

MARIANA CAROLINE TOCANTINS ALVIM

**CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS QUE FAVORECEM A SÍNTESE DE ÁCIDO L-
ASCÓRBICO (VITAMINA C) POR CULTURAS DE *Kluyveromyces lactis*
METABOLICAMENTE ENGENHEIRADA**

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
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A475c
2014
Alvim, Mariana Caroline Tocantins, 1990-
Condições fisiológicas que favorecem a síntese de ácido
L-ascórbico (vitamina C) por culturas de *Kluyveromyces lactis*
metabolicamente engenheirada / Mariana Caroline Tocantins
Alvim. – Viçosa, MG, 2014.
xii, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Flávia Maria Lopes Passos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Kluyveromyces lactis*. 2. Ácido L-Ascórbico.
3. GDP-D-Manose. 4. Oxidação. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.562

MARIANA CAROLINE TOCANTINS ALVIM

**CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS QUE FAVORECEM A SÍNTESE DE ÁCIDO L-
ASCÓRBICO (VITAMINA C) POR CULTURAS DE *Kluyveromyces lactis*
METABOLICAMENTE ENGENHEIRADA**

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 2014.

Júlio César Câmara Rosa

Wendel Batista da Silveira
(Coorientador)

Frederico José Vieira Passos
(Coorientador)

Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus pais, Paulo Roberto e Maria do Carmo.

À minha irmã, Carolina.

Ao meu amor, Rodolpho.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

A caminhada foi longa e cheia de percalços. Por isso, não poderia deixar de ser grata a todos que me ajudaram chegar até aqui e concluir mais uma etapa.

Agradeço, inicialmente, a Deus, pela presença constante em minha vida, pela capacitação a mim concedida e pelo auxílio em todas as escolhas.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de estudo concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação e amizade e por toda a dedicação e entusiasmo conferidos à minha dissertação.

Ao Wendel Batista da Silveira e Frederico José Vieira Passos, pela coorientação.

Aos laboratórios do Departamento de Microbiologia, em especial ao Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, bem como ao Laboratório de Biodiversidade (DBB).

Ao técnico do laboratório Hugo Genier, pela indescritível disposição e ajuda em todas as análises de cromatografia realizadas.

Ao Júlio César Câmara Rosa, por “engenheirar” a levedura foco deste trabalho, além de auxiliar e reconhecer meu trabalho.

Ao Conrado Vieira, pelo auxílio fundamental nas análises estatísticas.

Aos meus pais Paulo Roberto e Maria do Carmo, pelos valores ensinados, pelas orações feitas, por me acalmarem e me incentivarem nos momentos de aflição e, acima de tudo, por serem meus maiores exemplos de persistência.

À minha irmã Carolina, pela amizade e companheirismo.

Ao meu querido Rodolpho, por ser uma fonte inesgotável de carinho, compreensão, confiança e incentivo, e por ser um modelo de determinação e sucesso para mim.

À minha avó Onofrina (*in memoriam*), pelo cuidado e amor dados a mim, pelo exemplo de força observado até o último instante, e pelas histórias contadas que hoje deixam muitas saudades.

Ao meu primo Beto (Cucuca) e à minha tia Glorinha (Papo), pela torcida e preocupação.

Aos meus filhotes Mel, Kate e Totó, pela companhia constante e por exibirem um amor incondicional.

Às minha amigas de Juiz de Fora, Quenfins, Geisa, Isabela, Talitha e Sara, por me mostrarem que o tempo modifica apenas os lugares, mas nunca o amor e o carinho quando são verdadeiros.

À Lívia, pelos sorrisos diários, pelas palavras doces que sempre me confortaram e pelo incrível companheirismo.

A todos os meus amigos do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, Kamila, Robson, Éder, Fernando, Josi, Caio, Tatiana, Raquel, Priscila, Rose e Galvão, pela excelente convivência, pelos momentos de descontração, companhia e ajuda crucial nos experimentos.

Aos amigos da turma de mestrado, Taidés, Priscila, Edmo, Conrado e Felipe, pela amizade demonstrada nos momentos difíceis enfrentados durante este período.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Nilcéa, pela competência evidenciada ao longo dos dois anos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e BIOAGRO, senhor Paulo, Danilo, Rita, Evandro, José Carlos, Júlio, Carlos, Paulo da portaria, Letícia e Sandra, pela enorme disposição e boa vontade para comigo.

Finalmente, aos demais colegas da Microbiologia (UFJF, Embrapa e UFV), familiares, colegas de república e amigos, por contribuírem com meu trabalho de alguma forma, permitindo que esta conquista fosse alcançada.

Meu muito obrigada a todos vocês!

BIOGRAFIA

MARIANA CAROLINE TOCANTINS ALVIM, filha de Paulo Roberto Alvim e Maria do Carmo Teixeira Tocantins Alvim, nasceu no dia 14 de janeiro de 1990, em Juiz de Fora, Minas Gerais. Graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Juiz de Fora em dezembro de 2011. Em fevereiro de 2012, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Importância do ácido L-ascórbico	1
1.2 Vias naturais e sintéticas de produção de ALA	2
1.3 Síntese de ALA por leveduras genética e metabolicamente engenheiradas ..	6
1.4 Estratégias para aumentar a síntese de ALA numa levedura metabolicamente engenheirada	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2	20
RESUMO	21
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	26
2.1 Micro-organismos e manutenção	26
2.2 Determinação da massa celular seca e velocidade específica máxima de crescimento	26
2.3 Crescimento em baixas velocidades de crescimento	27
2.4 Cinética de inibição do crescimento e estresse oxidativo	28
2.5 Extração e determinação de ácido L-ascórbico e ácido D-eritroascórbico intracelulares	28
2.6 Análises estatísticas	29
3. Resultados e Discussão	30
3.1 Efeito da velocidade de crescimento na produção de ALA	30
3.2 Efeito do estresse oxidativo na síntese de ALA	34
4. Conclusão e Perspectivas	39
5. Agradecimentos	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

6. Apêndice	46
-------------------	----

RESUMO

ALVIM, Mariana Caroline Tocantins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Condições fisiológicas que favorecem a síntese de ácido L-ascórbico (vitamina C) por culturas de *Kluyveromyces lactis* metabolicamente engenheirada.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Coorientadores: Frederico José Vieira Passos e Wendel Batista da Silveira.

O ácido L-ascórbico (ALA) é produzido naturalmente por plantas a partir de D-glicose. Leveduras sintetizam um metabólito semelhante, o ácido D-eritroascórbico (ADEA). Embora este composto não mostre atividade contra o escorbuto, ele contém uma função antioxidante, mas é produzido pelo micro-organismo em baixas concentrações. Recentemente, com a finalidade de fazer as leveduras serem capazes de converter o componente D-galactose da D-lactose do soro de queijo em ALA, a linhagem selvagem de *Kluyveromyces lactis* CBS2359 foi transformada com genes, que integram a via de biossíntese de L-galactose, isolados de *Arabidopsis thaliana*. Na presença do intermediário L-galactose, ALA pode então ser sintetizado pela levedura com as enzimas responsáveis pela produção de ADEA. Foi demonstrado que a linhagem engenheirada JVC 1-56 foi capaz de sintetizar ALA em comparação com a selvagem, mas com baixo rendimento. Neste sentido, estudos que auxiliem o aumento da produção de ALA são relevantes. Uma vez que a via engenheirada da síntese de ALA e a via nativa da formação da parede celular de *K. lactis* possuem um intermediário comum, GDP-D-manose, faz-se necessário avaliar o efeito do desacoplamento da produção de ALA do crescimento que requer constante síntese da parede. Além disso, considerando a propriedade antioxidante do ALA, a expectativa é de que a produção deste metabólito aumentasse quando JVC 1-56 fosse exposta a uma condição de estresse oxidativo por menadiona. Neste contexto, este trabalho investigou as condições fisiológicas mencionadas utilizando os meios Yeast Galactose Base (YGB) e soro de queijo ultrafiltrado (SQU - subproduto de indústrias de queijo em que predomina lactose como fonte de carbono). Foi averiguado que *Kluyveromyces lactis* JVC 1-56 produz ALA com rendimentos maiores quando cultivada por 96 horas em batelada no meio YPGal. O cultivo em baixas velocidades de crescimento ($0,04 \text{ h}^{-1}$) predispõe as células a sintetizar mais ALA por unidade de massa celular (0,80 mg/mg). Entretanto, o rendimento da cultura contínua operada como quimostato, tendo nitrogênio como substrato limitante, ainda mostrou ser inferior ao previsto na batelada

(1,94 mg/mg). Já o estresse oxidativo por 12,5 μ M de menadiona sobre *K. lactis* JVC1-56, nas condições aplicadas, não foi eficaz no aumento da produção de ALA (1,47 mg/mg). Ainda, o rendimento de ADEA foi superior ao de ALA nas duas estratégias: 1,37 mg/mg a 0,21 h⁻¹ na cultura sob regime permanente, 8,52 mg/mg na batelada sob estresse oxidativo e 10,33 mg/mg na batelada na ausência do agente oxidante, indicando que ele pode estar em uma configuração mais estável do que a vitamina C. Finalmente, o permeado do soro de queijo continua sendo uma perspectiva para a conversão da lactose em um produto biotecnológico de maior valor agregado.

ABSTRACT

ALVIM, Mariana Caroline Tocantins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Physiological conditions which promote the synthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by cultures of metabolically engineered *Kluyveromyces lactis*.** Advisor: Flávia Maria Lopes Passos. Co-advisors Frederico José Vieira Passos and Wendel Batista da Silveira.

The L-ascorbic acid (ALA) is produced naturally by plants from D-glucose. Yeasts synthesize a similar metabolite, D-eritroascorbic acid (ADEA). Although this compound does not show activity against scurvy, it contains an antioxidant function, but it is produced in low concentrations by the microorganism. Recently, in order to make yeasts are capable of converting D-galactose D-lactose from cheese whey into ALA, the wild strain *Kluyveromyces lactis* CBS2359 has been transformed with genes that integrate the L-galactose biosynthesis pathway, isolated from *Arabidopsis thaliana*. In the presence of intermediate L-galactose, ALA can be synthesized by yeast with enzymes responsible for ADEA production. It has been demonstrated that the engineered strain JVC 1-56 was able to synthesize ALA compared to the wild type, but the yield was still low. In this regard, studies to assist the increased of ALA production are relevant. Once the engineered ALA pathway and native cell wall formation pathway of *K. lactis* have a common intermediate, GDP-D-mannose, we need to evaluate the effect of uncoupling of vitamin C synthesis route of the growth that requires constant wall synthesis. Moreover, considering the antioxidant properties of ALA, the expectation is that the production of this metabolite increase when JVC 1-56 is exposed to a oxidative stress condition by menadione. In this context, this study investigated the both physiological conditions, using the media Yeast Galactose Base (YGB) and ultrafiltered cheese whey (SQU - byproduct of cheese industry that predominates lactose as carbon source). It was analyzed that *Kluyveromyces lactis* JVC 1-56 produces higher yields of ALA when it is grown for 96 hours in batch culture in the middle YPGal. Cultivation at low growth rates (0.04 h^{-1}) predisposes the cells to synthesize more ALA per unit cell mass (0.80 mg/mg). However, the yield of continuous culture operated as quimostato, limiting the substrate nitrogen, still proved to be lower than expected in the batch (1.94 mg/mg). Oxidative stress by 12.5 mM menadione on *K. lactis* JVC1 -56, in the conditions applied, was not effective in the

increasing the ALA production (1.47 mg/mg). Still, ADEA yield was higher than ALA in two strategies: 1.37 mg/mg at 0.21 h^{-1} in culture under steady state, 8.52 mg/mg in batch under oxidative stress and 10.33 mg/mg in the batch in the absence of oxidizing agent, indicating that ADEA may be in a more stable configuration than vitamin C. Finally, the permeate cheese whey remains a prospect for the conversion of lactose into a biotechnological product of higher value aggregate.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Importância do ácido L-ascórbico

O ácido L-ascórbico (ALA), também conhecido como vitamina C, é uma das vitaminas mais usadas pela população mundial. Foi descoberto em 1928 por Szent-Györgyi, sua estrutura química foi determinada em 1933 (Carpenter, 2012) e foi reconhecido como uma substância geralmente segura (GRAS) pelo FDA em 1979 (Food and Drug Administration, 2013).

ALA é uma substância hidrossolúvel e termolábil que possui variadas funções em processos metabólicos nos organismos em que é encontrado. Atua como antioxidante, reagindo rapidamente com espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante o metabolismo aeróbico, removendo-os. Além disso, ALA regenera o antioxidante α -tocoferol (vitamina E) e age como cofator de diversas enzimas de oxidação. Ainda, ALA pode participar do transporte de elétrons em cadeias transportadoras mitocondriais e fotossintéticas, além de contribuir para a síntese de oxalato (Smirnoff, 1996; Kojo, 2004; Masaki, 2010).

Como um antioxidante, ALA é excelente por diversas razões: pode doar elétrons, devido a sua capacidade de deslocá-los em volta do anel do carbono 5 (Figura 1); e seu potencial de oxirredução lhe confere a habilidade de interagir tanto com ROS quanto com glutatona e tocoferol. Além disso, em termos de custo energético, ALA é uma molécula vantajosa, pois é pequena (apenas seis carbonos) que pode ser prontamente sintetizada a partir da glicose, consumindo GTP ao invés de ATP (na via Smirnoff-Wheeler) (Figura 2), resultando em uma molécula de NADH e um citocromo reduzido. Ainda, ALA não é tóxico e é hidrossolúvel. Desta maneira, devido ao seu baixo custo energético e toxicidade, a célula pode acumular ALA em grande quantidade (Gest *et al.*, 2013).

Em estudos atuais, a vitamina é vista participando da neutralização de ROS decorrente do tratamento de câncer (quimioterapia) (Fukumura *et al.*, 2012) e a indução da citotoxicidade em tumores (Du *et al.*, 2012). Também, ALA está sendo

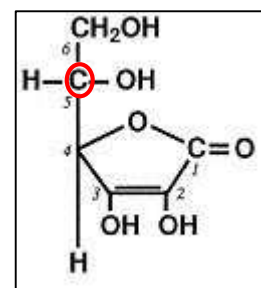


Figura 1. Estrutura do ácido L-ascórbico, destacando o carbono 5.

associado à promoção da função cognitiva e à prevenção da doença de Alzheimer (Bowman, 2012), além de estar sendo considerado um agente antidepressivo (Moretti *et al.* 2014).

