plasmídeos multicópias, constituindo replicons independentes.

A integração dos genes do Pet operon no cromossoma bacteriano facilita a inclusão de outros plasmídeos, codificando genes heterólogos e possibilitando a síntese de novas enzimas importantes para uma fermentação mais eficiente. O microrganismo Kb.P2 é capaz de transportar e metabolizar celobiose e celotriose, mas não celulose. A introdução de plasmídeos codificando endoglucanases de *Clostridium thermocellum* resultou em acúmulo intracelular dessas enzimas termoestáveis, como co-produtos junto com etanol. Esse organismo pode converter celulose a etanol, reduzindo o requerimento para celulasas comerciais durante a fermentação (WOOD e INGRAM, 1992).

De acordo com a literatura *K. oxytoca* cresce em lactose, apresentando, portanto, um fenótipo lactose positivo (ORSKOV, 1984). O passo inicial no metabolismo da lactose é sua hidrólise enzimática nos constituintes galactose e glicose, promovida pela β -D-galactosidase. A atividade de β -D-galactosidase é amplamente distribuída na natureza,

ocorrendo em microrganismos, plantas e animais (MUSTRANTA et al., 1979).

A formação da enzima induzida pode ser estudada, seguindo-se a síntese de β -D-galactosidase em resposta a certos indutores. Vários organismos, como *E. coli* (JACOB e MONOD, 1961) e *Kluyveromyces fragilis* (NUNES et al., 1993), têm sido investigados neste sentido. A enzima β -D-galactosidase tem sido o modelo preferido para a investigação do mecanismo de síntese de proteína e controle genético (MILLER, 1974).

Substratos como a lactose, cuja introdução no meio de crescimento resulta na indução do aparecimento de uma ou mais enzimas, são conhecidos como indutores, e essas enzimas são chamadas indutivas. Quando um substrato adequado é adicionado, a atividade enzimática aparece muito rapidamente. Se o substrato é removido do meio, a síntese da enzima é rapidamente bloqueada. Normalmente utiliza-se, em estudos de indução, um análogo da lactose como indutor, o isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), que age como indutor, mas não como substrato para β -D-galactosidase, caracterizando-se um indutor gratuito. Após adição do indutor, o complexo repressor-operador dissocia e vários mRNA são transcritos e traduzidos em monômeros de β -D-galactosidase, os quais são montados em oligômeros ativos (MILLER, 1974; HUBER et al., 1994).

Outras enzimas são induzidas juntamente com β -D-galactosidase, como a permease, que é uma enzima envolvida com o transporte de lactose. O transporte de todos os nutrientes é controlado por permeases específicas. A enzima permease pode ser induzida pela presença de lactose no meio ou de outros galactosídeos, como melibiose, metil- α -D-galactosídeos ou propil- α -D-galactosídeo. O mecanismo pelo qual permeases bacterianas interagem com seus substratos é pouco entendido (COHEN e MONOD, 1967).

Alguns organismos são fermentadores de lactose ativos, outros são fermentadores tardios e outros são incapazes de fermentar lactose.

LOWE (1962) estabeleceu que células que não fermentam lactose podem exibir um dos dois fenótipos: ausência de β -D-galactosidase, mas acumulam galactosídeos, não os metabolizando; ou possuem β -D-galactosidase, mas ausência de permease.

Os fermentadores de lactose tardios não possuem a enzima permease. As evidências sugerem que os fermentadores tardios metabolizam lactose, por possuírem a enzima β -D-galactosidase. Quando o microrganismo que contém somente β -D-galactosidase é inoculado em um meio com 1% de lactose, o tempo para fermentar a lactose é maior que quando as duas enzimas, β -D-galactosidase e permease, estão presentes. Os microrganismos presentes inicialmente no meio com lactose não possuem a enzima permease, e após um período de 48 horas produzem células mutantes, que possuem permease (LOWE, 1962).

REEVE e BRAITHWAITE (1973) descreveram um grupo de *Klebsiella* com elevada expressão de β -D-galactosidase (*K. aerogenes* A3, *K. aerogenes* K.1.9, *K. aerogenes* K102, *Citrobacter ballerupensis* NCTC 7824, *K. aerogenes* NCIB, *K. aerogenes* NCIB 8793, *K. aerogenes* V9A) e outro com baixa expressão *K. aerogenes* A1, *K. pneumoniae* D8, *K. aerogenes* K122, *K. edwardsii* var. *edwardsii* 7242, *K. aerogenes* 8017, *K. aerogenes* 8595). Embora as razões dessa diferença não sejam conhecidas, tenta-se explicar a maior expressão da β -D-galactosidase pela presença de plasmídeos nas células, contendo os genes correspondentes que estariam presentes em maior número de cópias.

Em uma estirpe selvagem de *Klebsiella aerogenes* (V9A), contendo o plasmídeo F_{κ}/lac , quando plaqueada em ágar MacConkey, foram observados três tipos de fenótipo: o selvagem (ML^+) e os mutantes (ML^- e $ML^{+/}$). O tipo $ML^{+/}$ apresenta menor nível enzimático em células induzidas ou não-induzidas, comparado a células ML^+ e as células ML^- possuem menor nível enzimático do que as células $ML^{+/}$. Entretanto, os três tipos de fenótipo apresentaram baixa atividade de β -D-galactosidase, quando comparados a *E. coli* K12. É interessante notar que células $ML^{+/}$ derivadas de células ML^- apresentam o mesmo resultado de análise enzimática de células $ML^{+/}$ derivadas de células ML^+ , o que sugere que clones $ML^{+/}$ originados de célula ML^+ ou célula ML^- são todos resultantes da mesma mudança genética. As células de cada um dos três fenótipos (+, +/- e -) podem sofrer mutações, produzindo outros dois fenótipos. Evidências genéticas incompletas sugerem que a mutação ML^- é o

resultado de uma mudança reversível no plasmídeo $F_{k/lac}$ (REEVE e BRAITHWAITE, 1972). As características quanto ao fenótipo lactose ainda não foram definidas em Kb.P2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos do Departamento de Microbiologia, situado no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (UFVJ), Minas Gerais.

3.1. Microorganismo utilizado

Os experimentos foram conduzidos utilizando a bactéria-recombinante *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, denominada de Kb.P2, contendo os genes do *Zymomonas mobilis* genes de descarboxilase (*cdc*) e álcool desidrogenase (*adhB*), integrado ao plasmídeo (DITTA et al., 1981b).

A cultura estoque foi mantida em glicerol a -20°C e as culturas para uso diário, em ágar-LS (LURIA e CASPARY, 1958), seletivo, contendo por litro: 20 g de lactose, 10 g de lactose, 5 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio e 40 mg de cloranfenicol.

3.2. Preparo do inóculo para fermentações

A cultura foi ativada em 2 ml de caldo LB, adicionando 2% de lactose e 40 µg/ml de cloranfenicol e incubada a 37°C por 12 a 18 horas. As células

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, situado no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

3.1. Microrganismo utilizado

Os experimentos foram conduzidos, utilizando a bactéria recombinante *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, denominada de Kb.P2, contendo os genes de *Zymomonas mobilis* piruvato descarboxilase (*pdh*) e álcool desidrogenase (*adhB*), integrado no cromossomo (OHTA et al., 1991b).

A cultura estoque foi mantida em glicerol a -80°C e as culturas para uso diário, em ágar-LB (LURIA e DELBRUCK, 1943), suplementado, contendo por litro: 20 g de lactose, 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio e 40 mg de cloranfenicol.

3.2. Preparo do inóculo para fermentações

A cultura foi ativada em 3 mL de caldo LB, contendo 2% de lactose e 40 µg/mL de cloranfenicol, e incubadas a 30°C, por 12 a 18 horas. As células

foram transferidas, com o auxílio de alça de platina, para placas que continham ágar-LB acrescido de 2% de lactose e cloranfenicol 40 µg/mL. Após incubação a 30°C, por 16 a 18 horas, as células de uma colônia isolada foram inoculadas em frascos de 500 mL, contendo 200 mL de caldo LB com 20 g/L de lactose. As culturas foram incubadas a 30°C, por 24 horas, com agitação. As células foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 g, por 10 minutos, ressuspensas em 10 mL de soro de queijo ou soro de queijo suplementado e usadas para inocular o substrato de fermentação, de modo a obter 1.0 D.O. final a 550 nm (WOOD e INGRAM,1992).

3.3. Fermentação do soro de queijo por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

O soro foi autoclavado a 110°C, por 15 minutos, e deixado em repouso por 14 a 16 horas sobre a bancada, para decantar as proteínas precipitadas pelo processo de autoclavagem. O sobrenadante foi recolhido e guardado, para experimentos posteriores.

Os experimentos foram conduzidos em frascos de 500 mL, contendo um volume de 250 mL de soro de queijo ou soro de queijo suplementado com meio LB ou 0,5% de extrato de levedura. O soro de queijo foi autoclavado. Uma solução de KOH 2N foi usada para controlar o pH. Todas as fermentações foram efetuadas a 30°C, por 96 horas, e mantidas sob agitação constante, de 100 rpm.

As amostras de 1 mL foram coletadas durante a fermentação, nos tempos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 84 e 96 horas. Após determinar a D.O. a 550 nm, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 5 minutos, para sedimentação das células. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -18°C, para posterior determinação do teor de etanol.

3.4. Fermentação do soro de queijo em diferentes pHs por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

Foram feitas fermentações de soro de queijo adicionado de 0,5% de extrato de levedura, com pH controlado em 6,3; 6,5; 6,9 e 7,3. Os experimentos foram conduzidos conforme o procedimento descrito no item 3.3.

