

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E BIOMASSA POR
***KLUYVEROMYCES MARXIANUS* SOB DIFERENTES**
CONDIÇÕES DE CULTIVO

DANYELLY BRUNESKA GONDIM MARTINS

RECIFE, 2004.

DANYELLY BRUNESKA GONDIM MARTINS



PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E BIOMASSA POR
***KLUYVEROMYCES MARXIANUS* SOB DIFERENTES**
CONDIÇÕES DE CULTIVO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. MARCOS ANTONIO DE MORAIS JÚNIOR

RECIFE, 2004.

Martins, Danyelly Bruneska Gondim

Produção de β -Galactosidase e Biomassa por *Kluyveromyces marxianus* sob Diferentes Condições de Cultivo. / Danyelly Bruneska Gondim Martins. – Recife: O Autor, 2004.

149 folhas : il., fig., tab.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Ciências Biológicas, 2004.**

Inclui bibliografia e anexo.

**1. *Kluyveromyces marxianus* 2. Levedura 3. β -galactosidase
4. Enzima. 5. Biomassa I. Título.**

**582.282.23
579.563**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-021**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior (orientador)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Departamento de Genética

Prof^ª. Dr^ª. Elza Áurea de Luna Alves Lima

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Departamento de Micologia

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Mascena Diniz Maia

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Departamento de Biologia

Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Amorim Salgueiro

Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Departamento de Química

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA DO DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos trinta dias do mês de janeiro de dois mil e quatro, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de tese apresentada pela doutoranda **Danyelly Bruneska Gondim Martins**, intitulada: "**Produção de β -galactosidase e biomassa por *Kluyveromyces marxianus* sob diferentes condições de cultivo**". A Banca Examinadora foi homologada em nove de janeiro de dois mil e quatro, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Marcos Antonio de Moraes Júnior** (orientador), Doutor em Biologia Molecular, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Elza Áurea de Luna Alves Lima**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Ana Lúcia Figueiredo Porto**, Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas/SP, **Maria de Mascena Diniz Maia**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Alexandra Amorim Salgueiro**, Ph.D em Microbiologia Aplicada, pela Universidade de St. Andrews, Escócia; como suplentes os Professores **José Luiz de Lima Filho**, Ph.D em Bioquímica, pela Universidade de St. Andrews, Escócia e **Maria da Paz Carvalho da Silva**, Ph.D em Química, pela Universidade de Birmingham, Inglaterra. A Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia de Menezes Lima, Vice-Coordenadora em exercício deu início a Sessão para mais uma defesa de tese, a **primeira** do ano e a **sexagésima sétima** do Doutorado. Agradeceu a presença de todos, em especial à Banca Examinadora. Em seguida passou a palavra ao Prof. Marcos Moraes para presidir os trabalhos. O presidente após ler os termos concedeu a palavra à doutoranda, que efetuou a apresentação de sua tese por quarenta e cinco minutos. Continuando, o presidente solicitou à Banca Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.^a Alexandra Salgueiro (1º examinador), Dr.^a Maria de Mascena Maia (2º examinador), Dr.^a Ana Lúcia Porto (3º examinador), Dr.^a Elza Áurea Lima (4º examinador), Dr. Marcos Moraes (5º examinador). Logo após, o presidente teceu agradecimentos, em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim de proceder a avaliação da doutoranda. A Banca Examinadora atribuiu a **Dannyelly Bruneska Gondim**

DEDICO ESTE TRABALHO À MINHA MÃE,
ENEIDA

“NUNCA SE PERCEBE O QUE JÁ FOI FEITO; A GENTE SÓ
NOTA O QUE AINDA ESTÁ POR FAZER”

Marie Curie

Cientista francesa

1867-1934

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que me deu forças para seguir o caminho por mim escolhido, o que por si só já é uma vitória.

À minha mãe, Eneida Maria Gondim, por todo apoio e compreensão nos meus momentos de grande estresse que acompanharam este caminho.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Moraes Júnior pela oportunidade concedida de conhecer a ciência, que tanto me fascina.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por todas as palavras de incentivo durante esta longa jornada e pelo crédito a mim concedido para desenvolvimento de tantos trabalhos.

À Prof^a. Dr^a. Ana Porto, pela auxílio e contribuição que permitiram a conclusão deste trabalho.

Às Prof^{as}. Mana, Maria da Paz, Elizabeth Chaves e ao Prof. Luiz Carvalho, pelo auxílio científico e emocional durante estes quatro anos. Ao Prof. William Ledhigan, que me proporcionou a oportunidade de ampliar minha visão de ciência e de mundo.

Às meninas do Doutorado do CCB/UFPE, Adenilda, Jaci e Liane que muito me ajudaram no início, meio e final deste trabalho.

À família LIKA, em especial a Conceição, Ilma, Verinha, Otaviano, Felipe, Eliane e Moisés, a quem eu importunei diversas vezes, e hoje são muito mais que simples colegas de trabalho.