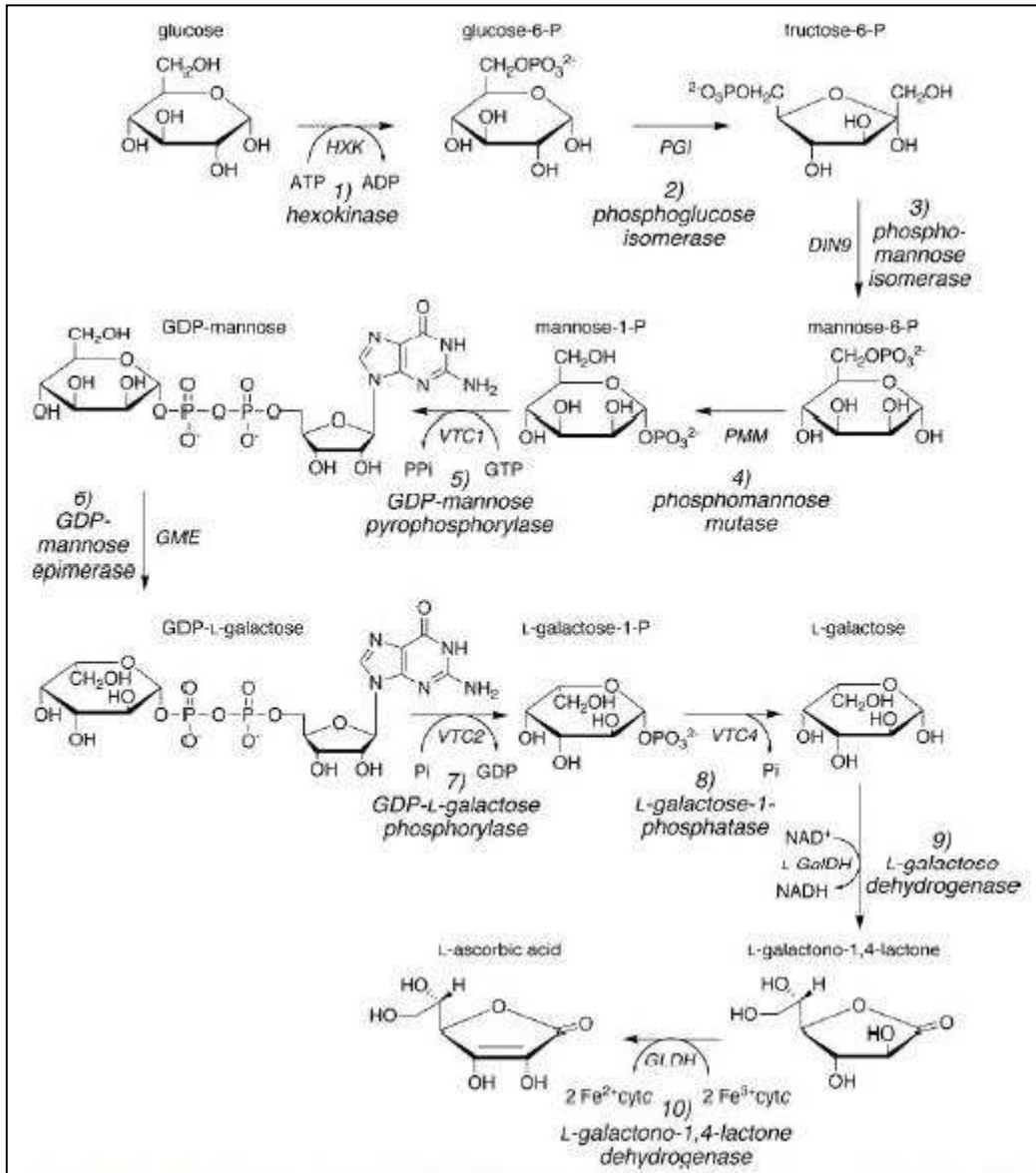


Figura 2. Via Smirnov-Wheeler (Lister, *et al.*, 2007).

1.2 Vias naturais e sintéticas de produção de ALA

Em plantas, todas as células são capazes de produzir a vitamina C. Já a síntese da mesma em vertebrados está restrita a determinados órgãos, como fígado em mamíferos e rim em peixes, anfíbios e répteis. Entretanto, nos primatas, a via de biossíntese de ALA está ausente (devido à deficiência da enzima L-gulono-1,4-lactona

oxidase), fazendo-se necessária a ingestão dele via alimentação (Lister *et al.*, 2007). Nestes, ALA está presente no citosol, cloroplasto, vacúolo, mitocôndria e parede celular (Smirnoff, 1996; Hancock & Viola, 2005).

Existem quatro vias para a biossíntese de ALA: a via do ácido D-galacturônico (Agius *et al.*, 2003), a via do mio-inositol (Lorence *et al.*, 2004), a da L-gulose (Wolucka & Montagu, 2003) e, a maior rota de biossíntese do ascorbato, a via Smirnoff-Wheeler, elucidada completamente em 2007 (Lister *et al.*, 2007) (Figura 2). Todas as enzimas desta via já foram identificadas. O gene *GME* codifica uma enzima que catalisa a epimerização reversível de GDP-D-manose em GDP-L-galactose (Wolucka & Montagu, 2003), enquanto que a proteína codificada pelo gene *VTC2* converte GDP-L-galactose a L-gactose-1-fosfato (Lister *et al.*, 2007). Finalmente, a enzima referente ao gene *VTC4* hidrolisa L-galactose-1-fosfato a L-galactose (Torabinejad *et al.*, 2009).

ALA, uma vez usado, pode ser regenerado através do ciclo do ascorbato-glutationa (Figura 3). Primeiramente, através da enzima APX, peróxido de hidrogênio é eliminado via oxidação de ALA. Este processo dá origem a um radical de vida curta muito estável, o monodehidroascorbato (MDHA). Este radical pode sofrer dismutação espontânea com outra molécula de MDHA, originando dehidroascorbato (DHA) e ALA. DHA, por sua vez, pode ser reciclado em ALA pela enzima dehidroascorbato redutase (DHAR) a partir de elétrons de glutaciona, NADH e NADPH. Dessa forma, o conteúdo de ALA bem como seu estado redox podem ser mantidos, os quais são críticos em condições de estresse oxidativo e alta intensidade de luz (Gallie, 2013).

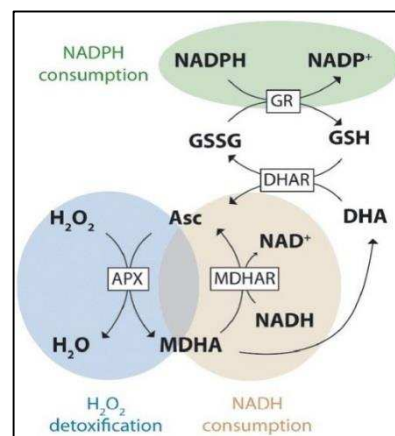


Figura 3. Ciclo do L-ascorbato-glutationa (Gest *et al.*, 2013).

O ácido L-ascórbico é utilizado em larga escala em alimentos e bebidas (50% da produção total); em ração para animais (13%); em formulações farmacêuticas (30%); em aplicações cosméticas (5%) entre outros (2%) (Chotani *et al.*, 2000; Hancock, 2009). Com uma produção mundial estimada em 154.000 toneladas por ano, o mercado de vitamina C tem se tornando cada vez mais competitivo (Hancock, 2009). Quando sua produção comercial começou, em 1935, o valor do quilograma era US\$ 100,00, tornando o processo altamente lucrativo. Com a síntese proposta pelos chineses em 1969, o preço passou para US\$ 3,00 o quilograma no início dos anos

2000, mas, atualmente, seu preço no mercado varia entre US\$ 6,00 a US\$ 11,00 por quilograma, com um lucro de mais de 600 milhões de dólares (Bremus *et al.*, 2006; Hancock, 2009).

A produção industrial de ALA pode ocorrer por síntese química, fermentativa e por métodos mistos de ambos. Uma das formas de produzir esta vitamina se dá por meio do “processo Reichstein” (Reichstein & Grüssner, 1934), através do qual parte considerável da vitamina é produzida. Este processo usa um método misto que consiste em uma etapa fermentativa (oxidação de D-sorbitol em L-sorbose por *Gluconobacter oxydans*) e uma rota química (de seis etapas), obtendo um rendimento final de 50% (p/v). Como desvantagens de tal via, tem-se o elevado consumo de energia e necessidade de altas temperaturas e pressões em alguns passos do processo, além de ser um processo poluente (Hancock, 2009) (Figura 4).

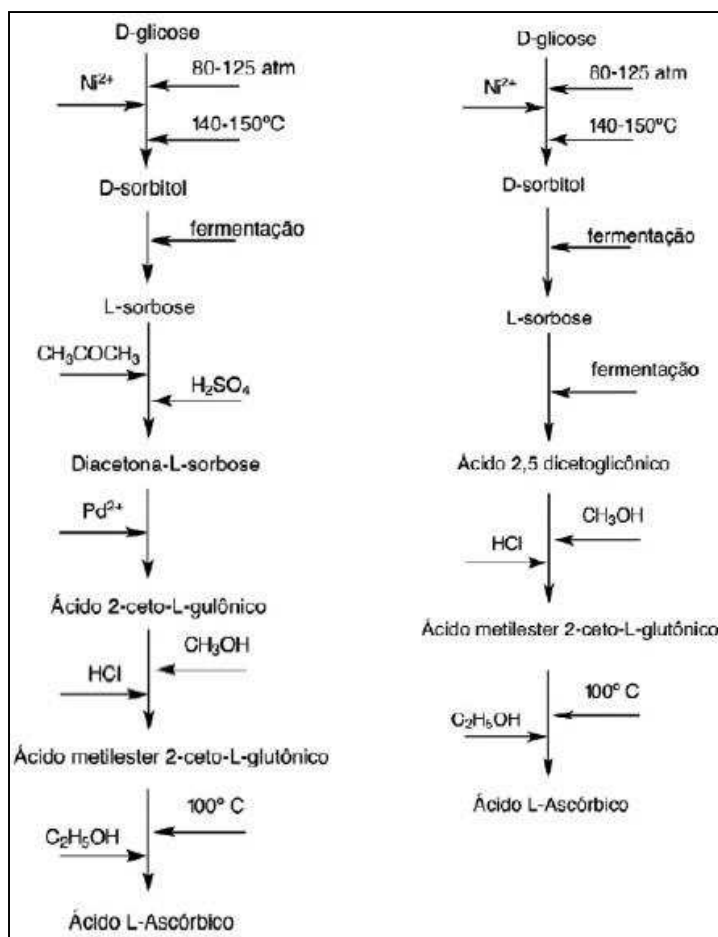


Figura 4. Esquemas de produção de ácido L-ascórbico. A) método Reichstein. B) método de dupla fermentação.

Um processo alternativo de produzir ALA envolve a utilização de micro-organismos, em que uma segunda etapa fermentativa substitui parte das etapas da rota química presente no processo Reichstein e tem o ácido 2-ceto-L-gulônico (2-KLGA) como um intermediário chave. Este método foi desenvolvido em 1969 por cientistas chineses (suprindo 80% do consumo mundial da vitamina) e é composto por cultura mista, contendo, por exemplo, micro-organismos do gênero *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Corynebacterium*. A mistura celular é capaz de converter 92% (p/v) de L-sorbose em 180 toneladas do produto fermentativo (Boudrant, 1990; Chotani *et al.*, 2000; Bremus *et al.*, 2006). A figura 4 ilustra os dois processos mencionados.

Muitos sistemas de bioconversão inovadores têm sido propostos com a finalidade de simplificar o método Reichstein, dominador do mercado há mais de 60 anos. Neste sentido, outras formas de produzir vitamina C são possíveis por meio de linhagens geneticamente engenheiradas. Estudos anteriores mostraram que *G. oxydans* transformado com o gene da enzima 2,5-diceto-D-gluconato redutase foi capaz de produzir 40,00 g/L de 2-KLGA (Shinjoh, 1995) e 130,00 g/L do mesmo produto (Saito *et al.*, 1997). Linhagens recombinantes de *Erwinia herbicola*, por sua vez, sintetizaram 120 gramas a cada 12 moléculas de 2-KLGA a partir de D-glicose diretamente (Chotani *et al.*, 2000). *Pseudomonas putida* com os genes recombinantes das enzimas L-sorbose, L-sorbose e sorbitol desidrogenases obtida na pesquisa de Shibata *et al.* (2000) obteve um rendimento final de 16,00 g/L de 2-KLGA. Nenhuma destas linhagens, no entanto, foi capaz de converter diretamente D-glicose, D-sorbitol ou seus produtos de oxidação diretamente a ALA.

Tendo este problema em vista, foi reportado no estudo de Berry *et al.* (2005) a transformação de *G. oxydans* com o gene que codifica a enzima L-sorbose desidrogenase (que converte 2-KLGA a ALA), a qual alcançou a produção de 4,20 g/L de ALA. Mais recentemente, Cai *et al.* (2012) transformaram *Ketogulonigenium vulgare* (uma das linhagens de *G. oxydans* que é capaz de oxidar L-gulose a ALA) com os genes da via de biossíntese do folato, o qual estimula a produção de 2-KLGA, obtendo um rendimento oito vezes maior do que o que foi obtido com as linhagens selvagens.

1.3 Síntese de ALA por leveduras genética e metabolicamente engenheiradas

Na sua origem e evolução, leveduras não sintetizam ALA. Entretanto, elas produzem um análogo a esta substância: o ácido D-eritorascórbico (ADEA), comum em espécies dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, sugerindo que a síntese do mesmo evoluiu em um ancestral comum dos fungos (Baroja-Mazo *et al.*, 2005). ADEA possui uma estrutura distinta da de ALA e propriedades semelhantes a ele, como seu poder antioxidante. Porém, este composto não tem a atividade antiescorbútica, o que o desvaloriza no âmbito comercial, além de ocorrer em baixas concentrações intracelulares (Davies *et al.*, 1991; Bremus *et al.*, 2006; Branduardi *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2013). Como se pode observar na figura 5, os últimos dois passos na via de biossíntese de ADEA são semelhantes à via de produção de ALA em plantas, pois os motivos estruturais das moléculas alterados durante a formação do primeiro são idênticos àqueles vistos na síntese do segundo (Bremus *et al.*, 2006; Lister *et al.*, 2007; Torabinejad *et al.*, 2009).

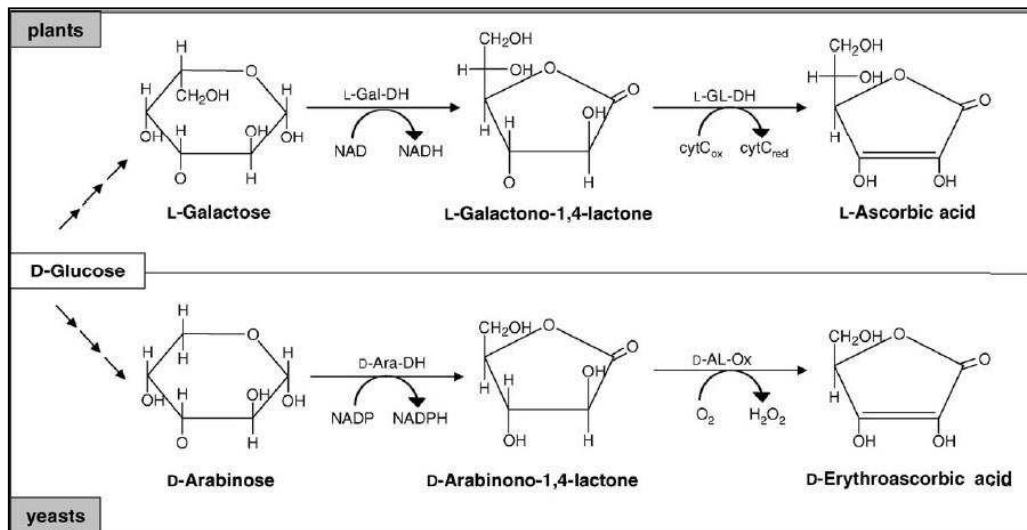


Figura 5. Comparação entre as vias de biossíntese de ALA, em plantas, e ADEA, em leveduras (Bremus *et al.*, 2006).

Sauer *et al.*, em 2004, publicaram um trabalho em que tanto *Saccharomyces cerevisiae* quanto *Zygosaccharomyces bailii* foram geneticamente modificadas de maneira que a superprodução das enzimas das duas etapas finais da via de

biossíntese de ADEA levou à produção de ALA (100,00 mg/L) usando L-galactose como substrato.