3.5. Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada, utilizando um cromatógrafo a gás HP 5890, coluna Hp Wax de 25m x 0,20mm x 0,20µm. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram 40°C, 250°C e 280°C, respectivamente. O isopropanol foi utilizado como padrão interno.

Foi utilizado o “software” chemstation (série DOS), para calcular a porcentagem de etanol.

Em função do valor teórico de etanol possível de ser obtido por conversão total do açúcar, calcularam-se os rendimentos, de acordo com a seguinte expressão:

$$R(\%) = \frac{\text{etanol obtido (g/L)} \times 100}{\text{etanol esperado (g/L)}}$$

A quantidade de etanol esperado foi calculada, considerando que 1 g de lactose produz 0,54 g de etanol.

3.6. Análise da atividade enzimática

A atividade de β-D-galactosidase foi determinada em células de Kb.P2 e em células de *E.coli* K12. As culturas foram crescidas em meio mínimo, contendo por litro: 5 g de NH₄Cl, 1 g de NH₄NO₃, 2 g de Na₂SO₄, 3 g de K₂HPO₄, 1 g de KH₂PO₄ e 0,1 g de MgSO₄·7H₂O, adicionado de 0,025% de peptona, 0,0025% de extrato de levedura e 1% de succinato de sódio. Foi

adicionado tween ao meio de crescimento de Kb.P2, em uma concentração final de 0,5%, para separar os grumos formados pelas células. A cultura de Kb.P2 foi incubada a 30°C e *E.coli*, a 37°C. Ao atingir a fase logarítmica de crescimento, as células foram centrifugadas a 12.000 g, por 5 minutos, para sedimentação das células. Após as células terem sido ressuspensas em meio mínimo suplementado, a solução do indutor isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionada à concentração final de 0,05 mM, por 15 minutos. Um total de 1mL da amostra de células tratadas com uma gota de tolueno, ou células rompidas na prensa francesa com uma pressão interna de 2.000 psi (KIN020, versão 5.0-SLM AMINCO) ou células sem tratamento, foi adicionado em 3 mL de tampão, contendo por litro: 16,1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g de KCL 0,246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mL de β -mercaptoetanol, pH 7,0 (tampão Z) (MILLER, 1974).

As células permeabilizadas com tolueno foram incubadas a 33°C, por 2 horas, para evaporação do tolueno. O substrato O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, na concentração de 0,01 M, foi misturado ao extrato enzimático, às células permeabilizadas com tolueno e às células não-tratadas e incubados a 28°C, durante 15 minutos. A quantidade de O-nitrofenol liberado foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm. As reações foram interrompidas pela adição de 1 mL de carbonato de sódio 1M.

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para hidrolisar 1 nmol de substrato por minuto/célula, a 28°C.

Para determinação do número de células, foi usado o método da microgota (POSTGATE, 1969). Após incubação de Kb.P2 e *E.coli*, a 30 e 37°C, respectivamente, por 18 horas, as colônias foram contadas.

3.7. Temperatura ótima de produção e atividade da enzima β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

A temperatura ótima de produção da enzima foi determinada ao incubar as células nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C, sendo estas induzidas com IPTG, em uma concentração final de 0,05 mM. Após 15 minutos

de adição do indutor, as células foram permeabilizadas com tolueno e o substrato foi adicionado, para determinação da atividade enzimática, conforme o procedimento descrito no item 3.6.

A temperatura de atividade máxima da enzima β -D-galactosidase foi determinada ao induzir a cultura de células com IPTG, em uma concentração final de 0,05 mM. Após 15 minutos de adição do indutor, as células foram permeabilizadas com tolueno e incubadas na presença do substrato O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo e tampão Z, nas temperaturas de 15, 25, 30, 35, 40, 45 e 60°C. Após 15 minutos de incubação, foram feitas leituras no espectrofotômetro, a 420 nm.

3.8. Estabilidade térmica da enzima β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima produzida por Kb.P2 foi determinado ao incubar 1 mL da cultura (previamente induzida com 0,05mM de IPTG, durante 15 minutos, e permeabilizada com tolueno) na ausência de substrato, nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C. Após 1 hora, o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo foi adicionado. Após 15 minutos de reação a 45°C, adicionou-se 1 mL de carbonato de sódio 1 M, e foram feitas leituras a 420 nm.

3.9. Determinação do pH ótimo de atividade de β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

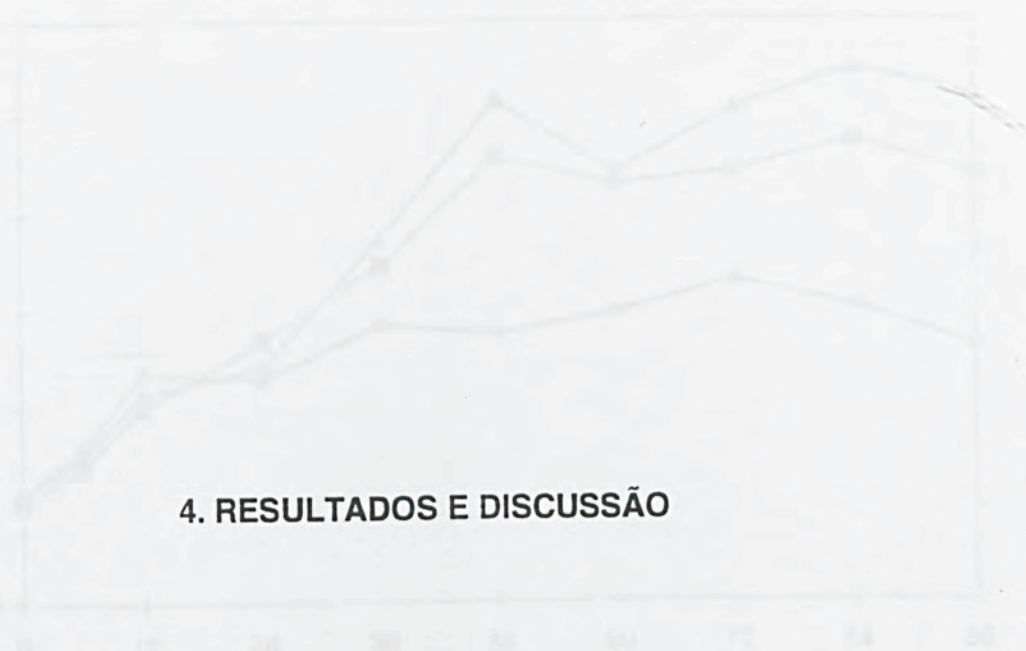
O pH ótimo de atividade de β -D-galactosidase de Kb.P2 foi determinado ao adicionar 1 mL da cultura, induzida previamente com IPTG 0,05 mM, durante 15 minutos, e permeabilizada com tolueno, em tampão Z, cujo pH foi ajustado com NaOH ou HCl 0,1 N. Foram testados os seguintes valores de pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; e 8,0. A análise de atividade enzimática foi efetuada como descrito no item 3.6.

3.10. Répressão catabólica da enzima β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

Foi analisado o efeito de glicose e galactose na produção da enzima β -D-galactosidase, de acordo com o seguinte procedimento: três culturas de Kb.P2 foram cultivadas em meio mínimo suplementado, colhidas em fase log e centrifugadas, para sedimentação das células. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio mínimo suplementado e incubadas a 30°C. Após 6 minutos, as células foram induzidas com IPTG, em uma concentração final de 0,05 mM. Aos 10 minutos de indução, foram efetuados os seguintes tratamentos: glicose ou galactose foi adicionada a duas das culturas induzidas, a uma concentração final de 1%. Uma das três culturas não continha galactose, nem glicose, somente IPTG. As amostras foram colhidas de 2 em 2 minutos, as células foram tratadas com tolueno e a enzima foi determinada de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.

3.11. Transporte do substrato em *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

O isopropil-tiogalactosídeo foi adicionado em uma concentração final de 0,05 mM à cultura de células em fase log. As amostras foram retiradas em diferentes tempos de indução de 0 a 30 minutos. As amostras foram divididas em três partes: a primeira cultura foi rompida com prensa francesa, com uma pressão interna de 2.000 psi; a segunda cultura foi permeabilizada ao adicionar uma gota de tolueno em 1 mL de células; e a terceira cultura permaneceu intacta. O procedimento para análise da atividade enzimática foi efetuado conforme o item 3.6.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fermentação de soro de queijo por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

Quando se compara o crescimento de Kb.P2 em soro de queijo com e sem suplementação, observa-se diferença em termos de crescimento celular (Figura 1). Após 24 horas de incubação, a suplementação com o meio LB ou extrato de levedura (E.L.) favoreceu o crescimento celular, comparado ao soro sem suplemento. Na suplementação do soro de queijo com meio LB, o crescimento celular foi ligeiramente superior ao suplementado com extrato de levedura. A concentração máxima de células no meio suplementado com LB foi quase duas vezes maior que no soro de queijo sem suplementação, o que evidencia que o soro de queijo é deficiente em nutrientes para crescimento dos microrganismos, principalmente pela indisponibilidade de nitrogênio. A produção de etanol por Kb.P2 em soro de queijo com e sem suplementação está ilustrada na Figura 2. A suplementação com meio LB ou E.L. favoreceu igualmente a produção de etanol, em relação ao soro de queijo não-suplementado. O rendimento máximo, após 96 horas, foi quase duas vezes maior que no caso do soro de queijo não-suplementado.

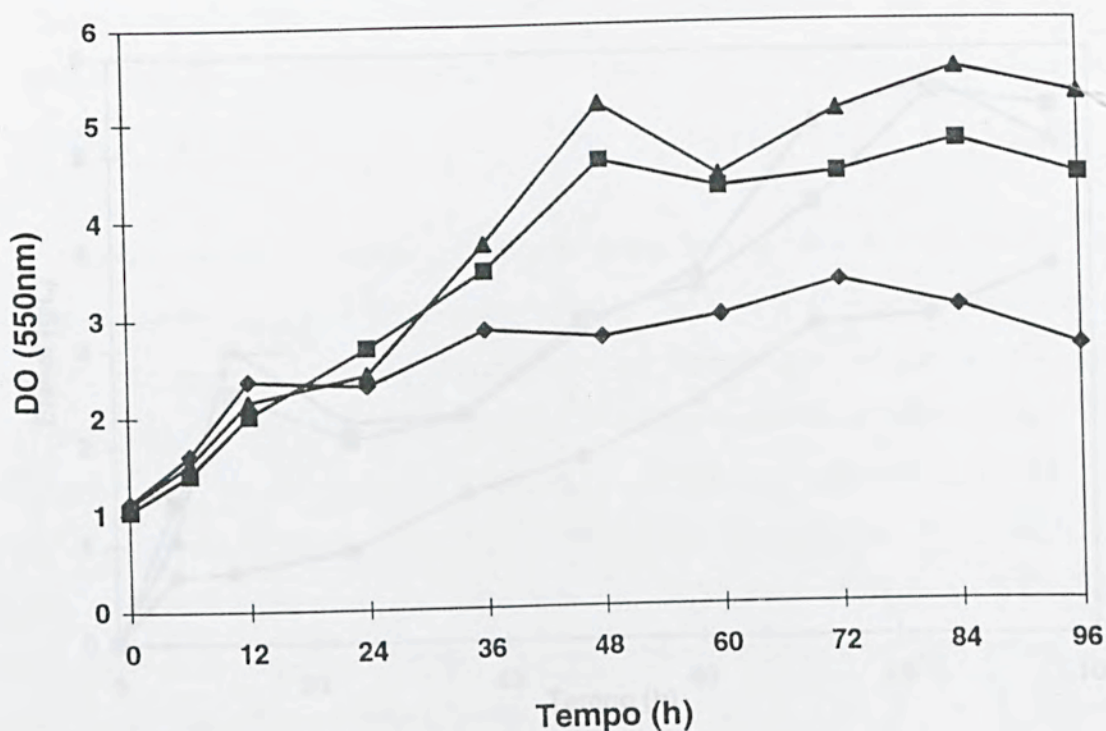


Figura 1 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, em soro de queijo -◆-, soro de queijo suplementado com 0,5% de extrato de levedura -■- e soro de queijo suplementado com LB -▲-, por 96 horas, a 30°C, com agitação de 100 rpm.

Tomando como base o valor citado por KOSIKOWSKI e WZOREK (1977), de que o soro de queijo contém aproximadamente 4,5% de lactose, foi calculado o rendimento teórico na fermentação, ressaltando-se que nos meios suplementados com LB ou E.L. o rendimento máximo foi de 20% e de apenas 14%, para o meio que continha apenas soro de queijo.

Em experimentos de fermentação em arabinose, xilose e glicose, utilizando Kb.P2, com pH controlado em 6,0, a 30°C, BOTHAST et al. (1994) obtiveram 66, 72 e 82% do rendimento de etanol, respectivamente. Em fermentações de soro de queijo suplementado com LB, *E. coli* KO11 apresentou taxa de conversão correspondente a 96% de etanol (LEITE, 1996), e a partir de soro sem suplemento, em 144 horas de fermentação, *E. coli* KO11 produziu 26,4 g/L de etanol, o que corresponde a 33,4% do rendimento teórico (GUIMARÃES et al., 1992).

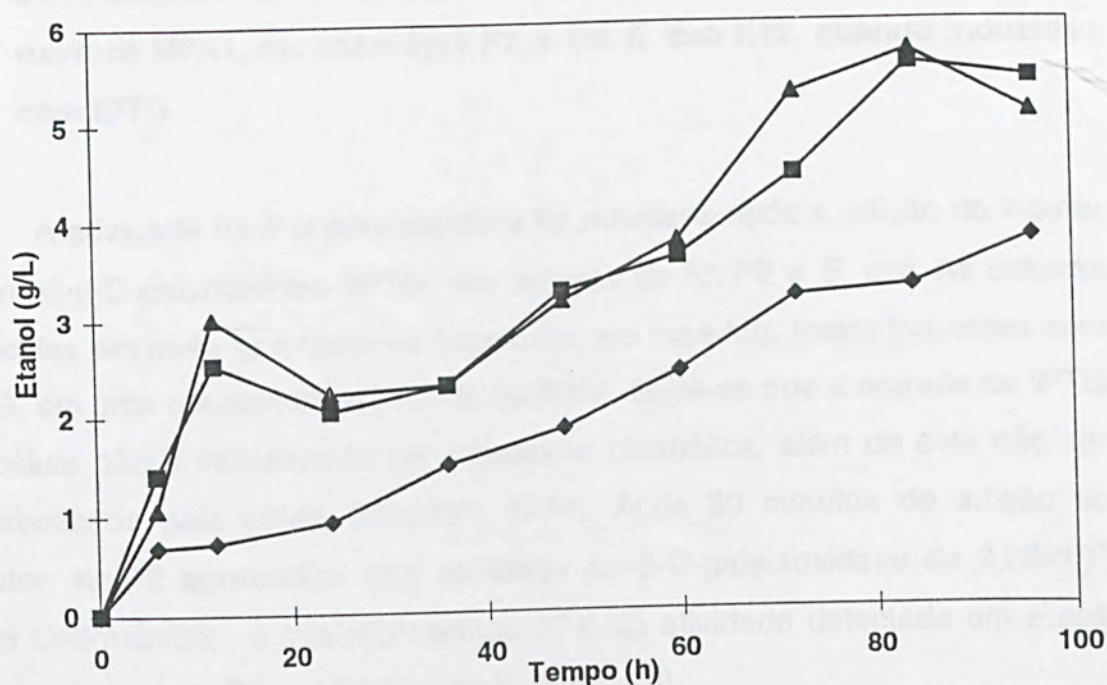


Figura 2 - Produção de etanol por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, em soro de queijo -◆-, soro de queijo suplementado com 0,5% de extrato de levedura -■- e soro de queijo suplementado com LB -▲-, em pH controlado em 6,0, por 96 horas, a 30°C, com agitação de 100 rpm.

Os resultados das fermentações do soro de queijo e soro de queijo suplementado, utilizando Kb.P2 nas condições testadas, mostraram a baixa eficiência dessa bactéria em converter lactose em etanol, quando comparada com outras bactérias recombinantes e com a eficiência de conversão de outros açúcares. Com os níveis de rendimento alcoólico observados nos experimentos, o uso dessa bactéria para fermentação de soro de queijo não traria vantagens. Como a fermentação da lactose depende da expressão eficiente do operon-*lac*, foram feitos experimentos para verificar as condições de produção e a atividade da β -D-galactosidase.

4.2. Comparação da produção de β -D-galactosidase em *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, e em *E. coli* K12, quando induzidas com IPTG

A atividade de β -D-galactosidase foi estudada após a adição do indutor isopropil- β -D-galactosídeo (IPTG) em culturas de Kb.P2 e *E. coli*. As culturas crescidas em meio que continha succinato, em fase log, foram induzidas com IPTG, em uma concentração final de 0,05mM. Sabe-se que a entrada de IPTG na célula não é influenciada por repressão catabólica, além de este não ser metabolizado pela célula (MILLER, 1974). Após 30 minutos de adição do indutor, Kb.P2 apresentou uma atividade de β -D-galactosidase de $2,66 \times 10^{-9}$ nmol ONP/min/cél., o que representou 37% da atividade detectada em *E. coli*, que foi de $8,14 \times 10^{-9}$ nmol ONP/min/cél. (Figura 3).

Segundo REEVE e BRAITHWAITE (1973), algumas estirpes de *Klebsiella* apresentam expressão elevada de β -D-galactosidase (ML^+) e outras, baixa expressão ($ML^{+/}$). Esses autores verificaram que, quando analisadas quanto à produção de β -D-galactosidase, as estirpes ML^+ apresentaram de 150 a 240 unidades/mL em 1.0 D.O. a 550nm, em células induzidas, e uma a quatro unidades/mL em células não-induzidas. As estirpes $ML^{+/}$ apresentaram 10 a 30 unidades em células induzidas e 0,3 a 0,6 em células não-induzidas. As estirpes $M^{+/}$ apresentaram 10% da atividade de β -D-galactosidase em comparação a ML^+ , em células induzidas e não-induzidas.

A indução da enzima em Kb.P2 ocorre lentamente (Figura 3), caracterizando-se em um microrganismo de fenótipo Lac fraco. Entretanto, é interessante notar que a bactéria Kb.P2 possui a característica de reconhecer IPTG como indutor para produção de β -D-galactosidase.