Entretanto, devido ao alto custo financeiro de L-galactose - R\$ 7.090,00 cada grama (Sigma Aldrich, 2013) - e à incapacidade de leveduras o produzirem, pesquisas que usassem leveduras com a habilidade de converter um substrato economicamente viável em L-galactose seriam necessárias. Assim sendo, Hancock *et al.* (2006) mostraram a produção de ALA por *S. cerevisiae* transformada com genes de enzimas isoladas de bactérias que são capazes de converter L-sorbose a L-galactose (tagose isomerase de *Pseudomonas* sp., L-fucose de *Escherichia coli*) cultivada em meio com o substrato L-sorbose. Todavia, tal trabalho não obteve sucesso devido, provavelmente, à baixa especificidade da enzima causada por competição do sítio ativo entre metabólitos endógenos e o substrato, prevenindo a síntese do intermediário de interesse.

Branduardi *et al.* (2007), por sua vez, transformaram as linhagens GRF18U e BY4742 de *S. cerevisiae* com o gene *AtME* (*Arabidopsis thaliana* manose epimerase), que converte GDP-D-manose em GDP-L-galactose, e com *AtMIP/VTC4* (*A. thaliana* mio-inositol fosfatase / L-galactose-1-P-fosfatase), que transforma L-galactose-1-P em L-galactose. A maior quantidade de ALA obtido em tal estudo foi de 0,10 mg/L, aproximadamente. Apesar de os rendimentos de ALA terem sido baixos para representar um processo industrial viável, o aumento do teor de antioxidante celular melhorou a resistência ao estresse das linhagens engenheiradas. Em 2011, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que o acúmulo de ALA intracelular poderia ser melhorado quando a levedura expressou a via biossintética de ALA completa de planta através da reciclagem de seus produtos de oxidação. Neste estudo, foi conseguida a produção de 0,60 mg/L de ALA (Fossati *et al.*, 2011).

Rosa e colaboradores (2013), por sua vez, realizaram um estudo usando a levedura *Kluyveromyces lactis*, cujo habitat natural é diverso, sendo muitas linhagens isoladas de leite e derivados. Embora seja uma levedura de brotamento pertencente ao grupo dos ascomicetos estreitamente relacionada com *S. cerevisiae*, *K. lactis* se tornou uma alternativa atraente devido ao modelo metabólico e propriedades fisiológicas distintas. Constitui um micro-organismo aeróbio respiro-fermentativo, que pode assimilar uma ampla variedade de fontes de carbono, tais como lactose e outros substratos da respiração. Uma vez que *K. lactis* é capaz de crescer em densidades

1.4 Estratégias para aumentar a síntese de ALA numa levedura metabolicamente engenheirada

Atualmente, um constante desafio para a indústria é maximizar a produtividade de uma substância de interesse. Nos processos biotecnológicos, diferentes micro-organismos podem ser explorados, como vimos anteriormente, e a grande diversidade de reações metabólicas que eles possuem representa um rico repertório para o desenvolvimento dos processos de conversão química que levam à produção eficiente de produtos desejáveis, como o ALA. Entretanto, frequentemente, micro-organismos que produzem uma substância de interesse têm baixos rendimento e produtividade. Com o intuito de estabelecer um processo viável economicamente, é necessário melhorar o desempenho do micro-organismo (Graf *et al.*, 2009; Otero & Nielsen, 2009; Idiris, 2010).

Neste contexto, tem-se observado um renovado interesse em cultura contínua ultimamente, ligado fortemente ao advento de tecnologias de alta densidade de informação (as “ômicas”) e à conseqüente necessidade de condições controladas rigorosamente e reprodutíveis para o crescimento microbiológico (Bull, 2010). Como aplicação desta técnica para o âmbito industrial, podemos destacar o trabalho de Turcot *et al.* (2008), em que culturas contínuas foram realizadas com uma linhagem de *Escherichia coli* sob limitação de diferentes nutrientes (glicose, enxofre, nitrogênio e fosfato), acarretando um aumento do rendimento do biocombustível hidrogênio à medida em que as taxas de diluição eram diminuídas. Existem também pesquisas relatando que o fungo filamentosso *Penicillium brevicompactum*, quando cultivado em regime contínuo, foi capaz de obter rendimento e produtividade do ácido micofenólico (antibiótico e imunossupressor) maiores do que em batelada (Ardestani *et al.*, 2010). Ethier *et al.* (2011), por sua vez, mostrou que, utilizando glicerol bruto – produto da indústria de biodiesel – como substrato, o rendimento do ácido docosaheptaenóico (rico em ômega 3) pela microalga *Schizochytrium limacinum* foi favorecido com o aumento do fluxo de alimentação e descarga do meio.

Estudos exibindo leveduras sob cultura contínua também são frequentes. *Pichia pastoris*, por exemplo, foi cultivada em culturas contínuas no intuito de aumentar a produção de anticorpos com fragmento variável de cadeia única (Yamawaki *et al.*, 2007), tripsinogênio (Paulová *et al.*, 2012) e poligalacturonato liase

alcalina (Wang *et al.*, 2012). A técnica foi usada também com esta espécie quando a finalidade foi conhecer a regulação e secreção protéica, *mating* e resposta ao estresse em diferentes taxas de crescimento (Rebnegger *et al.*, 2014). Além destes, diversos outros trabalhos abordam tal técnica, objetivando melhorar a produção de um composto de interesse por micro-organismos (Silva *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007; Govindaswamy & Vane, 2010; Rittmann *et al.*, 2012; Rodríguez-Carmona *et al.*, 2012; Gharibzahedi *et al.*, 2013; Feria-Gervasio *et al.*, 2014). No que tange a síntese de ALA, estudos realizados por Takagi *et al.* (2009, 2010) mostram que a produção de 2-KGA, intermediário chave da síntese química de ALA, foi melhorada significativamente no momento em que a cultura mista de linhagens de *K. vulgare* e *Bacillus megaterium* foi mantida sob *steady state*, obtendo um rendimento final de 90 g/L de 2-KGA.

Neste sentido, a utilização da cultura contínua no intuito de aumentar a produção de ALA por *K. lactis* metabolicamente engenheirada se torna de extrema relevância no presente estudo. Como GDP-D-manose é um intermediário em comum na via de biossíntese de ALA e na via de formação da parede celular (Uccelletti *et al.*, 2006; Backhaus *et al.*, 2010, 2011; Xie *et al.*, 2010), é possível que ambas as rotas compitam por este intermediário. Para desacoplar a síntese de vitamina C da via de construção da parede, seria necessário utilizar a cultura contínua das linhagens recombinantes de *K. lactis* obtidas no trabalho de Rosa *et al.* (2013), de forma que o crescimento celular seja limitado através do fluxo de entrada e de saída de meio de cultura imposto, desestimulando a formação da estrutura.

Como abordado anteriormente, ALA é um poderoso antioxidante por doar elétrons, devido a sua capacidade de deslocá-los em volta do anel do carbono 5. Além disso, seu potencial de oxirredução lhe confere a habilidade de interagir com diversas espécies reativas de oxigênio, podendo neutralizá-las e reparar moléculas orgânicas oxidadas (Gest *et al.*, 2013). Assim sendo, é possível que linhagens de *K. lactis* metabolicamente engenheiradas com a via que leva à formação de ALA (Rosa *et al.*, 2013) sintetizem maiores quantidades de tal vitamina quando desafiadas ao serem submetidas a um agente oxidante, levando ao aumento da produção de ALA.

Além disso, o composto menadiona tem sido utilizado em vários estudos com micro-organismos expostos a estresse oxidativo, porque gera facilmente espécies reativas de oxigênio (ROS) (Smirnova *et al.*, 2000; Kreiner *et al.*, 2002; Chumnantana *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011;

Pusztahelyi *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013; Tongul & Tarhan, in press). O mecanismo pelo qual ocorre tal geração consiste na redução de um elétron da quinona, levando à formação da semiquinona. A semiquinona é auto-oxidada em condições aeróbicas de volta para quinona. Os subprodutos desta reação são as espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio *singlet*, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, o mais prejudicial (Mauzeroll *et al.*, 2004; Criddle *et al.*, 2006).

Em um ambiente em que haja estresse oxidativo por este composto, micro-organismos com a capacidade de sintetizar uma substância antioxidante possuirá uma vantagem seletiva. Diversos exemplos podem ser vistos na literatura comparando a presença de estresse oxidativo com o aumento da produção de uma substância antioxidante ou um composto de interesse relacionado a este estresse: glutatona pela levedura *Candida utilis* (Liang *et al.*, 2009); riboflavina pelo fungo filamentoso *Ashbya gossypii* (Kavitha & Chandra, 2009); quitosanase pela bactéria *Streptomyces griseus* (Ngo *et al.*, 2009); e carotenoides pelo fungo fitopatogênico *Blakeslea trispora* (Nanou *et al.*, 2011).

A síntese de ALA por meio das linhagens recombinantes de *K. lactis* pode ainda ser obtida através da utilização do soro de queijo ultrafiltrado, subproduto de indústrias de queijo de Minas Gerais, como fornecedor de substrato. Este soro é resultado da ultrafiltração do queijo e contém elevada concentração de compostos orgânicos, tais como lactose (dissacarídeo constituído de glicose e galactose, correspondendo cerca de 70% de sólidos totais) e proteínas (aproximadamente 20% de sólidos totais, sendo principalmente α -lactalbumina e β -lactoglobulina), pois as proteínas importantes na nutrição humana são recuperadas, deixando o permeado pobre em nitrogênio e rico em lactose. Neste sentido, ele apresenta um valor elevado de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) durante o tratamento de águas residuais. Sustentavelmente falando, o soro de queijo ultrafiltrado se torna, então, uma fonte adequada para a obtenção de uma rica fonte de carbono, devido ao seu valor nutritivo e funcional. (Yang e Silva, 1995; Siso, 1996; Sansonetti *et al.*, 2009). Assim sendo, explorar a capacidade de fermentação de *Kluyveromyces lactis* por meio da conversão de lactose do soro de queijo em compostos industriais valiosos, como ALA, por meio das duas estratégias fisiológicas mencionadas constitui um projeto promissor de grande interesse social e econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M. A. & Valpuesta, V. Engineering Increased Vitamin C Levels in Plants by Overexpression of a D-Galacturonic Acid Reductase. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 177-181, 2003.
- Ardestani, F., Fatemi, S. S., Yakhchali, B. & Hosseyni, S. M. Evaluation of Mycophenolic Acid Production by *Penicillium brevicompactum* MUCL 19011 in Batch and Continuous Submerged Cultures. *Biochemical Engineering Journal*, v. 50, p. 99-103, 2010.
- Backhaus, K., Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Purschke, G., Koster, C. G., Klis, F. M. & Heinisch, J. J. A Systematic Study of the Cell Wall Composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, v. 27, p. 647-660, 2010.
- Backhaus, K., Buchwald, U., Heppeler, N., Schmitz, H. P., Rodicio, R. & Heinisch, J. J. Milk and Sugar: Regulation of Cell Wall Synthesis in the Milk Yeast *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Cell Biology*, v. 90, p. 745-750, 2011.
- Baroja-Mazo, A., Valle, P., Rúa, J., Cima, S., Busto, F., Arriaga, D. & Smirnov, N. Characterisation and Biosynthesis of D-Erythroascorbic Acid in *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, p. 390-402, 2005.
- Berry, A., Lee, C., Mayer, A. F. & Shinjoh, M. Microbiol Production os L-Ascorbic Acid. *World Intellectual Property Organisation Patent WO 2005/017172*, 2005.
- Boudrant, J. Microbial Processes for Ascorbic Acid Biosynthesis: a Review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 12, n. 5, p. 322-329, 1990.
- Bowman, G. L. Ascorbic Acid, Cognitive Function, and Alzheimer's Disease: a Current Review and Future Direction. *BioFactors*, p. 114-122, 2012.
- Branduardi, P., Fossati, T., Sauer, M., Pagani, R., Mattanovich, D. & Porro, D. Biosynthesis of Vitamin C by Yeast Leads to Increased Stress Resistance. *Plos One*, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2007.

Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. The Use of Microorganisms in L-Ascorbic Acid Production. *Journal of Biotechnology*, v. 124, p. 196-205, 2006.

Bull, A. T. The Renaissance of Continuous Culture in The Post-Genomic Age. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 993-1021, 2010.

Cai, L., Yuan, M. Q., Li, Z. J., Chen, J. C. & Chen, G. Q. Genetic Engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for Enhanced Production of 2-Keto-L-Gulonic Acid. *Journal of Biotechnology*, v. 157, p. 320-325, 2012.

Carpenter, K. J. The Discovery of Vitamin C. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v. 61, p. 259-264, 2012.

Castro, F. A. V., Herdeiro, R. S., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A. & Pereira, M. D. Menadione Stress in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Deficient in the Glutathione Transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 213-220, 2007.

Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W. & Sanford, K. The Commercial Production of Chemicals Using Pathway Engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1543, p. 434-455, 2000.

Chumnantana, R., Yokochi, N. & Yagi, T. Vitamin B6 Compounds Prevent the Death of Yeast Cells Due to Menadione, a Reactive Oxygen Generator. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1722, p. 84- 91, 2005.

Criddle, D. N., Gillies, S., Baumgartner-Wilson, H. K., Jaffar, M., Chinje, E. C., Passmore, S., Chvanov, M., Barrow, S., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., Sutton, R. & Petersen, O. H. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 21, n. 52, p. 40485–40492, 2006.

Davies, M. B., Austin, J. & Partridge, D. A. Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry. *The Royal Society of Chemistry*, 1991 .

Du, J., Cullen, J. J. & Buettner, G. R. Ascorbic Acid: Chemistry, Biology and the Treatment of Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1826, p. 443-457, 2012.

Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D. & Wen, Z. Continuous Culture of the Microalgae *Schizochytrium limcinum* on Biodiesel-Derived Crude Glycerol for Production Docosaehaenoic Acid. *Bioresiurce Technology*, v. 102, p. 88-93, 2011.

Food and Drug Administration. (18 de Abril de 2013). Acesso em 22 de Abril de 2013, disponível em Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov>.

Fossati, T., Solinas, N., Porro, D. & Branduardi, P. L-ascorbic Acid Producing Yeasts Learn from Plants How to Recycle It. *Metabolic Engineering*, p. 177–185, 2011.

Fukumura, H., Sato, M., Kezuba, K., Sato, I., Xianfeng, Okumura, S., Fujita, T., Yokoyama, U., Eguchi, H., Ishikawa, Y. & Saito, T. Effect of Ascorbic Acid on Reactive Oxygen Species Production in Chemotherapy and Hyperthermia in Prostate Cancer Cells. *The Journal of Physiological Sciences*, v. 62, p. 251-257, 2012.

Gallie, D. R. The Role of L-Ascorbic Acid Recycling in Responding to Environmental Stress and in Promoting Plant Growth. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 433-443, 2013.

Génolevures. (25 de Novembro de 2012). Acesso em 22 de Abril de 2013, disponível em Génolevures: <http://genolevures.org/klla.html>.

Gest, N., Gautier, H. & Stevens, R. Ascorbate as Seen Through Plant Evolution: the Rise of a Successful Molecule? *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 1, p. 33-53, 2013.

Graf, A., Dragosits, M., Gasser, B. & Mattanovich, D. Yeast Systems Biotechnology for the Production of Heterologous Proteins. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 335-348, 2009.

Hancock, R. D. Recent Patents on Vitamin C: Opportunities for Crop Improvement and Single-Step Biological Manufacture. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, v. 1, p. 39-49, 2009.

Hancock, R. D., Hunter, G. D., Shaw, J. & Viola, R. A Method for Production of L-Ascorbic Acid. *World Intellectual Property Organisation Patent*, WO 2006/06134374, 2006.

Hancock, R. D. & Viola, R. Biosynthesis and Catabolism of L-Ascorbic Acid in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 24, p. 167-188, 2005.

Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H. & Takegawa, K. Engineering of Protein Secretion in Yeast: Strategies and Impact on Protein Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, p. 403-417, 2010.