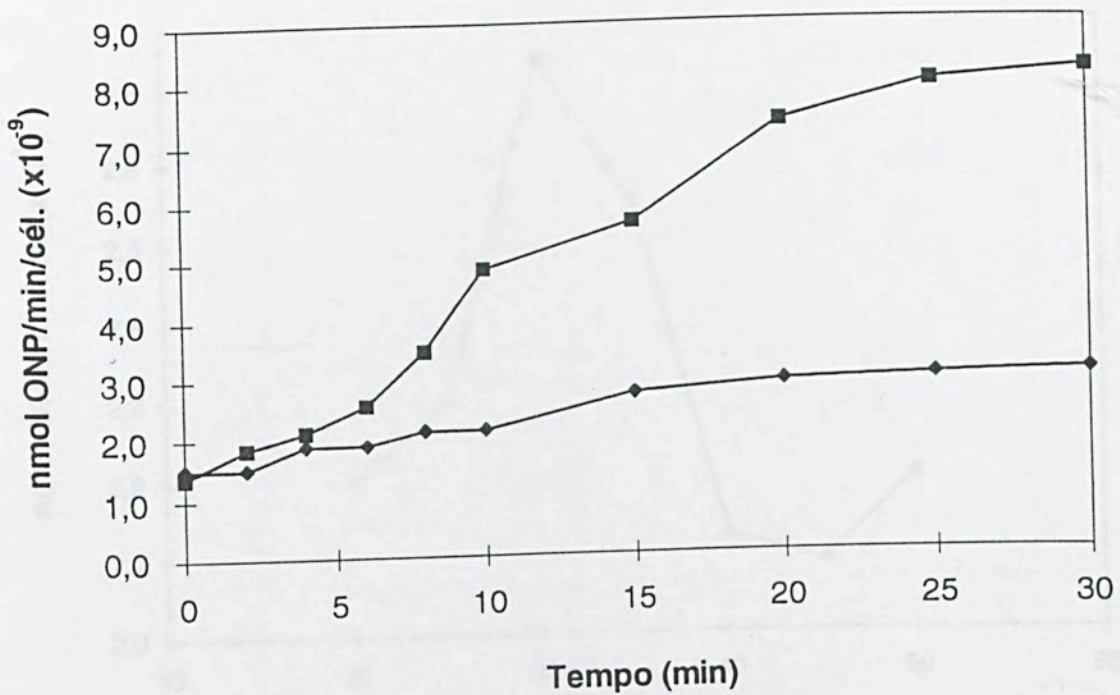


Figura 3 - Atividade de β -D-galactosidase em *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2 -◆-, e em *E. coli* K12 -■-, após indução com IPTG 0,05 mM.

4.3. Temperatura ótima de produção de β -D-galactosidase por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

A temperatura ótima de produção de β -D-galactosidase em Kb.P2 foi de 30°C (Figura 4). Diferentes microrganismos podem apresentar diferentes temperaturas ótimas para crescimento e para produção de β -D-galactosidase. De acordo com as informações apresentadas no *Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey* (ORSKOV, 1984), a estirpe *Klebsiella* apresenta crescimento ótimo a 37°C.

Segundo RAMANA e DUTTA (1977), a temperatura ótima de produção de β -D-galactosidase de *Streptococcus thermophilus* é de 40°C, coincidindo com a sua temperatura ótima de crescimento.

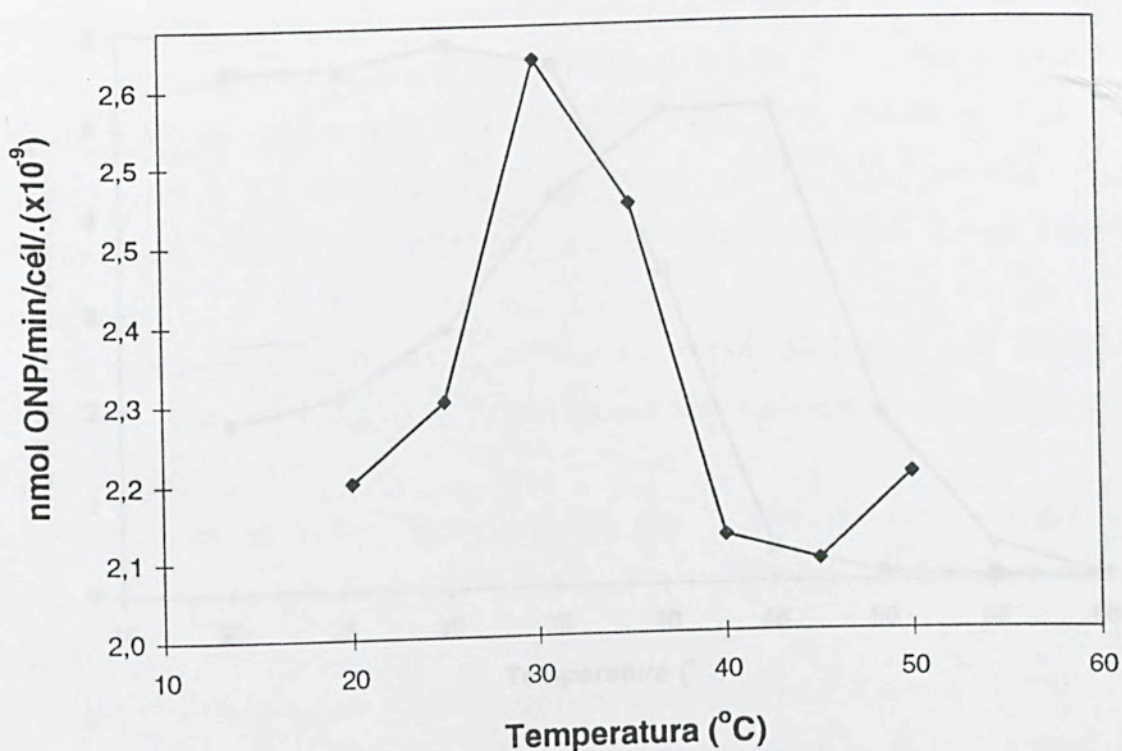


Figura 4 - Produção de β -D-galactosidase por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, nas temperaturas indicadas.

4.4. Influência da temperatura na atividade e estabilidade de β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

O efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima em células permeabilizadas de Kb.P2, previamente induzidas com IPTG, está indicado na Figura 5. A baixa atividade foi observada nas temperaturas de 20°C a 30°C e acima de 50°C. A atividade máxima, $5,11 \times 10^{-9}$ nmoles ONP/min/cél., ocorreu entre 40°C e 45°C. Por outro lado, a 55°C e 60°C, a enzima foi completamente inativada.

A β -D-galactosidase de Kb.P2 manteve-se estável entre 20 e 35°C. Acima de 35°C, houve redução drástica da atividade enzimática.

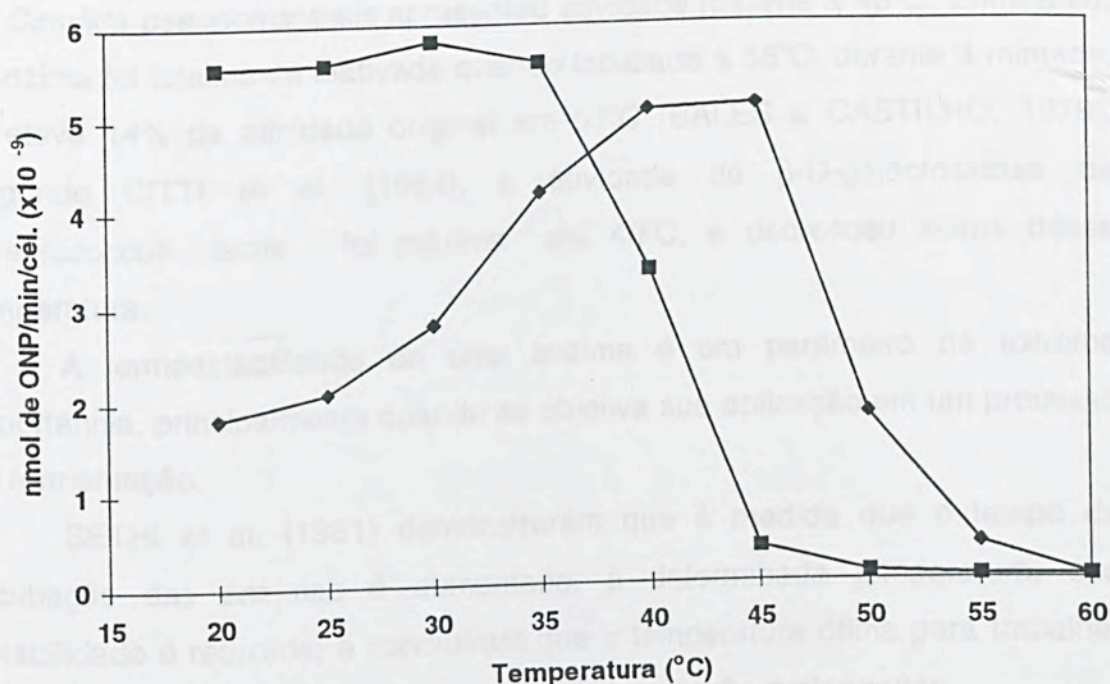


Figura 5 - Influência da temperatura na atividade \blacklozenge e na estabilidade \blacksquare da enzima β -D-galactosidase em células permeabilizadas de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2.

A diminuição da atividade em temperaturas maiores que 45°C pode estar relacionada com a desnaturação da enzima, o que pode afetar a velocidade da reação. Algumas enzimas são resistentes à desnaturação em altas temperaturas, especialmente aquelas encontradas em organismos adaptados a temperaturas elevadas. A menor atividade de β -D-galactosidase em temperaturas mais baixas pode estar relacionada também com a velocidade de reação, que ocorre mais vagorosamente por causa de uma barreira energética. O aumento da temperatura resulta num aumento do número de moléculas, com energia suficiente para sobrepor esta barreira energética, por meio da diminuição da energia de ativação (LEHNINGER et al., 1993).

MORISI et al. (1972) demonstraram que a atividade de β -D-galactosidase de *E.coli* immobilizada apresentou atividade máxima a 55°C e foi estável em temperaturas de 30°C a 45°C. Por outro lado, foi encontrado que β -D-galactosidase

de *Candida pseudotropicalis* apresentou atividade máxima a 45°C. Entretanto, a enzima foi totalmente inativada quando incubada a 56°C, durante 4 minutos, e reteve 14% da atividade original em 51°C (BALES e CASTILHO, 1979). Segundo CITTI et al. (1964), a atividade de β -D-galactosidase de *Streptococcus lactis* foi máxima até 40°C, e decresceu acima dessa temperatura.

A termoestabilidade de uma enzima é um parâmetro de extrema importância, principalmente quando se objetiva sua aplicação em um processo de fermentação.

SETHI et al. (1981) demonstraram que à medida que o tempo de incubação das enzimas é aumentado, à determinada temperatura, sua estabilidade é reduzida, e concluíram que a temperatura ótima para trabalhar com a enzima não é estável em tempos de incubação prolongados.

O microrganismo Kb.P2 possui crescimento ótimo a 37°C e atividade máxima da enzima β -D-galactosidase a 45°C. Entretanto, nessas duas temperaturas, a atividade enzimática na cultura de células é reduzida em um tempo de incubação maior. Portanto recomenda-se, em tempos prolongados, manter a temperatura entre 30°C e 35°C. A temperatura de 30°C coincide com a temperatura ótima de produção da enzima e produção de etanol (BURCHHARDT e INGRAM, 1992). A 35°C, a enzima mantém aproximadamente 80% de sua atividade máxima.

4.5. Influência do pH na atividade de β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

A atividade máxima de β -D-galactosidase foi detectada em pH 7,0 (Figura 6).

Resultados semelhantes foram encontrados por KUBY e LARDY (1953), em *E.coli* K12. Sabe-se que a atividade de uma enzima é muito influenciada pelo pH da solução da reação, tanto "in vivo" quanto "in vitro". O pH pode influenciar diretamente a atividade enzimática por meio de mudanças nas cargas de aminoácidos, principalmente os situados no sítio ativo da

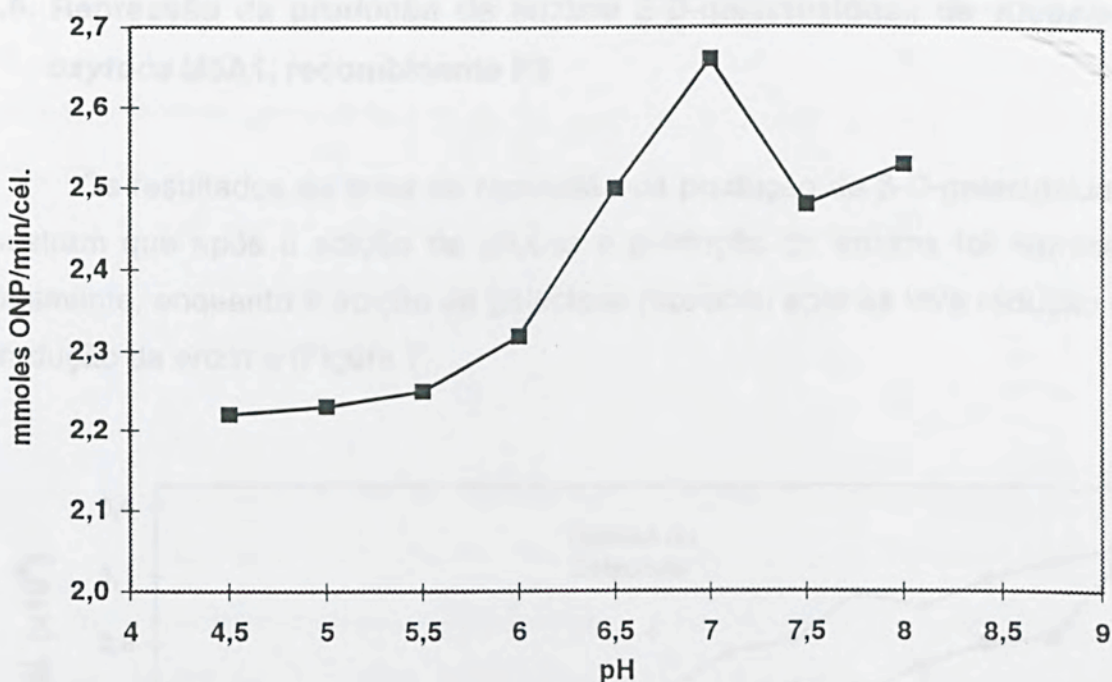


Figura 6 - Atividade de β -D-galactosidase de células de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, em diferentes pH.

enzima, acarretando maior ou menor afinidade da enzima com o substrato. CITTI et al. (1964) verificaram que o pH ótimo para atividade de β -D-galactosidase de *Streptococcus lactis* foi 7,0, enquanto β -D-galactosidase produzida por *Streptococcus thermofilos*, crescendo em soro de queijo, exibiu atividade ótima entre pH 6,5 e 7,5. RAMANA e DUTTA (1977) e FRANK e QUSOMKUTT (1979) observaram que o pH ideal para atividade de β -D-galactosidase de *Xanthomonas campestris* estava compreendido na faixa de 5,5 e 5,8.

Em diferentes fermentações realizadas por Kb.P2, usando como substrato glicose e vários outros açúcares, o pH foi mantido e controlado em 6,0, com resultados satisfatórios (BOTHAST et al., 1994). Entretanto, a produção de etanol obtida nas fermentações de lactose por Kb.P2, controlando o pH em 6,0, não foi satisfatória. A atividade de β -D-galactosidase foi baixa em pH 6,0, o que parece ter afetado a produção de etanol (Figura 6). Uma redução drástica da atividade enzimática foi também observada com β -D galactosidase de *Escherichia coli*, quando o pH foi mantido abaixo de 6,0 (KUBY e LARDY, 1953).

4.6. Repressão da produção da enzima β -D-galactosidase de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

Os resultados do teste de repressão da produção de β -D-galactosidase mostram que após a adição de glicose a produção da enzima foi reprimida totalmente, enquanto a adição de galactose provocou apenas leve redução na produção da enzima (Figura 7).

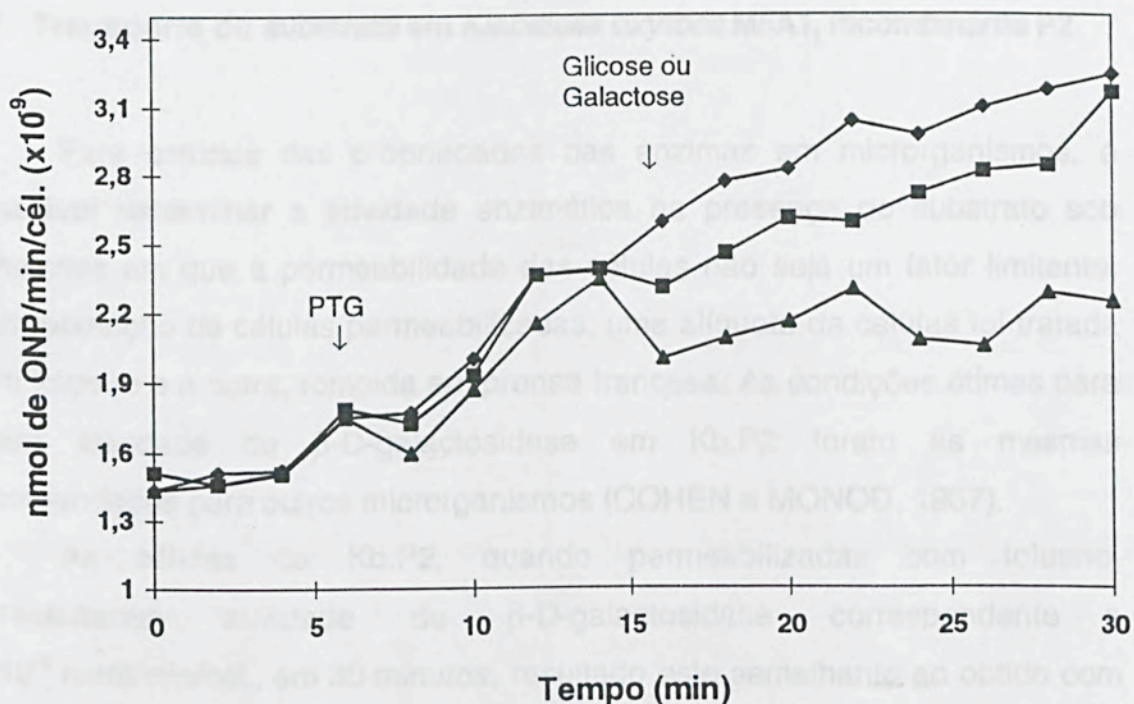


Figura 7 - Produção de β -D-galactosidase em meio mínimo suplementado. Adição de IPTG aos 6 minutos de incubação da cultura, adição de glicose -▲- e galactose -■-, ou sem adição do repressor -◆- após 10 minutos de indução.

Estudos de repressão catabólica em *E. coli* demonstraram que a inibição da produção de β -D-galactosidase é reversível e a atividade é plenamente restaurada depois da remoção de glicose (SAIER, 1993). Sistemas de β -D-galactosidase indutível e fenômenos de repressão catabólica são também encontrados em leveduras (GOMEZ e CASTILHO, 1983). CITTI et al.