Kavitha, S. & Chandra, T. S. Effect of Vitamin E and Menadione Supplementation on Riboflavina Production and Stress Parameters in *Ashbya gossypii*. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 934-938, 2009.

Kim, I.S., Yun, H., Jin, I. & Yoon, H. S. Cyclophilin A Cpr1 Protein Modulates the Response of Antioxidant Molecules to Menadione-Induced Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377Y. *Public Health and Research Perspectives*, v. 2, n. 3, p. 171-177, 2011.

Kojo, S. Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 1041-1064, 2004.

Kreiner, M., Harvey, L. M. & McNei, B. Oxidative Stress Response of a Recombinant *Aspergillus niger* to Exogenous Menadione and H₂O₂ Addition. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 346-353, 2002.

Liang, G., Liao, X., Du, G. & Chen, J. A New Strategy to Enhance Glutathione Production by Multiple H₂O₂-Induced Oxidative Stresses in *Candida utilis*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 350-355, 2009.

Lister, C. L., Gomes, T. A., Christensen, K. C., Adler, L. N., Yong, B. D., Brenner, C. & Clarke, S. G. Arabidopsis VTC2 Encodes a GDP-L-Galactose Phosphorilase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheller Pathway to Ascorbic Acid in PLants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 26, p. 18879-18885, 2007.

Lorence, A., Chevone, B. I., Mendes, P. & Nessler, C. L. Myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1200-1205, 2004.

Masaki, H. Role of Antioxidants in the Skin: Anti-Aging Effects. *Journal of Dermatological Science*, v. 58, p. 85-90, 2010.

Mauzeroll, J., Bard, A. J., Owhadian, O. & Monks, T. J. Menadione Metabolism to Thiodione in Hepatoblastoma by Scanning Electrochemical Microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 17582–17587, 2004.

Moretti, M., Budni, J., Freitas, A. E., Rosa, P. B. & Rodrigues, A. L. S. Antidepressant-Like Effect of Ascorbic Acid is Associated with the Modulation of Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Journal of Psychiatric Research*, v. 48, p. 16-24, 2014.

Nanou, K., Roukas, T. & Papadakis, E. Oxidative Stress and Morphological Changes in *Blakeslea trispora* Induced by Enhanced Aeration During Carotene Production in a Bubble Column Reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, p. 172-177, 2011.

Ngo, K. X., Umakoshi, H., Ishii, H., Bui, H. T., Shimanouchi, T. & Kuboi, R. Oxidative/Heat Stress Enhanced Production of Chitosanase from *Streptomyces griseus* Cells Through Its Interaction with Liposome. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 108, n. 6, p. 471-476, 2009.

Otero, J. E. & Nielsen, J. Industrial Systems Biology. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 105, n. 3, p. 439-460, 2009.

Paulová, L., Hyka, P., Branská, B., Melzoch, K. & Kovar, K. Use of a Mixture of Glucose and Methanol as Substrates for the Production of Recombinant Trypsinogen in Continuous Cultures with *Pichia pastoris* Mut⁺. *Journal of Biotechnology*, v. 157, p. 180-188, 2012.

Pusztahelyi, T., Klement, E., Szajli, E., Klem, J., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Kovács, S., Orosz, G., Kovács, K. L., Medzihradszky, K. F., Prade, R. A. & Pócsi, I. Comparison of Transcriptional and Translational Changes Caused by Long-Term

Menadione Exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, p. 92-103, 2011.

Rebnegger, C., Graf, A. B., Valli, M., Steiger, M. G. & Gasser, B. In *Pichia pastoris*, Growth Rate Regulates Protein Synthesis and Secretion, Mating and Stress Response. *Biotechnology Journal*, v. 9, 2014.

Reichstein, T & Grüssner, A. Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helvetica Chimica Acta*, v. 17, p. 311-328, 1934.

Rosa, J. C. C., Colombo, L. T., Alvim, M. C. T., Avonce, N., Dijck, P. V. & Passos, F. M. L. Metabolic Engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-Ascorbic Acid (Vitamin C) Biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, v. 12, n. 59, 2013.

Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosoda, J. & Shimomura, K. Cloning of Genes Coding for L-Sorbose and L-Sorbosone Dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and Microbial Production of 2-Keto-L-Gulonate, a Precursor of L-Ascorbic Acid, in a Recombinant *G. oxydans* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 2, p. 454-460, 1997.

Sansonetti S.; Curcio, S.; Calabro, V. & Iorio, G. Bio-ethanol Production by Fermentation of Ricotta Cheese Whey as an Effective Alternative Non-Vegetable Source. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1687-1692, 2009.

Sauer, M., Branduardi, P., Valli, M. & Porro, D. Production of L-Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 10, p. 6086-6091, 2004.

Shinoh, M., Tomiyama, N., Asakura, A. & Hoshino, T. Cloning and Nucleotide Sequencing of the Membrane-Bound L-Sorbosone Dehydrogenase Gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 And Its Expression in *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 413-420, 1995.

Sigma Aldrich. Acesso em 26 de Junho de 2013, disponível em Sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>.

Siso, M. I. The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: a Review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

Smirnoff, N. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany*, v. 78, p. 661-669, 1996.

Shibata, T., Ichikawa, C., Matsuura, M., Takata, Y., Noguchi, Y., Saito, Y. & Yamashita, M. Metabolic Engineering Study on the Direct Fermentation of 2-Keto-L-Gulonic Acid, a Key Intermediate of L-Ascorbic Acid In *Pseudomonas putida* IFO3738. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 2, p. 223-225, 2000.

Smirnova, G. V., Muzyka, N. G., Glukhovchenko, M. N. & Oktyabrsky, O. N. Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing *Escherichia coli*. *Free Radical Biology & Medicine*, V. 28 (7), p. 1009-1016, 2000.

Takagi, Y., Sugisawa, T. & Hoshino, T. Continuous 2-Keto-L-Gulonic Acid Fermentation from L-Sorbose by *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, p. 1049-1056, 2009.

Takagi, Y., Sugisawa, T. & Hoshino, T. Continuous 2-Keto-L-Gulonic Acid Fermentation by Mixed Culture of *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025 and *Bacillus megaterium* or *Xanthomonas maltophilia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, p. 469-480, 2010.

Tongul, B. & Tarhan, L. The Effect of Menadione-Induced Oxidative Stress on the *in Vivo* Reactive Oxygen Species and Antioxidant Response System of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, in press.

Torabinejad, J., Donahue, J. L., Gunsekera, B. N., Allen-Daniels, M. J. & Gillaspay, G. E. VTC4 is a Bifunctional Enzyme That Affects Myoinositol and Ascorbate Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology*, v. 150, p. 951-961, 2009.

Turcot, J., Bisailon, A. & Hallenbeck, P. C. Hydrogen Production by Continuous Cultures of *Escherichia coli* Under Different Nutrient Regimes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1464-1470, 2008.

Uccelletti, U., Farina, F., Rufini, S., Magnelli, P., Abeijon, C. & Palleschi, C. The *Kluyveromyces lactis* α 1,6-Mannosyltransferase KIOch1p is Required for Cell-wall Organization and Proper Functioning of the Secretory Pathway. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 449–457, 2006.

Wang, H., Li, J., Liu, L., Li, X., Jia, D., Du, G. & Chen, J. Increased Production of Alkaline Polygalacturonate Lyase in the Recombinant *Pichia pastoris* by Controlling Cell Concentration During Continuous Culture. *Bioresource Technology*, v. 124, p. 338-346, 2012.

Wolucka, B. A. & Montagu, M. V. GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-Gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 48, p. 47483-47490, 2003.

Xie, X. & Lipke, P. N. On the Evolution of Fungal and Yeast Cell Walls. *Yeast*, v. 27, p. 479-488, 2010.

Yamawaki, S., Matsumoto, T., Ohnishi, Y., Kumada, Y., Shiomi, N., Katsuda, T., Lee, E. K., Katoh, S. Production of Single-Chain Variable Fragment Antibody (scFv) in Fed-Batch and Continuous Culture of *Pichia pastoris* by Two Different Methanol Feeding Methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 104, n. 5, p. 403-407, 2007.

Yan, G., Hua, Z., Liu, D., Du, G. & Chen, J. Influence of Oxygen Level on Oxidative Stress Response of *Bacillus* sp. F26 to Menadione. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 764-769, 2006.

Yang, S., & Silva, E. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.

Zhao, J., Wang, Z., Wang, M., Wang, H., He, Q. & Zhang, H. The Interaction Mechanisms between *Saccharomyces cerevisiae* and Menadione and Its Application in Toxicology Study. *Talanta*, v. 74, p. 1686-1691, 2008.

Zhu, J., Yu, X., Xie, B., Gu, B., Zhang, Z. & Li, S. Transcriptomic Profiling-Based Mutant Screen Reveals Three New Transcription Factors Mediating Menadione Resistance in *Neurospora crassa*. *Fungal Biology*, v. 117, p. 422-430, 2013.

CAPÍTULO 2

Condições fisiológicas que favorecem a síntese de ácido L-ascórbico (vitamina C) por culturas de *Kluyveromyces lactis* metabolicamente engenheirada

Palavras-chave: *Kluyveromyces lactis*, ácido L-ascórbico, cultura contínua, GDP-D-manose, estresse oxidativo.

Condições Fisiológicas que favorecem a síntese de ácido L-ascórbico (vitamina C) por culturas de *Kluyveromyces lactis* metabolicamente engenheirada

RESUMO

O ácido L-ascórbico (ALA) é produzido naturalmente por plantas a partir de D-glicose. Leveduras sintetizam um metabólito semelhante, o ácido D-eritroascórbico (ADEA). Embora este composto não mostre atividade contra o escorbuto, ele contém uma função antioxidante, mas é produzido pelo micro-organismo em baixas concentrações. Recentemente, com a finalidade de fazer as leveduras serem capazes de converter o componente D-galactose da D-lactose do soro de queijo em ALA, a linhagem selvagem de *Kluyveromyces lactis* CBS2359 foi transformada com genes, que integram a via de biossíntese de L-galactose, isolados de *Arabidopsis thaliana*. Na presença do intermediário L-galactose, ALA pode então ser sintetizado pela levedura com as enzimas responsáveis pela produção de ADEA. Foi demonstrado que a linhagem engenheirada JVC 1-56 foi capaz de sintetizar ALA em comparação com a selvagem, mas com baixo rendimento. Neste sentido, estudos que auxiliem o aumento da produção de ALA são relevantes. Uma vez que a via engenheirada da síntese de ALA e a via nativa da formação da parede celular de *K. lactis* possuem um intermediário comum, GDP-D-manose, faz-se necessário avaliar o efeito do desacoplamento da produção de ALA do crescimento que requer constante síntese da parede. Além disso, considerando a propriedade antioxidante do ALA, a expectativa é de que a produção deste metabólito aumentasse quando JVC 1-56 fosse exposta a uma condição de estresse oxidativo por menadiona. Neste contexto, este trabalho investigou as condições fisiológicas mencionadas utilizando os meios Yeast Galactose Base (YGB) e soro de queijo ultrafiltrado (SQU - subproduto de indústrias de queijo em que predomina lactose como fonte de carbono). Foi averiguado que *Kluyveromyces lactis* JVC 1-56 produz ALA com rendimentos maiores quando cultivada por 96 horas em batelada no meio YPGal. O cultivo em baixas velocidades de crescimento ($0,04 \text{ h}^{-1}$) predispõe as células a sintetizar mais ALA por unidade de massa celular (0,80 mg/mg). Entretanto, o rendimento da cultura contínua operada como quimostato, tendo nitrogênio como substrato limitante, ainda mostrou ser inferior

ao previsto na batelada (1,94 mg/mg). Já o estresse oxidativo por 12,5 μ M de menadiona sobre *K. lactis* JVC1-56, nas condições aplicadas, não foi eficaz no aumento da produção de ALA (1,47 mg/mg). Ainda, o rendimento de ADEA foi superior ao de ALA nas duas estratégias: 1,37 mg/mg a 0,21 h⁻¹ na cultura sob regime permanente, 8,52 mg/mg na batelada sob estresse oxidativo e 10,33 mg/mg na batelada na ausência do agente oxidante, indicando que ele pode estar em uma configuração mais estável do que a vitamina C. Finalmente, o permeado do soro de queijo continua sendo uma perspectiva para a conversão da lactose em um produto biotecnológico de maior valor agregado.

1. Introdução

O ácido L-ascórbico (ALA), ou vitamina C, é produzido naturalmente por plantas a partir de D-glicose, sendo uma das vitaminas mais usadas na terapia preventiva, pois é considerada antioxidante, cofator de diversas enzimas de oxidação além de auxiliar no transporte de elétrons (Smirnoff, 1996; Kojo, 2004; Masaki, 2010).

Na indústria, o ácido L-ascórbico é utilizado em larga escala em alimentos e bebidas (50% da produção total), em ração para animais (13%), em formulações farmacêuticas (30%), em aplicações cosméticas (5%) e em outros (2%) (Chotani *et al.*, 2000; Hancock, 2009). Com a produção mundial estimada em 154.000 toneladas por ano, o mercado de vitamina C está se tornando cada vez mais competitivo (Hancock, 2009).

Atualmente, a síntese química domina a produção desta vitamina, todavia o processo químico de produção apresenta algumas desvantagens, tais como o elevado consumo de energia e o emprego de altas temperaturas e pressões em algumas etapas do processo (Boudrant, 1990; Chotani *et al.*, 2000; Bremus *et al.*, 2006). No intuito de desenvolver um processo biotecnológico de produção de ALA, alternativo ao processo químico, alguns micro-organismos produtores de vitamina C vêm ganhando destaque (Shinjoh, 1995; Saito, *et al.*, 1997; Chotani *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2012). Dentre esses estudos ressaltam-se aqueles com micro-organismos recombinantes que expressam genes que codificam enzimas da via de biossíntese da vitamina C em plantas, mas que requerem o intermediário L-galactose, um substrato raro e de alto custo financeiro (Sauer *et al.*, 2004).

Embora leveduras não sintetizem ALA, elas produzem em baixas concentrações intracelulares um análogo, o ácido D-eritroascórbico (ADEA), (Davies *et al.*, 1991; Bremus *et al.*, 2006; Branduardi *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2013). As duas últimas reações de síntese do ácido D-eritroascórbico são as mesmas observadas na via de produção de ALA em plantas: D-arabinose é convertida a D-arabinona-1,4-lactona, a qual é convertida em ADEA. Os motivos estruturais dessas moléculas alterados durante tal conversão são os mesmos que ocorrem na conversão de L-galactose em L-galactona-1,4-lactona e posteriormente em ALA, na via comum em plantas (Bremus *et al.*, 2006; Lister *et al.*, 2007; Torabinejad *et al.*, 2009). Sendo assim,

leveduras transformadas com genes que codificam enzimas que levam à formação de L-galactose [GDP-manose - 3,5 - epimerase (GME), GDP-L-galactose (VTC2) e L-galactose-1-fosfato (VTC4)] permite as linhagens recombinantes produzir ALA pelas duas últimas reações mencionadas. Este é o caso do estudo de Branduardi *et al.* (2007), no qual duas linhagens de *S. cerevisiae* foram transformadas com os genes de *Arabidopsis thaliana*, formando L-galactose. A concentração de ALA obtida foi baixa (0,10 mg/L), mas a presença de antioxidante na levedura melhorou sua resistência ao estresse. Em 2011, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que o acúmulo de ALA intracelular é possível quando a levedura operava a via de reciclagem dos produtos de oxidação de ALA. Neste estudo, foi obtida a produção de 0,60 mg/L de ALA (Fossati *et al.*, 2011).