(1964), estudando a repressão catabólica em *Streptococcus lactis*, verificaram que a adição de glicose a uma cultura de células induzidas por lactose reprimiu a síntese da enzima β -D-galactosidase, enquanto o efeito inibidor de galactose foi menor.

Os resultados do presente estudo sugerem que a repressão catabólica funciona como um mecanismo controlador da síntese da enzima em *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2.

4.7. Transporte do substrato em *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

Para estudos das propriedades das enzimas em microrganismos, é desejável determinar a atividade enzimática na presença do substrato sob condições em que a permeabilidade das células não seja um fator limitante. Para obtenção de células permeabilizadas, uma alíquota de células foi tratada com tolueno e a outra, rompida em prensa francesa. As condições ótimas para medir atividade de β -D-galactosidase em Kb.P2 foram as mesmas recomendadas para outros microrganismos (COHEN e MONOD, 1967).

As células de Kb.P2, quando permeabilizadas com tolueno, apresentaram atividade de β -D-galactosidase correspondente a 3×10^{-9} nmol/min/cél., em 30 minutos, resultado este semelhante ao obtido com células rompidas em prensa francesa, com uma pressão interna de 2.000 psi. As células rompidas e as células permeabilizadas com tolueno apresentaram 1,3 vez mais atividade que as células intactas, 30 minutos após a adição do indutor, o que sugere que o substrato não está sendo transportado eficientemente na célula (Figura 8).

No estudo do sistema de utilização de lactose em *K. aerogenes* (V9A), REEVE e BRAITHWAITE (1972) utilizaram tolueno para obtenção de células permeabilizadas, conseguindo resultados satisfatórios.

FLATT et al. (1992) verificaram que a atividade β -D-galactosidase de células totais de *Erwinia sp.* ATCC55046 foi um terço menor que a atividade de β -D-galactosidase do extrato celular, o que indica que o transporte de

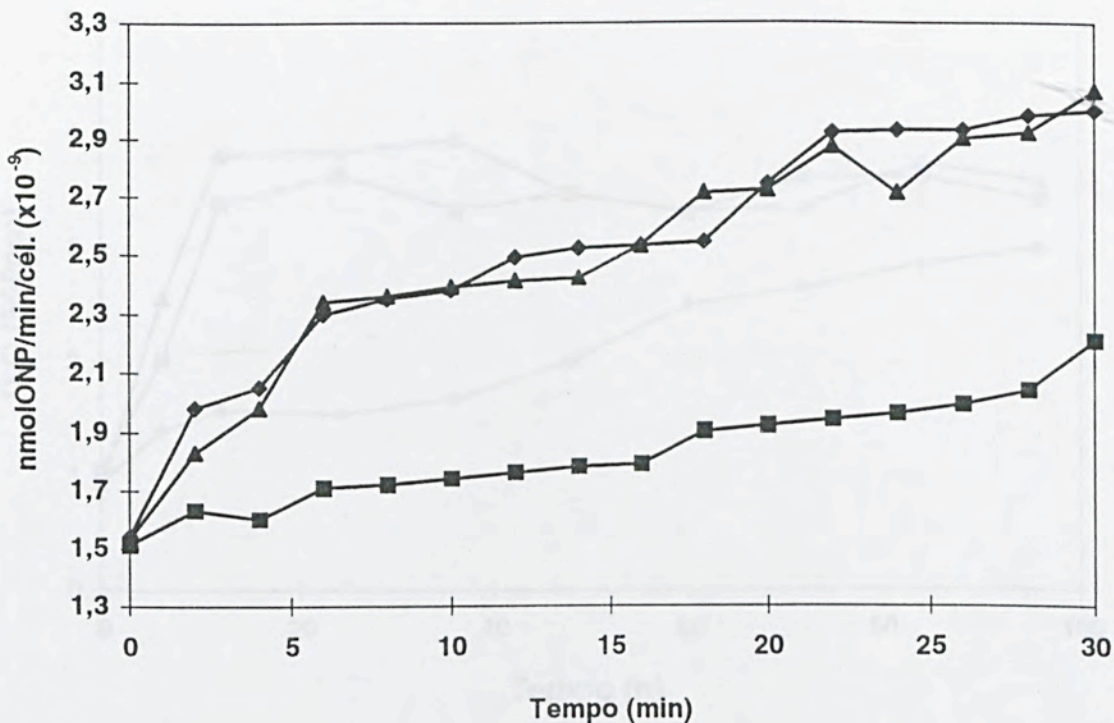


Figura 8 - Atividade de β -D-galactosidase em células permeabilizadas com tolueno \blacklozenge -, células rompidas em prensa francesa \blacktriangle - e células não-tratadas \blacksquare -.

lactose não foi eficiente, assumindo que os resultados do transporte de ONPG podem ser estendidos para lactose.

4.8. Fermentação de soro de queijo por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2

A fermentação do soro de queijo com e sem suplementação por Kb.P2 foi acompanhada, mantendo-se o pH do substrato controlado em 7,0, estabelecido previamente como o pH ótimo para a atividade de β -D-galactosidase. Foi constatado que a suplementação do soro de queijo com meio LB ou com 0,5% de extrato de levedura proporcionou um aumento na massa celular de Kb.P2 (Figura 9). Não foi observada diferença no crescimento na presença da suplementação com meio LB ou 0,5% de extrato de levedura (Figura 9).

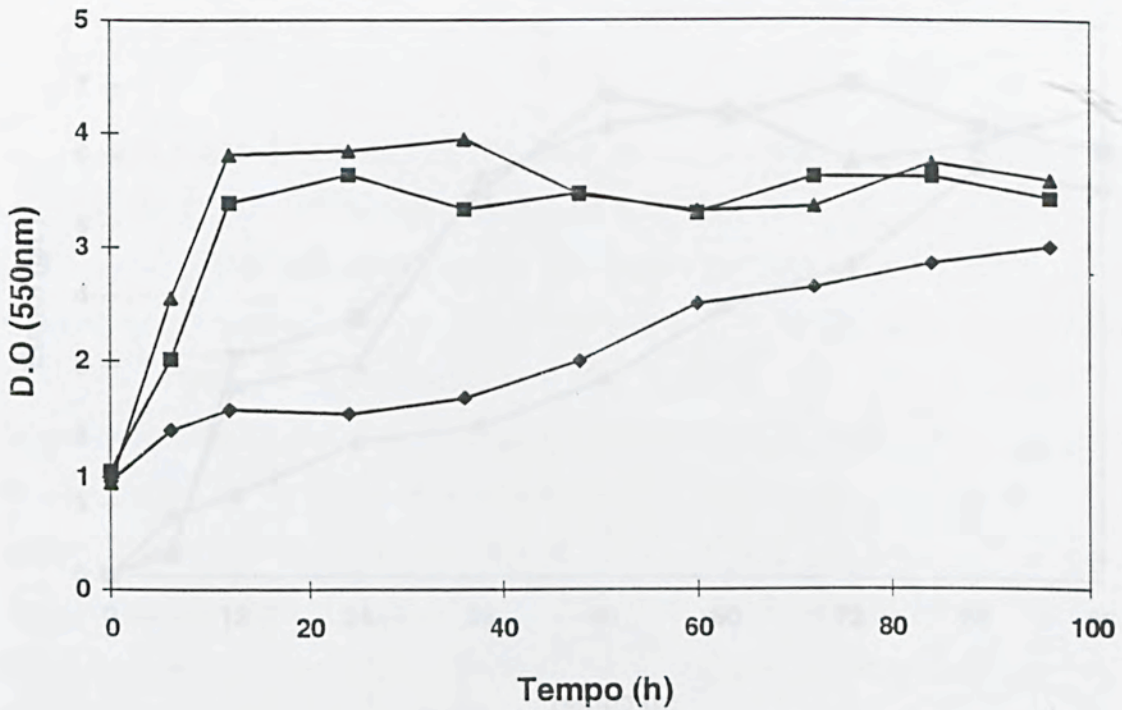


Figura 9 - Crescimento de *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, em soro de queijo -◆-, soro de queijo suplementado com 0,5% de extrato de levedura -■- ou soro de queijo suplementado com LB -▲-. Fermentação controlada em pH 7,0.

As fermentações de soro de queijo suplementado com LB ou extrato de levedura produziram, em 48 horas, 6,7g/L de etanol (Figura 10), cujo rendimento correspondeu a 24% do valor máximo teórico. Este valor foi próximo ao encontrado em 96 horas de fermentação, em pH controlado em 6,0 (Figura 2). O aumento de pH não favoreceu o rendimento em etanol, no entanto reduziu pela metade o tempo de fermentação para alcançar o rendimento máximo.

A produção de etanol em soro de queijo não-suplementado e pH mantido em 7,0 alcançou um rendimento máximo de 20% (Figura 10), após 84 horas. A fermentação de soro de queijo não-suplementado, em pH 6,0, alcançou um rendimento de 14%, em 96 horas de fermentação (Figura 2). A fermentação de soro não-suplementado, em pH 7,0, favoreceu o rendimento de etanol, comparada à fermentação em pH 6,0, produzindo pequena redução no tempo de fermentação.

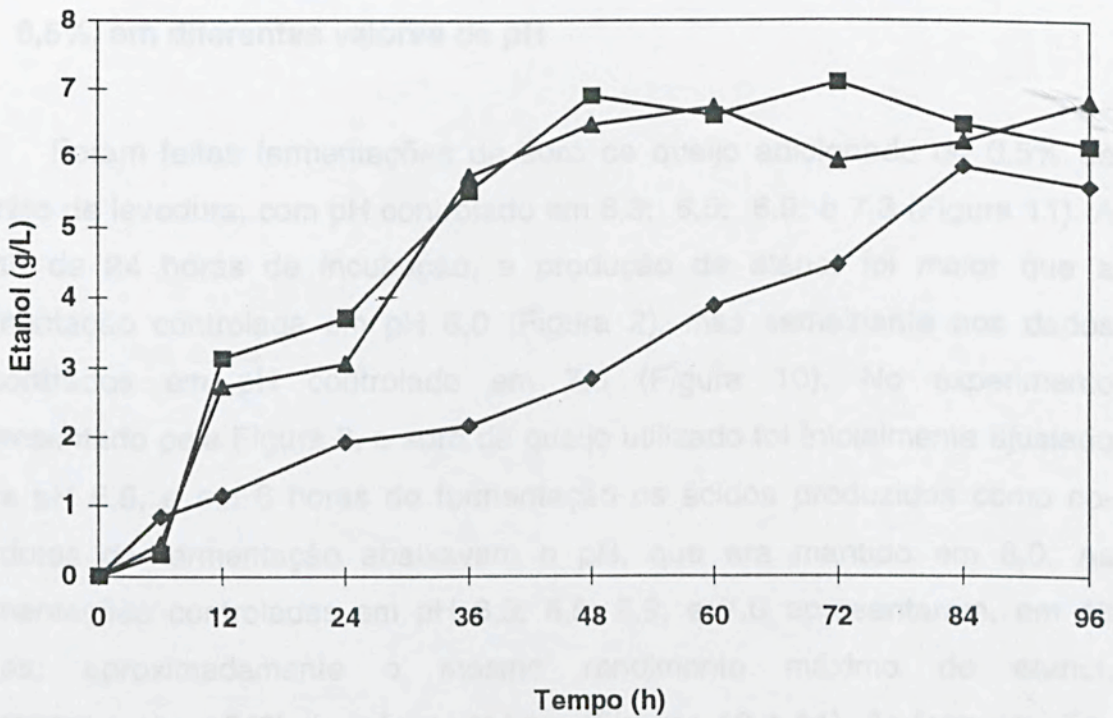


Figura 10 - Produção de etanol por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, em soro de queijo -◆-, soro de queijo suplementado com 0,5% de extrato de levedura -■- ou soro de queijo suplementado com LB -▲-. Fermentação controlada em pH 7,0.

CHUM e ROGERS (1986) verificaram que *Zymomonas mobilis*, contendo o operon *lac*, clonado em plasmídeo, fermentando em meio com 4% lactose, 1% extrato de levedura e 8% glicose, produziu etanol com um rendimento de 33%. A retirada de glicose do meio reduziu drasticamente o rendimento alcoólico, o que indica que o operon *lac* não estava se expressando adequadamente.

Durante os experimentos de fermentação, foi observado que entre 48 e 70 horas havia aumento no pH do meio, o que parece coincidir com o fim da fermentação e a máxima produção de etanol.

4.9. Fermentação de soro de queijo adicionado de extrato de levedura, a 0,5%, em diferentes valores de pH

Foram feitas fermentações de soro de queijo adicionado de 0,5% de extrato de levedura, com pH controlado em 6,3; 6,5; 6,9; e 7,3 (Figura 11). A partir de 24 horas de incubação, a produção de etanol foi maior que a fermentação controlada em pH 6,0 (Figura 2), mas semelhante aos dados encontrados em pH controlado em 7,0 (Figura 10). No experimento representado pela Figura 2, o soro de queijo utilizado foi inicialmente ajustado para pH 6,8, e em 6 horas de fermentação os ácidos produzidos como co-produtos da fermentação abaixavam o pH, que era mantido em 6,0. As fermentações controladas em pH 6,3; 6,5; 6,9; e 7,0 apresentaram, em 48 horas, aproximadamente o mesmo rendimento máximo de etanol, correspondente a 24% do máximo teórico (Figuras 10 e 11). As fermentações controladas em pHs 7,3 e 6,0 (Figuras 11 e 2) apresentaram, neste tempo, 20 e 6,6% do rendimento máximo, respectivamente.

Pode-se observar que nas fermentações de soro de queijo suplementado com 0,5% de extrato de levedura, com pH controlado entre 6,3 e 7,0, o rendimento máximo foi alcançado em aproximadamente 60 horas, ao passo que em pH 6,0 ou pH 7,3 o rendimento máximo foi alcançado em 72 a 84 horas.

Os volumes de KOH 2N gastos em 250ml de meio de fermentação, para controlar diferentes pHs foram: pH 6,3 - 6mL; pH 6,5 - 6mL; pH 6,9 - 7,5mL; pH 7,0 - 17mL; e pH 7,3 - 23mL. O consumo de base em pH mais elevado demonstrou que nesta condição o microrganismo teve necessidade de maior energia de manutenção, o que indica maior consumo de lactose e formação de ácidos como co-produtos da fermentação.

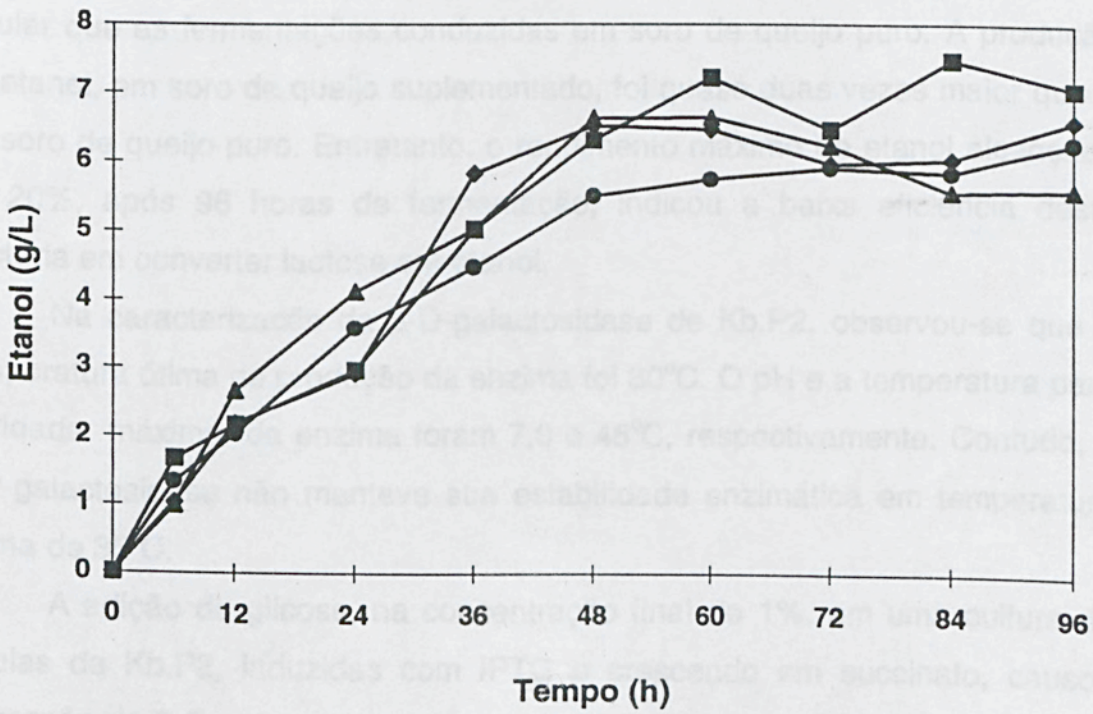


Figura 11 - Produção de etanol por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, em soro de queijo suplementado com 0,5% extrato de levedura. Fermentação controlada em pHs 6,3 -◆-; 6,5 -■-; 6,9 -▲-; e 7,3 -●-.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliada a produção de etanol por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2 (Kb.P2), e foram estudados alguns parâmetros da enzima β -D-galactosidase, necessários à hidrólise da lactose.

As fermentações em soro de queijo suplementado com meio LB ou extrato de levedura, em pH mantido em 6,0, favoreceram maior crescimento celular que as fermentações conduzidas em soro de queijo puro. A produção de etanol, em soro de queijo suplementado, foi quase duas vezes maior que a do soro de queijo puro. Entretanto, o rendimento máximo de etanol alcançado de 20%, após 96 horas de fermentação, indicou a baixa eficiência desta bactéria em converter lactose em etanol.

Na caracterização da β -D-galactosidase de Kb.P2, observou-se que a temperatura ótima de produção da enzima foi 30°C. O pH e a temperatura para atividade máxima da enzima foram 7,0 e 45°C, respectivamente. Contudo, a β -D-galactosidase não manteve sua estabilidade enzimática em temperatura acima de 35°C.

A adição de glicose, na concentração final de 1%, em uma cultura de células de Kb.P2, induzidas com IPTG e crescendo em succinato, causou repressão da β -D-galactosidase. A adição de galactose, na concentração final de 1%, reprimiu levemente a síntese da enzima.

Os resultados da indução de β -D-galactosidase em células de Kb.P2 e *E. coli* K12, 30 minutos após a adição do IPTG, crescendo em succinato, demonstraram que a enzima β -D-galactosidase de Kb.P2 possui 37% da atividade ($2,66 \times 10^{-9}$ nmol ONP/min/cél.), em relação à *E. coli* K12 ($8,14 \times 10^{-9}$ nmol ONP/min/cél.). Este resultado mostra que Kb.P2 é uma bactéria com baixa expressão do operon-*lac*.