Recentemente, a levedura *Kluyveromyces lactis* (CBS 2359) foi transformada com os genes de *Arabidopsis thaliana* que codificam as enzimas responsáveis pela síntese de L-galactose (Rosa *et al.*, 2013). A primeira delas é a GDP-manose-3,5-epimerase, em que seu gene codificador (GME) foi clonado no plasmídeo pKLJC/GME, o qual possui o promotor induzível do gene LAC4, associado ao crescimento da levedura em D-galactose ou lactose. As outras duas enzimas são GDP-L-galactose fosforilase (VTC2) e L-galactose-1-fosfato fosfatase (VTC4), cujos genes foram clonados no plasmídeo constitutivo pKIVTc. O trabalho demonstrou que a linhagem engenheirada foi capaz de sintetizar ALA em contraste com o tipo selvagem. Apesar da manipulação genética e metabólica, o rendimento de 14,4 mg/L numa perspectiva de produção industrial ainda é irrelevante.

A via engenheirada de síntese de ALA e a via nativa de formação da parede celular de *K. lactis* possuem um intermediário comum, GDP-D-manose (Uccelletti *et al.*, 2006; Backhaus *et al.*, 2010, 2011; Xie *et al.*, 2010). É possível que numa cultura metabolicamente ativa e em altas taxas de crescimento a GDP-D-manose seja predominantemente requerida para a síntese *de novo* da parede celular. Assim sendo, seria interessante avaliar o efeito do desacoplamento da síntese de vitamina C do crescimento que requer constante síntese da parede. Para tanto, uma cultura com baixas velocidades de crescimento conduzida em regime contínuo das linhagens recombinantes, em que a velocidade de crescimento é reduzida pelo fluxo de entrada de um nutriente limitante, como o nitrogênio, resultaria na disponibilidade de carbono e de GDP-D-manose suficiente para síntese de ALA. O fato de leveduras como *K.*

lactis não sintetizarem o ALA indica que tal metabólito não é essencial para o seu crescimento e manutenção. Considerando a propriedade antioxidante do ALA, é razoável admitir que a produção deste metabólito seja favorecida quando a levedura for exposta a uma condição de estresse oxidativo, como por exemplo, por menadiona, a qual estimula não apenas a formação de peróxido de hidrogênio, mas também de oxigênio *singlet* e do radical hidroxila (Mauzeroll *et al.*, 2004; Criddle *et al.*, 2006).

Neste contexto, o presente trabalho propõe investigar as condições fisiológicas mencionadas anteriormente tendo em vista aumentar a síntese de ALA por linhagens recombinantes de *Kluyveromyces lactis*. Em ambas as condições, além de meio sintético, foi utilizado o permeado do soro de queijo, subproduto de indústrias de queijo de Minas Gerais, rico em lactose, fonte de carbono utilizada por *K. lactis*. Além disso, este subproduto da indústria de queijo é geralmente descartado no ambiente sem tratamento, gerando graves problemas ambientais (Yang e Silva, 1995; Siso, 1996; Sansonetti *et al.*, 2009). Neste sentido, a presente proposta pode abrir perspectivas para o aproveitamento do soro de queijo, aliando o tratamento à obtenção de um produto biotecnológico.

2. Material e Métodos

2.1 Micro-organismos e manutenção

As linhagens de *Kluyveromyces lactis* que foram utilizadas neste estudo foram a transformante JVC 1-56, que expressa os genes GME (GDP-manose-3,5-epimerase), VTC2 (GDP-L-galactose fosforilase) e VTC4 (L-galactose-1-fosfato fosfatase), bem como a linhagem selvagem CBS 2359, como um controle. As células foram mantidas em meio YP [1% (p/v) de extrato de levedura e 2% (p/v) de peptona] com glicerol 50% (v/v) a -80° C e a -20° C, e estriadas em placa com YPD sólido [1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona, glicose a 2% (p/v) e 2% (p/v) ágar] a 4°C. As linhagens foram rotineiramente pré-cultivadas em YPD líquido, por 12 horas, a 30° C sob agitação de 200 rpm.

2.2 Determinação da massa celular seca e velocidade específica máxima de crescimento

Culturas de *K. lactis* JVC 1-56 e CBS 2359 foram inoculadas em 20 mL de meio de cultura *Yeast Galactose Base* (YGB, tamponado com 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 5,5), o qual possui a mesma composição do meio *Yeast Carbon Base* (Sigma-Aldrich), mas contém galactose 2% (v/v) ao invés de glicose, acrescido de sulfato de amônio em diferentes concentrações (variando de 0,05 mM a 40mM). As culturas das duas linhagens também foram inoculadas 20 mL de soro de queijo ultrafiltrado (SQU), o qual possui de 4,8 a 5,0% de lactose e de 0,15 a 0,22% de proteínas na sua composição total (Sansonetti *et al.*, 2009). Todas elas foram incubadas a 30° C sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de 1 hora até 7 horas de cultivo e sua densidade óptica (Abs_{600nm}) foi determinada em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) em absorbância de 600 nm.

As velocidades específicas de crescimento (μ) destas culturas foram determinadas por regressão linear da absorbância e o tempo (em horas). A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) em função da concentração de sulfato de amônio foi

determinada de acordo com o modelo de cinética de Monod (1949), utilizando o software Sigma Plot 11.0.

A massa celular seca foi determinada conforme Diniz *et al.* (2012). Uma unidade $A_{600\text{nm}}$ de JVC 1-56 foi equivalente a 0,50 g/L ($\pm 0,012$) de massa seca em meio de cultura YGB e 0,47 g/L ($\pm 0,003$) de massa seca em SQU. Já uma unidade $A_{600\text{nm}}$ de CBS 2359 correspondeu a 0,51 g/L ($\pm 0,028$) de massa seca em YGB e 0,57 g/L ($\pm 0,046$) de massa seca em SQU.

2.3 Crescimento em baixas velocidades de crescimento

Uma vez determinados os parâmetros cinéticos das linhagens de *K. lactis* em estudo, foram realizados experimentos em cultura contínua em meio YGB limitando-se o nitrogênio (sulfato de amônio 0,5%), e em soro de queijo ultrafiltrado. Admitindo que a via engenheirada de síntese de ALA tem um intermediário comum com a via de síntese da parede celular, reduzir o crescimento celular na presença de carbono suficiente (e de GDP-D-manose conseqüentemente) decorrente da limitação por nitrogênio, pode favorecer a via alternativa engenheirada de síntese de vitamina C. A cultura contínua foi conduzida em um frasco jaquetado de 100 mL (Wheaton® California, USA) contendo 100 mL de cultura, conectado por uma bomba peristáltica a dois recipientes: o de entrada contendo o meio de cultura YGB (ou de SQU), e o de saída da cultura. A cultura foi conduzida a temperatura de 30° C e agitada magneticamente. Fluxos de alimentação e de saída da cultura foram controlados para resultar em velocidades de crescimento abaixo da velocidade máxima previamente determinada, considerando $\mu = D$ e $D = F / V$, em que μ é a velocidade específica de crescimento em h^{-1} , D é a taxa de diluição da cultura (h^{-1}), F é o fluxo de entrada de meio e saída da cultura em L/h e V é o volume em litros. Foram utilizadas velocidades de crescimento correspondentes a $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, e $\frac{1}{8}$ da velocidade máxima ($\mu_{\text{máx}}$) determinada para os meios YGB e SQU. Três alíquotas de 10 mL foram retiradas da cultura contínua de três em três horas e tiveram suas absorvâncias medidas, após a mesma atingir o regime permanente (aproximadamente 10 gerações de iniciada a alimentação). Tais alíquotas foram submetidas à extração e quantificação de ALA e ADEA intracelulares.

2.4 Cinética de inibição do crescimento e estresse oxidativo

As duas linhagens de *K. lactis*, transformante e selvagem, foram cultivadas em batelada em 20 mL de meio de cultura *Yeast Peptone Galactose* (YPGal) ou SQU acrescido de concentrações variando de 1,5 μM a 400,0 μM do oxidante menadiona. As culturas foram incubadas a 30° C sob agitação de 200 rpm, por 16 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de 1 hora até 7 horas de cultivo e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) em absorvância de 600 nm ($\text{Abs}_{600\text{nm}}$), com a finalidade de acompanhar o crescimento populacional da levedura diante do estresse oxidativo.

Para determinar qual a maior concentração do agente oxidante que permite o crescimento estatisticamente significativo das linhagens de *K. lactis*, foi feita a análise da regressão linear entre os valores do logaritmo neperiano das absorvâncias medidas ao longo do tempo (em horas) de cada concentração, com $P < 0,05$, usando o Software R e o pacote ExpDes. Culturas em batelada foram então conduzidas em meio YPGal ou SQU na presença de menadiona na concentração estabelecida. As culturas foram incubadas a 30° C sob agitação de 200 rpm durante 96 horas. Durante este período, alíquotas de 20 mL foram coletadas e submetidas à extração e determinação de ALA e ADEA intracelulares. Uma cultura controle foi conduzida paralelamente na ausência de menadiona.

A massa seca celular das linhagens de *K. lactis* em YPGal foi determinada como foi descrito no item 2.2. Uma unidade $A_{600\text{nm}}$ de JVC 1-56 e CBS 2359 foi equivalente a 0,68 g/L ($\pm 0,019$) e a 0,54 g/L ($\pm 0,035$) de massa seca, respectivamente.

2.5 Extração e determinação de ácido L-ascórbico e ácido D-eritroascórbico intracelulares

Extração de ALA e ADEA foi realizada segundo Sauer *et al.* (2004) e, para identificação e quantificação dos mesmos, foi utilizado High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Shimadzu com detector UV-visível, uma coluna C18 de fase reversa Luna (5 μm , 100 Å, 250x 4,6 mm) e fase móvel contendo ácido acético, metanol e água destilada (1,5 : 1,5 : 99,7 v/v), num fluxo de 0,5 mL/min e comprimento de onda de 254 nm. Tempos de retenção das amostras foram comparados ao tempo

de retenção e características espectrais dos padrões ácido L-ascórbico 99% (Sigma-Aldrich, A5960) e ácido D-eritroascórbico 99% (Sigma-Aldrich, 58320).

2.6 Análises estatísticas

Para analisar a produção dos ácidos L-ascórbico e D-eritroascórbico, tanto as culturas conduzidas em regime contínuo quanto as em batelada foram realizadas aplicando Delineamento Inteiramente Casualizado. Foram feitas análises de variância (ANOVA) e o teste de médias Tukey, com nível de significância a 5%, com os resultados obtidos em HPLC. Todas as análises foram realizadas no software R, utilizando o pacote ExpDes.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito da velocidade de crescimento na produção de ALA

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) nos meios de cultura propostos são apresentadas na tabela 1. Uma vez determinadas tais velocidades, calculou-se aquelas correspondentes a $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ das mesmas, isto é, uma velocidade próxima à máxima, à mínima e uma intermediária. Uma vez selecionadas as velocidades de crescimento a serem testadas, os respectivos fluxos de entrada e saída do meio na cultura contínua foram estabelecidos.

Tabela 1. Velocidades de crescimento de cada linhagem de *K. lactis* em YGB e SQU e massa celular seca em *steady state* das culturas contínuas.

Linhagem	Meio de Cultura	Velocidade de Crescimento Máxima (h^{-1})	Velocidade de Crescimento (h^{-1})	Massa Celular Seca (g/L)
JVC1-56	YGB	0,3090 \pm 0,0087	$\frac{1}{8} \mu_{\text{máx}} = 0,04$	16,87
			$\frac{1}{4} \mu_{\text{máx}} = 0,08$	8,98
			$\frac{1}{2} \mu_{\text{máx}} = 0,15$	4,65
JVC1-56	SQU	0,3532 \pm 0,0063	$\frac{1}{8} \mu_{\text{máx}} = 0,04$	6,43
			$\frac{1}{4} \mu_{\text{máx}} = 0,09$	5,18
			$\frac{1}{2} \mu_{\text{máx}} = 0,18$	2,36
CBS 2359	YGB	0,4290 \pm 0,0049	$\frac{1}{8} \mu_{\text{máx}} = 0,05$	4,75
			$\frac{1}{4} \mu_{\text{máx}} = 0,11$	4,72
			$\frac{1}{2} \mu_{\text{máx}} = 0,21$	1,42
CBS 2359	SQU	0,3863 \pm 0,0044	$\frac{1}{8} \mu_{\text{máx}} = 0,05$	10,25
			$\frac{1}{4} \mu_{\text{máx}} = 0,10$	9,63
			$\frac{1}{2} \mu_{\text{máx}} = 0,19$	5,47

Os rendimentos obtidos pela linhagem transformante *K. lactis* JVC 1-56 cultivada em regime contínuo em YGB e SQU foram maiores nas velocidades de crescimento baixas (Figura 1). No meio YGB, o rendimento de ALA foi cinco vezes maior no cultivo com velocidade de crescimento de $0,04 \text{ h}^{-1}$ ($0,51 \text{ mg/mg}$) do que no cultivo com velocidade de $0,08 \text{ h}^{-1}$ ($0,11 \text{ mg/mg}$). O maior rendimento de vitamina C obtido no meio SQU foi de $0,80 \text{ mg/mg}$, o mais elevado observado nos experimentos de cultura contínua e duas vezes maior do que aquele obtido a $0,09 \text{ h}^{-1}$ ($0,36 \text{ mg/mg}$). Em ambos os meios, o rendimento foi muito baixo e, por isso, não significativo quando o cultivo ocorreu na maior taxa de crescimento. Não existiu diferença significativa nos rendimentos de ALA alcançados entre os meios YGB e SQU em cada velocidade de crescimento.

Esses resultados sugerem que a taxa de crescimento, e não o meio de cultura, é quem determina a via de síntese da vitamina C em uma relação não linear. Isto, portanto, corrobora a hipótese de que a síntese de ALA pode ser favorecida quando a cultura cresce lentamente, pois ao desacoplar a síntese de ALA do crescimento celular da *K. lactis* JVC 1-56, a mesma pode ter sido beneficiada pelo excedente de carbono (D-galactose) e, conseqüentemente, do intermediário GDP-D-manose, permitindo este ser convertido a L-galactose (Lister *et al.*, 2007). E, utilizando as enzimas dos últimos passos da via de biossíntese de seu análogo (ADEA), L-galactose seria convertido em L-galactano-1,4-lactona e a L-ascorbato, respectivamente (Lister *et al.*, 2007; Torabinejad *et al.*, 2009). Conforme esperado, as culturas contínuas com a linhagem controle nas diversas velocidades de crescimento testadas não produziram ALA.

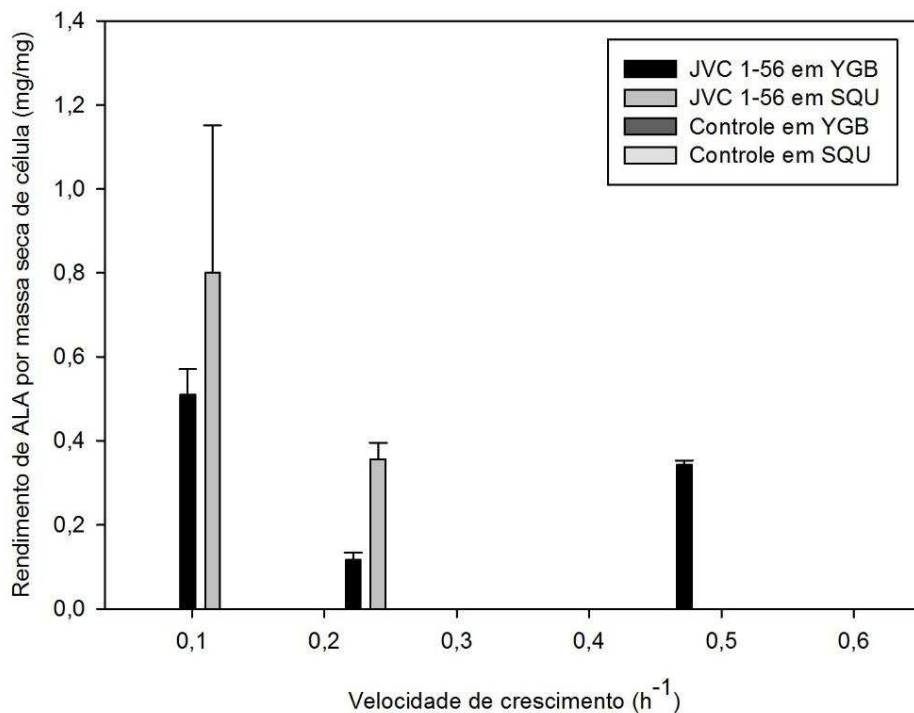


Figura 1. Rendimento de ALA por massa celular seca obtido pelas linhagens transformada e controle de *K. lactis* em cultura contínua sob diferentes velocidades de crescimento usando os meios YGB e SQU.

O rendimento do ácido D-eritroascórbico (ADEA) nativo, por sua vez, obtido pela linhagem recombinante JVC 1-56 foi três vezes menor (0,41 mg/mg) do que aquele obtido pela selvagem CBS 2359 (1,37 mg/mg) quando as duas linhagens foram cultivadas sob a maior taxa de crescimento em YGB (Figura 2). Nas outras velocidades de crescimento, o rendimento de ADEA gerado por ambas linhagens foi estatisticamente igual nesse meio de cultura. Já em SQU, o rendimento obtido por JVC 1-56 (3,35 mg/mg) foi quase 10 vezes maior do que o de CBS 2359 (0,37 mg/mg) na velocidade de crescimento mais baixa utilizada. Sob taxas de crescimento mais elevadas, o rendimento de ADEA alcançado por ambas linhagens de *K. lactis* em SQU foi estatisticamente o mesmo. Considerando apenas os rendimentos de ADEA obtidos por JVC 1-56 em 0,04 h⁻¹, observa-se que SQU foi superior pois permitiu cinco vezes mais ADEA (3,35 mg/mg) do que YGB (0,68 mg/mg). Nas demais velocidades de crescimento, os rendimentos de ADEA da linhagem recombinante são iguais em ambos os meios. No caso da linhagem selvagem CBS 2359, o rendimento observado a 0,21h⁻¹ em YGB (1,37 mg/mg) é seis vezes maior do que o rendimento na velocidade igualmente correspondente a ½ μ_{MÁX} (0,19 h⁻¹) do SQU (0,19 mg/mg). Nas outras

taxas de crescimento ambos meios resultaram em rendimentos estatisticamente iguais. Desta forma, percebe-se que não existe uma relação lógica entre velocidade de crescimento e síntese de ADEA.

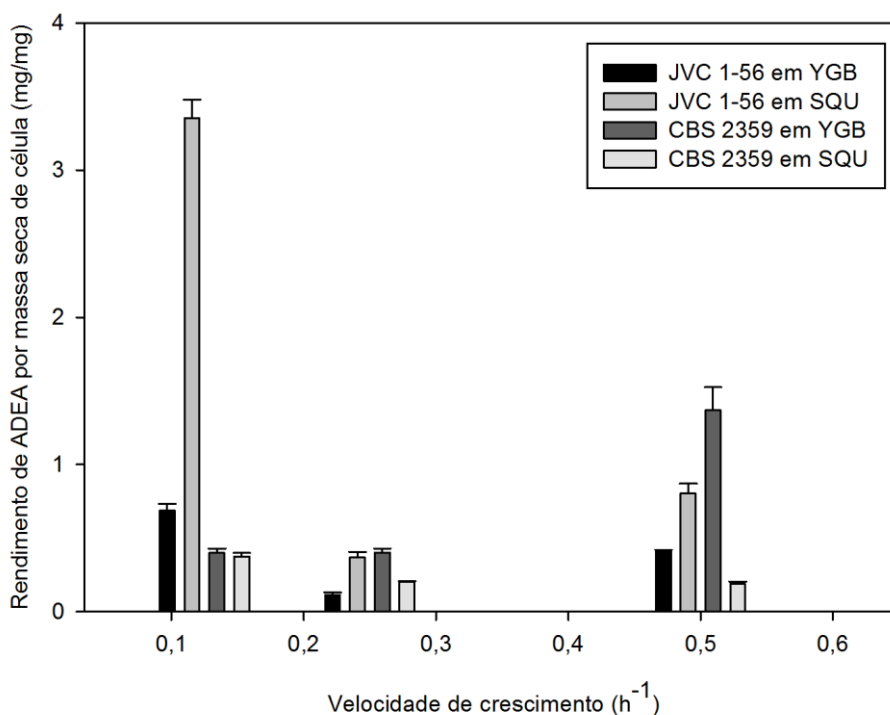


Figura 2. Rendimento de ADEA por massa celular seca obtido pelas linhagens transformada e selvagem de *K. lactis* em cultura contínua sob diferentes velocidades de crescimento usando os meios YGB e SQU.

O rendimento de 0,80 mg de ALA por miligrama de massa celular seca corresponde à produção de 4,91 mg/L de meio de cultura. Esta produção e rendimento ainda não superaram os obtidos por Rosa *et al.* (2013) - 14,40 mg/L e 1,126 mg/mg, respectivamente, a 24 horas de cultivo em batelada. Embora as condições fisiológicas da cultura contínua na velocidade de 0,04 h⁻¹ selecionem células mais produtivas, o sistema não permite o acúmulo do produto no meio como ocorre na batelada. Assim, é natural que o rendimento da batelada seja superior. Uma alternativa seria conduzir outra configuração de operação da cultura, como por exemplo, por batelada alimentada. A batelada alimentada é um sistema intermediário às duas modalidades de cultivo realizadas neste estudo que permite o acúmulo do produto com o tempo.

Concentrações baixas de ALA pode ser também resultado da degradação da vitamina C, a qual gera um radical muito estável, o ácido monodehidroascórbico (MDHA), e o seu produto ácido dehidroascórbico (Gallie, 2013; Liu *et al.*, 2013a e

2013b), ambos não detectados em HPLC no presente trabalho. A ocorrência da auto-oxidação da vitamina C, a qual é favorecida em temperaturas superiores a 25° C em meio aquoso, também deve ser considerada, de acordo com o estudo de Baroja-Mazo *et al.* (2005). Portanto, apesar de o crescimento desacelerado favorecer a síntese de ALA, talvez seja necessário prevenir a degradação de ALA para se alcançar produção e rendimento maiores. Uma opção seria transformar *K. lactis* JVC 1-56 com o gene da enzima bacteriana ciclodextrina glicosiltransferase, visto que tal enzima converte ALA em ácido 2-O-glicopiranosil-L-ascórbico (A2GA), um derivado encontrado em uma ampla gama de aplicações comerciais (cosméticos, medicamentos, rações para animais, entre outras) e detentor de diversas propriedades – baixa redutibilidade, antioxidante, e de fácil liberação de ALA e glicose (Liu *et al.*, 2013a e 2013b).

Em relação aos meios de culturas utilizados, foi possível perceber que tanto o meio mínimo YGB quanto SQU foram suficientes para induzir a síntese de ALA pela levedura engenheirada. Todavia, conforme verificado no estudo por Rosa *et al.* (2013), o meio YPGal foi capaz de levar a uma produção de vitamina C superior à do meio mínimo (YNB-Gal ou YGB ou SQU). Isto se deve, provavelmente, à maior disponibilidade de metabólitos intermediários que, ao invés de serem assimilados na via de biossíntese da parede celular, por exemplo, estariam disponibilizando o substrato D-galactose para a síntese de ALA. Neste sentido, culturas conduzidas em regime contínuo a 0,04 h⁻¹ (1/8 de μ_{MAX}) com o meio YPGal seriam mais eficazes do que realizá-las em meio limitante por nitrogênio.

Em contraste, pôde-se observar um alto rendimento (3,35 mg/mg) do análogo de ALA, ADEA, nativo na *K. lactis*. Tal rendimento pode ser devido à ocorrência de glicosilação deste composto por D-galactose. Este processo é comum em fungos dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, principalmente na fase não-exponencial do crescimento, como em culturas conduzidas em regime contínuo, por exemplo, e é provavelmente um mecanismo que mantém o composto em sua forma estável, sem que o mesmo sofra auto-oxidação (Baroja-Mazo *et al.*, 2005).

3.2 Efeito do estresse oxidativo na síntese de ALA

Curvas de crescimento das linhagens transformante e selvagem, em YPGal e em SQU, com o agente oxidante menadiona na faixa de concentração de 1,56 μ M a

400,00 μM , foram obtidas no intuito de estabelecer uma concentração para ser usada nos experimentos de estresse oxidativo (vide item 2.4). A figura 3 mostra as curvas de crescimento de JVC 1-56 em YPGal geradas a partir das medidas da absorbância ao longo do tempo em cada concentração do composto. De acordo com os resultados da regressão linear, a concentração de 12,50 μM de menadiona foi a maior que permitiu um crescimento populacional significativo. Concentrações superiores reduziram em, aproximadamente, 75% a velocidade de crescimento. O mesmo padrão de curvas foi visto para JVC 1-56 em SQU e CBS2359 em YPGal e SQU (dados não mostrados).

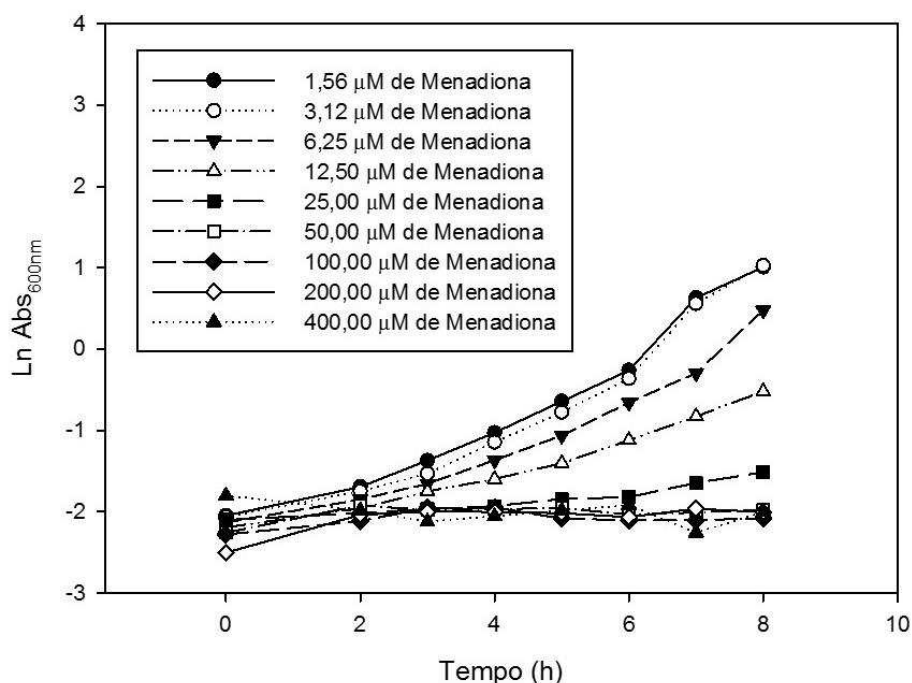


Figura 3. Curvas de crescimento de JVC 1-56 em YPGal exposta a menadiona de 1,56 μM a 400,00 μM . Aliquotas de 1,0 mL de cada cultura tiveram sua $\text{DO}_{600\text{nm}}$ medida de 1h em 1h ao longo de 8h. o gráfico foi plotado a partir do logaritmo neperiano das $\text{DO}_{600\text{nm}}$ obtidas em função do tempo (h).

Culturas em batelada das linhagens de *K. lactis* JVC 1-56 e CBS 2359, com e sem estresse oxidativo, foram conduzidas em meios YPGal e SQU por 96h. No cultivo de JVC 1-56 em YPGal submetido a 12,50 μM de menadiona, a massa seca máxima resultante da fase estacionária de crescimento foi de 17,37 g/L, enquanto que, em SQU, foi de 13,60 g/L. Já *K. lactis* CBS 2359 sob as mesmas condições apresentou massa seca máxima de 14,13 g/L em YPGal, e de 20,02 g/L em SQU. No caso das culturas controle conduzidas sem a presença de estresse, foi observado que a massa

seca máxima de JVC 1-56 em YPGal resultante da fase estacionária foi de 17,70 g/L, enquanto que em SQU esta massa foi de 14,53 g/L. Já as bateladas do controle apresentaram 16,44 g/L na massa celular seca em YPGal e de 18,62 g/L em SQU (dados não mostrados).

A presença de 12,50 μ M menadiona não aumentou o rendimento de ALA por massa seca celular. Ao contrário, a exposição a este composto reduziu o rendimento da vitamina em ambos meios de cultura em relação ao controle (Figura 4). Essa redução foi menos acentuada no SQU. O rendimento da vitamina C por massa seca de células da linhagem JVC 1-56 cultivada em YPGal foi significativamente maior (1,94 mg/mg) do que no SQU (0,32 mg/mg) na ausência de estresse. Como esperado, CBS 2359 não produziu vitamina C. Esses resultados indicam que a concentração de menadiona adotada (12,50 μ M) não constituiu uma concentração capaz de desafiar a célula a produzir mais antioxidante para se proteger ou o produto estaria sendo oxidado.

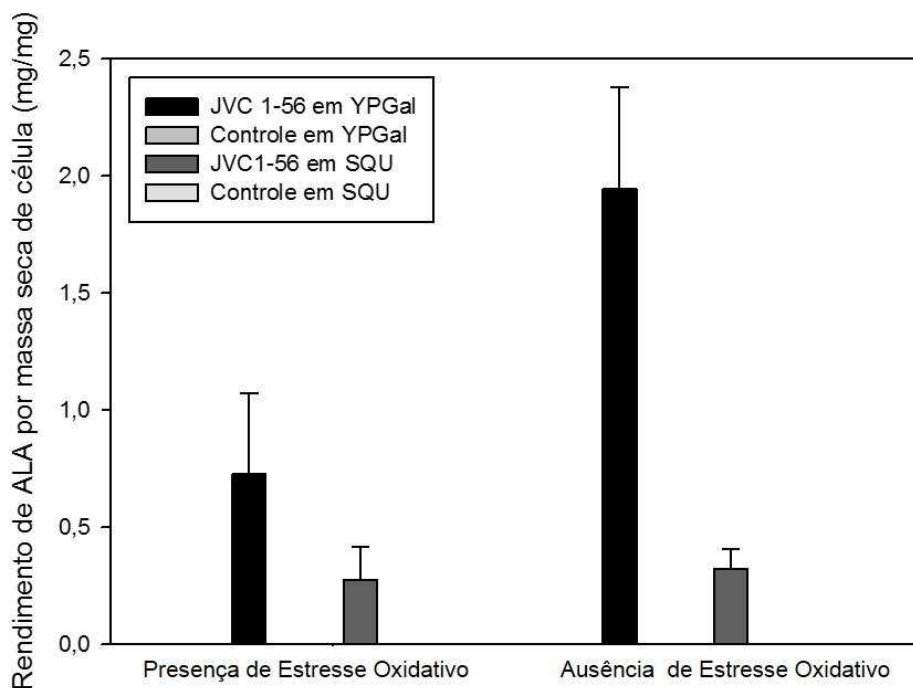


Figura 4. Rendimento de ALA por massa celular seca obtido pelas linhagens transformada e selvagem de *K. lactis* submetidas ou não ao estresse oxidativo por 12,50 μ M de menadiona, usando os meios YPGal e SQU. Como se pode observar, o rendimento de ALA pela linhagem controle foi nulo.