As células induzidas com IPTG e permeabilizadas com tolueno ou rompidas com prensa francesa apresentaram, 30 minutos após a adição do indutor, 1,3 vez mais atividade que as células intactas, o que sugere que o substrato (ONPG) não está sendo transportado eficientemente para a célula.

As fermentações com pH mantido em 7,0, determinado como o pH ótimo de atividade da enzima, e as fermentações com pH controlado em 6,3; 6,5; e 6,9 reduziram o tempo de fermentação em 24 horas, apesar de não ter aumentado o rendimento de etanol, quando comparado com as fermentações com pH mantido em 6,0.

A baixa expressão de β -D-galactosidase em *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2, dificulta a sua utilização para fermentar o soro de queijo a etanol. Outros estudos devem ser conduzidos, visando conhecer melhor o operon-*lac* e tentar aumentar a expressão de seus genes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F., INGRAM, L.O. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1943-1948, 1989.
- BALES, A.S., CASTILHO, F.J. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1201-1205, 1979.
- BARFORD, J.P., CAIL, R.G., CALLENDER, I.J. Anaerobic digestion of high-strength cheese whey utilizing semicontinuous digesters and chemical flocculant addition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 1601-1607, 1986.
- BEN-HASSAN, R.M., GHALY, A.E. Continuous Propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 89-105, 1994.
- BOTHAST, R. J., KURTZMAN, C. P., SALTARELLI, M. D. et al. Ethanol production by 107 strains of yeast on 5, 10, and 20% lactose. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 8, p.593-596, 1985.
- BOTHAST, R. J., SAHA, B. C., FLOSENZIER, A. V., INGRAM, L. O. Fermentation of L-Arabinose, D-xylose and D-glucose by ethanologenic recombinant *Klebsiella Oxytoca* Strain P2. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, 1994.

- BRAU, B., SAHNM, H. Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **Archives Microbiology**, v. 144, p. 296-301, 1986.
- BURCHHARDT, G., INGRAM, L. O. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. **Applied Microbiology Technology**. V.58, p. 1128-1133,1992.
- CAREY, V.C., INGRAM. L.O., WALIA. S.K. Expression of a lactose transposon (Tn 951) in *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1163-1168, 1983.
- CEREDA, M.P., FLORS, A., VALLES, S. et al. Tratamiento anaerobio en dos fases de suspensiones amiláceos. I. Fase acidogénica. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 101-108, 1986.
- CHUM, U. H., ROGERS, P. L. Kinetic studies on a *lac^c* containing strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**. V. 8, p. 807-810, 1986.
- CITTI, J.E., SANDINE, W.E., ELLIKER, P.R. Beta-galactosidase of *Streptococcus lactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 80, n. 4, p.937-942, 1964.
- COHEN, G.N., MONOD, J. Bacterial permeases. **Bacteriological Reviews**, v. 21, p. 169-194, 1967.
- COLOMBAM, A., ROGER, L., BOYAVAL, P. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 1091-1098, 1993.
- FERRAT, A. Como valorizar o subproduto das fábricas de queijos, o "Lacto-Soro". **Boletim do Leite**, v. 618, p. 32-38, 1980.
- FLATT, J. H., HARDEN, R. S., GONZALEZ, J. M. et al. An anionic galactomaman Polysaccharide gum from a newly-isolated lactose -utilizing bacterium. I. strain description and gum characterization. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 4, 1992.
- FRANK, J.F., QUSOMKUTT, G.A. General properties of beta-galactosidase of *Xantomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 554-556, 1979.
- GAWEL, J., KOSIKOWSKI, F.V. Improving alcohol fermentation in concentrated ultrafiltration permeates of cottage cheese whey. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1717-1719, 1978.

- GOMEZ, A., CASTILHO F.J. Production of biomass and β -D-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture whey. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 8, p. 1341-1357, 1983.
- GUIMARÃES V. W., DUDEY G. L., INGRAM L. O. Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 40, n.1, p. 41-45, 1992.
- HAHN-HÄGERDAL, B. Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with β -galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 914-916, 1985.
- HUBER, R.E., GUPTA., M.N., KHARE, S.K. The active site and mechanism of the beta-galactosidase from *Escherichia coli*. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 309-318, 1994.
- INGRAM, L.O., CONWAY, T., CLARK, D.P. et. al. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2420-2425, 1987.
- INGRAM, L.O., CONWAY, T. Expression of difrents levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinants strains of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 397-404, 1988.
- INGRAM, L.O., Ethanol tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v .9, n. 4, p. 305-319, 1990.
- JACOB, F., MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 318-356, 1961.
- JANSSENS, J.H., BERNARD, A., BAILEY, R.B. Ethanol from whey: continuous fermentation with cell recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 1984.
- JUENGST, F.W. Use of total whey constituents-animal feed. **Journal Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 106-111, 1979.
- KOSIKOWSKI, G., WZOREK, W.W. Whey wine from concentrates of reconstituted acid whey power. **Journal Dairy Science**, v. 60, n. 12, p. 1982-1986, 1977.

- KUBY S. A., LARDY, H. A. Purification and kinetics of β -D-galactosidase from *Escherichia coli*, Strain K-12. **Journal of Molecular Biology** v. 75, n. 20, 1953.
- LAWFORD, H.G., ROUSSEAU, J.D. Fuel ethanol from corn residue prehidrolysate by a patented ethanologenic *Escherichia coli* B. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 5, p. 421-426, 1991.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. .M. **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 1993. 1013p.
- LEITE A. R. Produção de etanol a partir de soro de queijo utilizando *Escherichia coli* recombinante. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 51 p. Dissertação (Mestrado in Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- LOWE, G.H. The rapid detection of lactose fermentation in paracolon organisms by the demonstration of β -galactosidase. **Journal Medical Laboratory Technology**.. v. 19, p. 21, 1962.
- LURIA, S. E., DELBRUCK, M. Mutations of bactéria from virus sensivity to virus resistance. **Genetics**, v. 28, p. 491-511, 1943.
- MILLER, J.H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor, 1974. p. 328-429.
- MORISI, F., PASTORE, M, VIGLIA, A. Reduction of lactose contend of milk by entrapped β -galactosidase. I. characteristicacs of β -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**. V.56, n. 9, p. 799-804, 1972.
- MOULIN, G., GUILLAUME, M., GALZY, P. Alcohol production by yeast in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p. 1277-1281, 1980.
- MUSTRANTA, A , LINKO, M., HEIKONEN, M. Production and use of lactase. **Kemia-Kemi**, v. 6, n. 6, p. 306-308, 1979.
- NUNES, M. F. A., MASSAGUER, S., ALEGRE, R. M. Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRLY-24215. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 1993.

- OHTA, K., BEALL, D.S., MEJIA, J.P. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 893-900, 1991a.
- OHTA, K., BEALL, D.S., MEJIA, J.P. et al. Metabolic engineering *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 57, p. 2810-2815, 1991 b.
- ORSKOV, I. Genus V *Klebsiella* Trevisian 1885. In: KREIG, N.R., HOLT, J.G. (Eds.) **Bergeys manual of systematic bacteriology**, v.1. Baltimore: The Williams and Wilkins, v. 1, p. 461-465, 1984.
- POSTGATE, J.R. Viable counts and viability. In: NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W. (Eds.) **Methods in microbiology**, Great Britain: Editora, 1969. v. 1, p. 611-628.
- POSTMA, P.W., LEWGDER., J.W., JACOBSON, G.R. Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 543-594, 1993.
- RAMANA, R.M.V., DUTTA, S.M. Production of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 185-188, 1977.
- REEVE, E.C.R., BRAITHWAITE, J.A. The lactose system in *Klebsiella aerogenes* V9A. Characteristics of two Lac mutant phenotypes which revert to wild-type. **Genetical Research**. v. 20, n. 2, p. 175-191, 1972.
- REEVE, E.C.R., BRAITHWAITE, J.A. Lac⁺ plasmids are responsible for the strong lactose-positive phenotype found in many strains of *Klebsiella* species. **Genetical Research**, v. 22, n. 3, p. 329-333, 1973.
- RODEL., PLAGA, W., FRANK, R., et al. Primary structures of *Escherichia coli* pyruvate formate-lyase and pyruvate-formate-lyase activating enzyme deduced from the DNA nucleotide sequence. **Journal Biochemistry**, v. 177, p. 153-158, 1988.
- ROGERS, P. L., LEE, K. J., SKOTNIKI, M. L., TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Advances in Biochemical Engineering**, v.23, p. 37-84, 1982.
- SAIER, M.H. Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. **Journal Cell Biochemical.**, v. 51, p. 62-68, 1993.

SETHI, R. P., KHANNA, P K., THAPA, V. K. Purification and properties of polygalacturonase and pectin methyl esterase. **Journal of Rsearch Punjab Agricultural University**, v. 18, p. 421-429, 1981.

SWINGS, J., DELEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, p. 2851-2853, 1977.

VIENNE, P., 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.

WOYCHICK, J.H., MULLER R.L., MARSHALL, K.R. **Journal Dairy Science and Technology**, v. 14, n. 2, p. 75-77, 1979.

WOOD, B.E., INGRAM, L.O. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing genes thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n. 7, p. 2103-2110, 1992.

ZALL, R.R. Trends in whey fraciation, a global perspective. **Journal Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2621-2629, 1984.

ZEIKUS, J. G., Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Intermediary metabolism of lactose degradation in continous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 180-187,1986.