Considerando o antioxidante nativo de leveduras, o ácido D-eritroascórbico (ADEA), a presença de estresse também não aumentou seu rendimento pela linhagem JVC 1-56 nem pela linhagem controle, em nenhum dos meios testados

(Figura 5). Na ausência de menadiona, JVC 1-56 alcançou um rendimento de ADEA 38 vezes maior em YPGal (10,33 mg/mg) do que em SQU (0,27 mg/mg), enquanto a linhagem CBS 2359 gerou estatisticamente o mesmo rendimento, em ambos meios de cultura. Ao comparar os rendimentos obtidos pelas duas linhagens apenas no meio de cultivo YPGal, ele é 18 vezes maior a partir da linhagem transformada (10,33 mg/mg) do que a partir da controle (0,56 mg/mg). Todavia, somente em SQU, ambos os rendimentos são estatisticamente iguais pelas duas células.

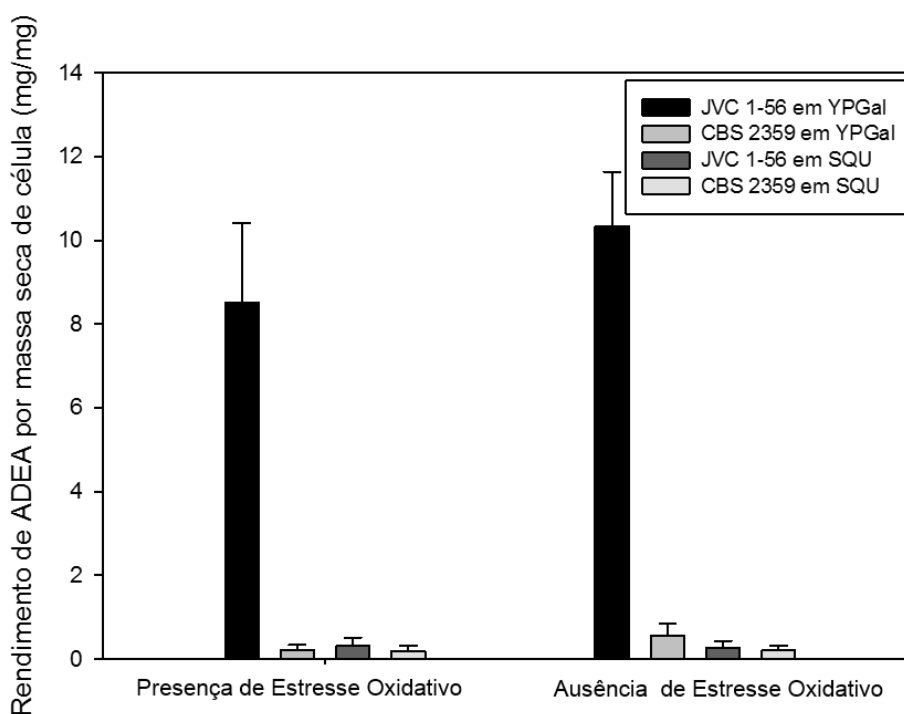


Figura 5. Rendimento de ADEA por massa celular seca obtido pelas linhagens transformada e selvagem de *K. lactis* submetidas ou não ao estresse oxidativo por 12,50 μ M de menadiona, usando os meios YPGal e SQU.

A presença do agente oxidante pode exercer uma pressão seletiva sobre as leveduras. Neste sentido, aquelas com a capacidade de sintetizar um antioxidante poderiam exibir uma vantagem adaptativa. Assim, era esperado que a linhagem de *K. lactis* metabolicamente engenheirada com a via que leva à formação de ALA sintetizasse maiores quantidades de tal vitamina quando desafiada à menadiona. Este composto, ao reduzir um elétron da quinona, leva à formação da semiquinona. Esta é auto-oxidada, em condições aeróbicas, de volta para quinona. Os subprodutos desta reação são as espécies reativas de oxigênio (oxigênio *singlet*, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila) (Mauzeroll *et al.*, 2004; Criddle *et al.*, 2006). O ácido L-ascórbico,

em contato com tais espécies, poderia neutralizá-las ao ser oxidado (Gest *et al.*, 2013), gerando o ácido monodehidroascórbico e o ácido dehidroascórbico (Gallie, 2013; Liu *et al.*, 2013). Estes subprodutos, por sua vez, não procurados em HPLC, poderiam explicar a baixa concentração de ALA nas amostras submetidas ao estresse comparada às demais. Desta forma, o agente oxidante poderia ter aumentado a produção de ALA, que foi consumida ao combater as ROS. Ainda assim, foi possível obter a produção de 13,39 mg/L de ALA e o rendimento de 1,94 mg/mg estatisticamente iguais à produção e ao rendimento alcançados por Rosa *et al.* (2013) - 14,40 mg/L e 1,16 mg/mg, respectivamente.

O meio YPGal propicia maior síntese de ALA do que o meio SQU, confirmando resultados anteriores (Rosa *et al.*, 2013). Galactose é o indutor para síntese de ALA, conforme a estratégia de clonagem e o sistema de expressão empregados. Embora este açúcar seja parte constituinte da lactose do soro, parece ter algum impedimento para sua plena utilização. Além disso, intermediários prontamente disponíveis no meio YPGal parecem favorecer a síntese de ALA enquanto SQU ainda apresenta alguma limitação nutricional.

O alto rendimento de ADEA obtido em ausência de estresse oxidativo na fase estacionária das culturas em batelada pelas linhagens de *K. lactis* pode ser devido ao acúmulo da forma glicosilada da molécula de ADEA, que a preserva na sua forma estável (Baroja-Mazo *et al.*, 2005). Considerando seu poder antioxidante (Davies *et al.*, 1991; Bremus *et al.*, 2006; Branduardi *et al.*, 2007), seria esperado que, da mesma maneira que ALA, ADEA neutralizasse as espécies reativas de oxigênio, sofrendo oxidação quando a levedura fosse exposta ao estresse oxidativo. Isso explica o baixo rendimento de ADEA na condição de estresse.

4. Conclusão e Perspectivas

Este trabalho confirma que *Kluyveromyces lactis* JVC 1-56 produz ácido L-ascórbico (ALA) (vitamina C) com rendimentos maiores quando cultivada por 96 horas em batelada no meio YPGal. O cultivo em baixas velocidades de crescimento ($0,04 \text{ h}^{-1}$) predispõe as células a sintetizar mais ALA por unidade de massa celular ($0,80 \text{ mg/mg}$). Entretanto, o rendimento da cultura contínua operada como quimostato, tendo nitrogênio como substrato limitante, ainda mostrou ser inferior ao previsto na batelada ($1,94 \text{ mg/mg}$). Outra configuração de operação da cultura, como por exemplo, a batelada alimentada, deve ser testada. Esta configuração é um sistema intermediário às duas modalidades de cultivo realizadas neste estudo que permite o acúmulo do produto com o tempo.

Como o estresse oxidativo por $12,5 \mu\text{M}$ de menadiona sobre *K. lactis* JVC1-56, nas condições aplicadas, não foi eficaz no aumento da produção de ALA ($1,47 \text{ mg/mg}$), deve-se obter uma maior concentração de menadiona para desafiar a linhagem. Além disso, o presente trabalho sugere novos estudos para que o melhoramento dessa linhagem com a enzima bacteriana ciclodextrina glicosiltransferase seja realizado, no sentido de se obter um composto mais estável do que ALA - o ácido 2-O-glicopiranosil-L-ascórbico (A2GA).

O rendimento de ADEA, por sua vez, foi superior ao de ALA nas duas estratégias: $1,37 \text{ mg/mg}$ a $0,21 \text{ h}^{-1}$ na cultura sob regime permanente, $8,52 \text{ mg/mg}$ na batelada sob estresse oxidativo e $10,33 \text{ mg/mg}$ na batelada na ausência do agente oxidante, indicando que ele pode estar em uma configuração mais estável do que a vitamina C (glicosilado, por exemplo). Finalmente, o permeado do soro de queijo continua sendo uma perspectiva para a conversão da lactose em um produto biotecnológico de maior valor agregado.

5. Agradecimentos

Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Backhaus, K., Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Purschke, G., Koster, C. G., Klis, F. M. & Heinisch, J. J. A Systematic Study of the Cell Wall Composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, v. 27, p. 647-660, 2010.
- Backhaus, K., Buchwald, U., Heppeler, N., Schmitz, H. P., Rodicio, R. & Heinisch, J. J. Milk and sugar: Regulation of Cell Wall Synthesis in the Milk Yeast *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Cell Biology*, v. 90, p. 745-750, 2011.
- Baroja-Mazo, A., Valle, P., Rúa, J., Cima, S., Busto, F., Arriaga, D. & Smirnov, N. Characterisation and Biosynthesis of D-Erythroascorbic Acid in *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, p. 390-402, 2005.
- Berry, A., Lee, C., Mayer, A. F. & Shinjoh, M. Microbiol Production os L-Ascorbic Acid. *World Intellectual Property Organisation Patent WO 2005/017172*, 2005.
- Boudrant, J. Microbial Processes for Ascorbic Acid Biosynthesis: a Review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 12, n. 5, p. 322-329, 1990.
- Branduardi, P., Fossati, T., Sauer, M., Pagani, R., Mattanovich, D. & Porro, D. Biosynthesis of Vitamin C by Yeast Leads to Increased Stress Resistance. *Plos One*, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2007.
- Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. The Use of Microorganisms in L-Ascorbic Acid Production. *Journal of Biotechnology*, v. 124, p. 196-205, 2006.
- Cai, L., Yuan, M. Q., Li, Z. J., Chen, J. C. & Chen, G. Q. Genetic Engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for Enhanced Production of 2-Keto-L-Gulonic Acid. *Journal of Biotechnology*, v. 157, p. 320-325, 2012.
- Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W. & Sanford, K. The Commercial Production of Chemicals Using Pathway Engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1543, p. 434-455, 2000.

Criddle, D. N., Gillies, S., Baumgartner-Wilson, H. K., Jaffar, M., Chinje, E. C., Passmore, S., Chvanov, M., Barrow, S., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., Sutton, R. & Petersen, O. H. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 21, n. 52, p. 40485–40492, 2006.

Davies, M. B., Austin, J. & Partridge, D. A. Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry. *The Royal Society of Chemistry*, 1991.

Diniz, R. H. S., Silveira, W. B., Fietto, L. G. & Passos, F. M. L. The High Fermentative Metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 Relies on the Increased Expression of Key Lactose Metabolic Enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 101, p. 541–550, 2012.

Fossati, T., Solinas, N., Porro, D. & Branduardi, P. L-Ascorbic Acid Producing Yeasts Learn from Plants How to Recycle It. *Metabolic Engineering*, p. 177–185, 2011.

Gallie, D. R. The Role of L-Ascorbic Acid Recycling in Responding to Environmental Stress and in Promoting Plant Growth. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 433-443, 2013.

Gest, N., Gautier, H. & Stevens, R. Ascorbate as Seen Through Plant Evolution: the Rise of a Successful Molecule? *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 1, p. 33-53, 2013.

Hancock, R. D. Recent Patents on Vitamin C: Opportunities for Crop Improvement and Single-Step Biological Manufacture. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, v. 1, p. 39-49, 2009.

Kojo, S. Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 1041-1064, 2004.

Lister, C. L., Gomes, T. A., Christensen, K. C., Adler, L. N., Yong, B. D., Brenner, C. & Clarke, S. G. *Arabidopsis* VTC2 Encodes a GDP-L-Galactose Phosphorilase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheller Pathway to Ascorbic Acid in PLants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 26, p. 18879-18885, 2007.

Liu, L., Han, R., Shin, H., Li, J., Du, G. & Chen, J. Biosynthesis of 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid from Maltose by an Engineered Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. *Carbohydrate Research*, v. 382, p. 101-107, 2013a.

Liu, L., Xu, Q., Han, R., Shin, H., Chen, R. R., Li, J., Du, G. & Chen, J. Improving Maltodextrin Specificity for Enzymatic Synthesis of 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid by Site-Saturation Engineering of Subsite-3 in Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. *Journal of Biotechnology*, v. 166, p. 198-205, 2013b.

Masaki, H. Role of Antioxidants in the Skin: Anti-Aging Effects. *Journal of Dermatological Science*, v. 58, p. 85-90, 2010.

Mauzeroll, J., Bard, A. J., Owhadian, O. & Monks, T. J. Menadione Metabolism to Thiodione in Hepatoblastoma by Scanning Electrochemical Microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 17582-17587, 2004.

Monod, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, p. 371-394, 1949.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Schaechter, M. Physiology of the Bacterial Cell: a Molecular Approach. Sinauer Associates, Inc., 1990.

Rosa, J. C. C., Colombo, L. T., Alvim, M. C. T., Avonce, N., Dijck, P. V. & Passos, F. M. L. Metabolic Engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-Ascorbic Acid (Vitamin C) Biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, v. 12, n. 59, 2013.

Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosoda, J. & Shimomura, K. Cloning of Genes Coding for L-Sorbose and L-Sorbosone Dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and Microbial Production of 2-Keto-L-Gulonate, a Precursor of L-Ascorbic Acid, in a Recombinant *G. oxydans* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 2, p. 454-460, 1997.

Sansonetti S.; Curcio, S.; Calabro, V. & Iorio, G. Bio-ethanol Production by Fermentation of Ricotta Cheese Whey as an Effective Alternative Non-Vegetable Source. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1687-1692, 2009.

Sauer, M., Branduardi, P., Valli, M. & Porro, D. Production of L-Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 10, p. 6086-6091, 2004.

Shinjoh, M., Tomiyama, N., Asakura, A. & Hoshino, T. Cloning and Nucleotide Sequencing of the Membrane-Bound L-Sorbosone Dehydrogenase Gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 And Its Expression in *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 413-420, 1995.

Siso, M. I. The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: a Review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

Smirnoff, N. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany*, v. 78, p. 661-669, 1996.

Shibata, T., Ichikawa, C., Matsuura, M., Takata, Y., Noguchi, Y., Saito, Y. & Yamashita, M. Metabolic Engineering Study on the Direct Fermentation of 2-Keto-L-Gulonic Acid, a Key Intermediate of L-Ascorbic Acid In *Pseudomonas putida* IFO3738. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 2, p. 223-225, 2000.

Torabinejad, J., Donahue, J. L., Gunesequera, B. N., Allen-Daniels, M. J. & Gillaspay, G. E. VTC4 is a Bifunctional Enzyme That Affects Myoinositol and Ascorbate Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology*, v. 150, p. 951-961, 2009.

Uccelletti, U., Farina, F., Rufini, S., Magnelli, P., Abeijon, C. & Palleschi, C. The *Kluyveromyces lactis* α 1,6-Mannosyltransferase KIOch1p is Required for Cell-wall Organization and Proper Functioning of the Secretory Pathway. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 449-457, 2006.

Xie, X. & Lipke, P. N. On the Evolution of Fungal and Yeast Cell Walls. *Yeast*, v. 27, p. 479-488, 2010.

Yang, S., & Silva, E. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.

6. Apêndice

Tabela 1. Produção de ALA e ADEA e consumo de carbono (galactose ou lactose) nos experimentos de cultura contínua.

		Cultura Contínua									
		ALA (mg/L)	ALA (g/L)	ADEA (mg/L)	ADEA (g/L)	Lactose (mmol/L)	Lactose (g/L)	Galactose (mmol/L)	Galactose (g/L)	Rendimento de ALA	Rendimento de ALA (%)
YGB	$\frac{1}{2}$ μ MÁX	1,5911	0,0016	1,9395	0,0019	-	-	49,1760	8,8594	0,0001	0,0143
		1,5858	0,0016	1,9390	0,0019	-	-	56,7930	10,2316	0,0002	0,0162
		1,6053	0,0016	1,8905	0,0019	-	-	47,3912	8,5378	0,0001	0,0140
	$\frac{1}{4}$ μ MÁX	1,9602	0,0020	1,9071	0,0019	-	-	18,5093	3,3346	0,0001	0,0118
		1,9042	0,0019	1,8871	0,0019	-	-	21,7493	3,9183	0,0001	0,0118
		1,9586	0,0020	1,8852	0,0019	-	-	23,5952	4,2508	0,0001	0,0124
	$\frac{1}{8}$ μ MÁX	4,9112	0,0049	6,3528	0,0064	-	-	5,5269	0,9957	0,0003	0,0258
		4,1823	0,0042	6,0070	0,0060	-	-	5,2197	0,9404	0,0002	0,0219
		4,5729	0,0046	6,0725	0,0061	-	-	3,3064	0,5957	0,0002	0,0236
JVC 1-56	$\frac{1}{2}$ μ MÁX	0,0000	0,0000	1,8808	0,0019	109,1175	37,3509	3,4864	0,6281	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,8817	0,0019	113,9482	39,0045	3,5447	0,6386	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,8855	0,0019	112,9648	38,6678	3,5251	0,6351	0,0000	0,0000
	$\frac{1}{4}$ μ MÁX	1,8256	0,0018	1,8927	0,0019	-9,856	-3,3737	0,0000	0,0000	0,0001	0,0091
		1,8618	0,0019	1,8909	0,0019	-9,826	-3,363	0,0000	0,0000	0,0001	0,0093
		1,8294	0,0018	1,8912	0,0019	-9,781	-3,3480	0,0000	0,0000	0,0001	0,0091
	$\frac{1}{8}$ μ MÁX	3,7029	0,0037	17,1486	0,0171	-19,0000	-6,5037	8,2500	1,4863	0,0002	0,0200
		3,8808	0,0039	17,8196	0,0178	48,8000	16,7042	8,2500	1,4863	0,0002	0,0210
		0,0000	0,0000	17,4990	0,0175	85,4500	29,2495	7,5000	1,3512	0,0000	0,0000
CBS 2359	$\frac{1}{2}$ μ MÁX	0,0000	0,0000	1,8883	0,0019	-	-	83,1593	14,9816	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,9188	0,0019	-	-	82,1480	14,7995	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	2,0073	0,0020	-	-	69,0180	12,4340	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,8855	0,0019	-	-	32,7704	5,9038	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,8855	0,0019	-	-	32,7704	5,9038	0,0000	0,0000

	1/4	0,0000	0,0000	1,8963	0,0019	-	-	35,5442	6,4035	0,0000	0,0000
	μ MÁX	0,0000	0,0000	1,8968	0,0019	-	-	37,5870	6,7715	0,0000	0,0000
	1/8	0,0000	0,0000	1,8830	0,0019	-	-	20,6637	3,7227	0,0000	0,0000
	μ MÁX	0,0000	0,0000	1,8935	0,0019	-	-	18,0575	3,2532	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,8905	0,0019	-	-	19,7804	3,5636	0,0000	0,0000
	1/2	0,0000	0,0000	1,8905	0,0019	0,0000	0,0000	1,8909	0,3407	0,0000	0,0000
	μ MÁX	0,0000	0,0000	1,9497	0,0019	0,0000	0,0000	2,0107	0,3622	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,9627	0,0020	-6,898	-2,3612	1,8197	0,3278	0,0000	0,0000
SQU	1/4	0,0000	0,0000	1,9218	0,0019	-9,726	-3,3294	0,9009	0,1623	0,0000	0,0000
	μ MÁX	0,0000	0,0000	1,8983	0,0019	-9,703	-3,3212	0,8256	0,1487	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	1,9801	0,0020	-9,734	-3,3320	0,7561	0,1362	0,0000	0,0000
	1/8	0,0000	0,0000	2,0294	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	μ MÁX	0,0000	0,0000	2,0584	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0000	2,0631	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabela 2. Produção de ALA e ADEA e consumo de carbono (D-galactose ou lactose) nos experimentos de batelada.

		Batelada											
		ALA	ALA	ADEA	ADEA	Lactose	Lactose	Galactos	Galactose	Rendiment	Rendimento		
		(mg/L)	(g/L)	(mg/L)	(g/L)	(mmol/L)	(g/L)	e	(g/L)	o de ALA	de ALA (%)		
)		(mmol/L)					
Com menadiona	JVC 1- 56	YPGal	1	4,6273	0,0046	42,0144	0,0420	-	-	24,8551	4,4778	0,0003	0,0298
			2	3,9797	0,0040	27,0384	0,0270	-	-	52,0267	9,3729	0,0004	0,0374
			3	3,8569	0,0039	33,7150	0,0337	-	-	7,2640	1,3087	0,0002	0,0206
			4	6,2467	0,0062	31,8360	0,0318	-	-	7,6000	1,3692	0,0003	0,0335
			5	4,2846	0,0043	37,7130	0,0377	-	-	5,0140	0,9033	0,0002	0,0224
			6	4,6830	0,0047	34,4020	0,0344	-	-	2,8610	0,5154	0,0002	0,0240
		SQU	1	1,5750	0,0016	1,9706	0,0020	65,8892	22,5539	2,9582	0,5329	0,0001	0,0081
	2		1,8548	0,0019	1,9236	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0037	

			3	1,7812	0,0018	1,9037	0,0019	-7,892	-2,7015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0034
			4	1,5750	0,0016	1,9724	0,0020	64,7842	22,1756	2,8130	0,5068	0,0001	0,0057
			5	2,2097	0,0022	2,1561	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0044
			6	2,2230	0,0022	2,1511	0,0022	-7,970	-2,7283	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042
			1	0,0000	0,0000	1,8810	0,0019	-	-	49,4533	8,9093	0,0000	0,0000
			2	0,0000	0,0000	1,8813	0,0019	-	-	2,9466	0,5309	0,0000	0,0000
		YPGal	3	0,0000	0,0000	1,9331	0,0019	-	-	2,5689	0,4628	0,0000	0,0000
			4	0,0000	0,0000	1,8806	0,0019	-	-	41,6860	7,5100	0,0000	0,0000
			5	0,0000	0,0000	1,8858	0,0019	-	-	3,0610	0,5515	0,0000	0,0000
		CBS	6	0,0000	0,0000	1,9418	0,0019	-	-	1,3081	0,2357	0,0000	0,0000
		2359	1	0,0000	0,0000	1,9377	0,0019	45,9267	15,7207	2,8840	0,5196	0,0000	0,0000
			2	0,0000	0,0000	1,8928	0,0019	-8,840	-3,0259	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
		SQU	3	0,0000	0,0000	1,9200	0,0019	-8,223	-2,8146	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
			4	0,0000	0,0000	1,8953	0,0019	-9,222	-3,1566	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
			5	0,0000	0,0000	1,8893	0,0019	32,4400	11,1042	2,0468	0,3687	0,0000	0,0000
			6	0,0000	0,0000	1,9850	0,0020	-7,285	-2,4938	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
			1	15,3378	0,0153	52,4589	0,0525	-	-	1,9016	0,3426	0,0008	0,0780
			2	12,2206	0,0122	68,5816	0,0686	-	-	1,4332	0,2582	0,0006	0,0619
		YPGal	3	14,8306	0,0148	88,1449	0,0881	-	-	1,3794	0,2485	0,0008	0,0751
			4	14,2833	0,0143	65,4820	0,0655	-	-	1,5756	0,2839	0,0007	0,0724
			5	11,8684	0,0119	72,5665	0,0726	-	-	1,9273	0,3472	0,0006	0,0604
			6	11,7675	0,0118	83,9488	0,0839	-	-	1,7940	0,3232	0,0006	0,0598
			1	1,5902	0,0016	1,9074	0,0019	54,6806	18717,1596	1,3160	0,2371	0,0000	0,0000
			2	2,1361	0,0021	1,8980	0,0019	-8,154	-2791,1266	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
		SQU	3	4,3092	0,0043	1,9001	0,0019	-8,587	-2939,3071	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
			4	1,5750	0,0016	1,9212	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0032
			5	2,8709	0,0029	1,9341	0,0019	-8,016	-2743,8890	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
			6	4,4142	0,0044	1,8909	0,0019	-8,842	-3026,5492	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001

		1	0,0000	0,0000	1,9080	0,0019	-	-	73,7825	13,2924	0,0000	0,0000
		2	0,0000	0,0000	1,9237	0,0019	-	-	4,3002	0,7747	0,0000	0,0000
	YPGal	3	0,0000	0,0000	1,9574	0,0020	-	-	3,4502	0,6216	0,0000	0,0000
		4	0,0000	0,0000	1,9349	0,0019	-	-	66,6062	11,9995	0,0000	0,0000
		5	0,0000	0,0000	1,9159	0,0019	-	-	2,6767	0,4822	0,0000	0,0000
CBS		6	0,0000	0,0000	1,9232	0,0019	-	-	2,2227	0,4004	0,0000	0,0000
2359	SQU	1	0,0000	0,0000	1,9045	0,0019	47,2339	16,1682	1,0560	0,1902	0,0000	0,0000
		2	0,0000	0,0000	1,8972	0,0019	-8,623	-2,9515	0,7000	0,1261	0,0000	0,0000
		3	0,0000	0,0000	1,9032	0,0019	-8,427	-2,8845	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
		4	0,0000	0,0000	1,9083	0,0019	47,2669	16,1794	1,1437	0,2061	0,0000	0,0000
		5	0,0000	0,0000	1,9193	0,0019	-8,862	-3,0336	0,7036	0,1267	0,0000	0,0000
		6	0,0000	0,0000	1,8908	0,0019	-8,188	-2,8029	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

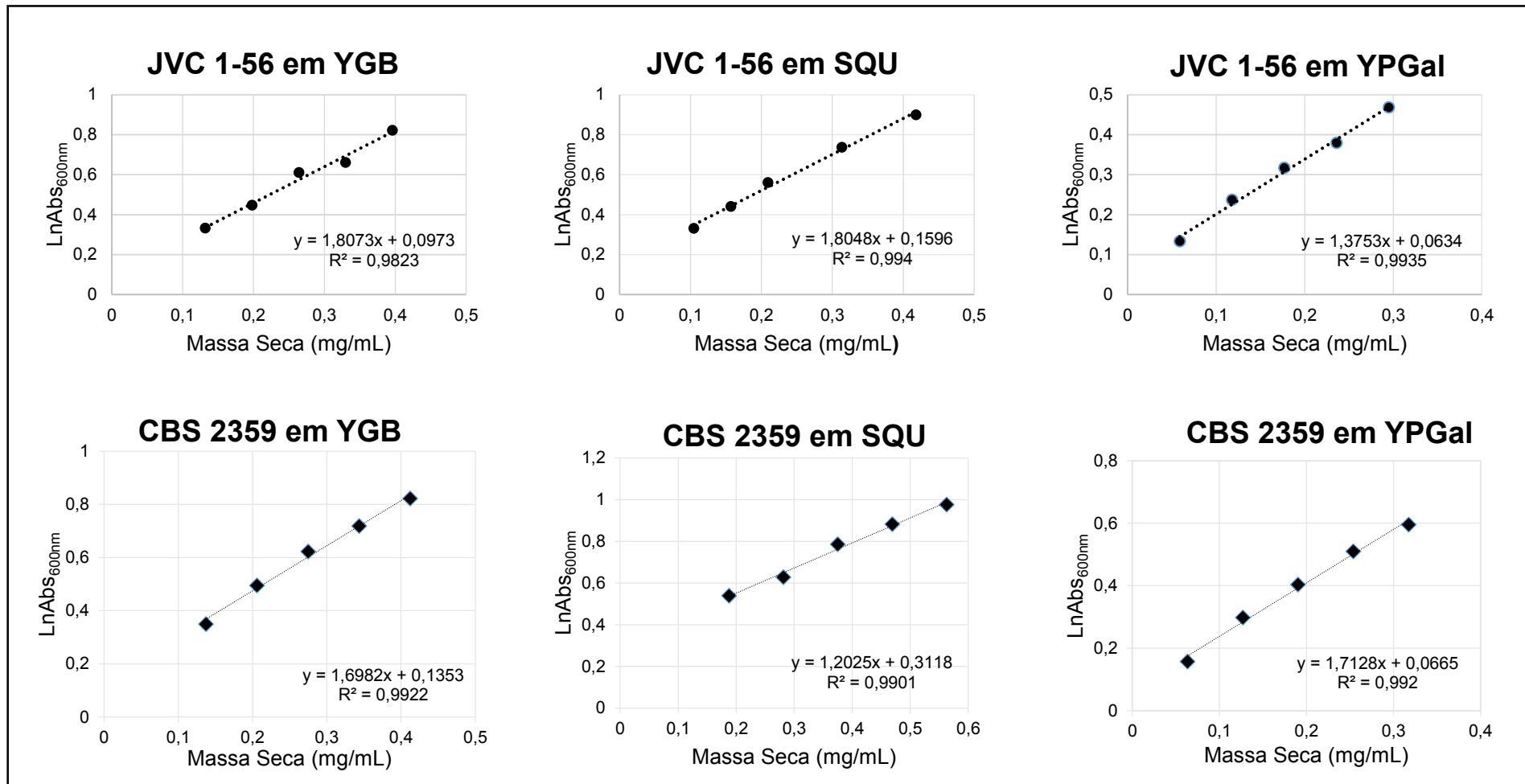


Figura 1. Curvas padrão que mostram a relação absorvância_{600nm} versus massa seca de célula (mg/ml) das linhagens de *K. lactis* JVC 1-56 e CBS 2359 nos meios de cultura usados neste trabalho.

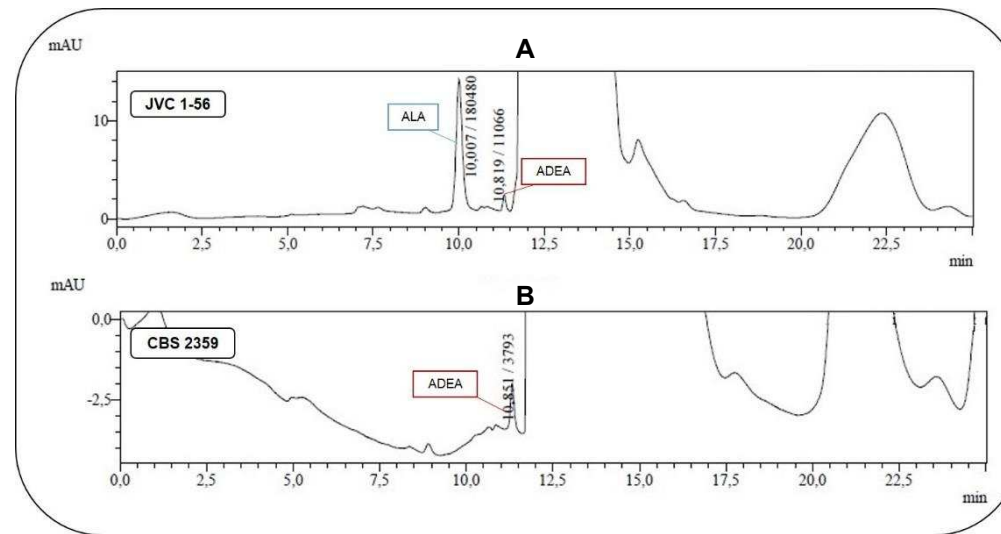


Figura 2. Detecção de ALA e ADEA nas linhagens de *K. lactis* por meio de HPLC. **A|** JVC 1-56 cultivada em batelada em SQU sem a presença de estresse oxidativo. **B|** CBS 2359 cultivada em batelada no meio de cultura YPGal não submetida ao estresse oxidativo.