Aos ex- e atuais integrantes dos setores de Biologia Molecular, Biotecnologia, Bioquímica e Biossensores em especial Ana Catarina Lopes, Juliana (Jujuba), Cecília (Meireles),

Amélia, Alessandro Albertini, Andréa Pacheco, Luciana Oliveira, Ian Porto, Lúcio Pimentel e Ana Catarina Simonetti pelas tantas horas de risadas gostosas, em qualquer dia da semana (inclusive sábado e domingo), compartilhados entre as paredes do LIKA. Aos colegas da minha turma de 2000 (Keila, Jorge, Kenji, Edileine) por compartilhar com todas as expectativas; da turma de 2001 – em especial Fatinha, Lu (Matta), Sil(vana), Mabel e Angélica – que compartilharam mais que experiência profissional, mas um pouco de seu mundo pessoal, estreitando nossos laços e abrindo as portas para uma grande amizade; e sem poder esquecer à turma de 2003, com quem eu tive o prazer de compartilhar momentos graciosos em sala de aula e na mesa do “sítio”.

Às grandes pessoas que me permitiram acertar e errar junto com elas e me fizeram descobrir como é maravilhoso transmitir o conhecimento: Karina Bittencourt, Ana Cristina,

Maíra Mafra, Suany Mirella e Jorge Costa.

Aos grandes amigos do coração Castelletti (Nick), Paulinho, Claudinho, Daiane, Fabiana, que desde o início dos tempos muito me ensinaram, compartilhando experiências, sentimentos, sorrisos e lágrimas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	2
1.1. LEVEDURAS	2
1.1.1. <i>KLUYVEROMYCES</i>	5
1.1.2. <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>	8
1.2. METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS	12
1.2.1. GLICOSE	12
1.2.2. GALACTOSE	15
1.2.3. LACTOSE	18
1.3. METABOLISMO DOS COMPOSTOS NITROGÊNIO	21
1.3.1. AMÔNIA	23
1.3.2. URÉIA	25
1.3.3. GLUTAMATO	26
1.4. A ENZIMA β -GALACTOSIDASE	27

1.5. PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	32
1.5.1. SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO.....	32
1.5.2. PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	36
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II - MANUSCRITO A	57
CAPÍTULO III - MANUSCRITO B	74
CAPÍTULO IV - MANUSCRITO C.....	90
CONCLUSÕES	113
ADENDO	114
ANEXO I	130
ANEXO II	132

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Microscopia eletrônica de varredura de células de <i>Saccharomyces</i>	
<i>cerevisiae</i>	04
FIGURA 2. Microscopia óptica de fluorescência de células de <i>Kluyveromyces</i>	
<i>marxianus</i>	08
FIGURA 3. Desenho esquemático da estrutura molecular da D-glicose	13
FIGURA 4. Desenho esquemático da estrutura molecular da D-galactose.....	16
FIGURA 5. Desenho esquemático do agrupamento dos genes GAL da via <i>Leiloir</i> no	
cromossomo II	16
FIGURA 6. Desenho esquemático da estrutura molecular da D-Lactose	18
FIGURA 7. Desenho esquemático do metabolismo central do nitrogênio em	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
FIGURA 8. Esquema da via de degradação da alantoína-uréia em <i>Saccharomyces</i>	
<i>cerevisiae</i>	26
FIGURA 09. Estrutura 3D da molécula de β -galactosidase da <i>Escherichia coli</i>	28
FIGURA 10. Diagrama de fases de um sistema bifásico aquoso com o componente A e o	
componente B, em percentual	34

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Perfil de crescimento da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 em meio contendo galactose a 28°C e 400rpm.....	70
FIGURA 2. Perfil de crescimento da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 em meio contendo glicose/galactose a 28°C e 400rpm.	71
FIGURA 3. Perfil de crescimento da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 em meio contendo glicose/lactose a 28°C e 400rpm.....	72

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Variação da velocidade máxima de crescimento da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 em meio de cultivo definido contendo lactose 1% e diferentes fontes de nitrogênio 0,5% (glutamato, uréia, sulfato de amônia, fosfato de amônia) em função da temperatura de incubação (26,30, 34, 38, 42°C)	88
FIGURA 2. Atividade específica da β -galactosidase (U/mg prot) em extratos celulares de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 cultivada em meio definido contendo 1% de lactose e 0,5% de diferentes fontes de nitrogênio a 34°C.....	89

CAPÍTULO IV

FIGURA 1. Efeito da massa molar do polímero e da “tie line” sobre o coeficiente de partição da β -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> nos sistemas PEG/fosfato de potássio a 25°C	108
FIGURA 2. Efeito da massa molar do polímero e da “tie-line” sobre o coeficiente de partição	

das proteínas contaminantes nos sistemas PEG/fosfato de potássio a 25°C.....	109
FIGURA 3. Seletividade dos sistemas PEG/fosfato de potássio para partição da enzima β -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556	110
FIGURA 4. Recuperação da atividade da enzima β -galactosidase de <i>Kluyveromyces</i> <i>marxianus</i> CBS6556 nos sistemas PEG/fosfato de potássio.....	111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. Classificação da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> , segundo Kendrick, 1982	06
TABELA 2. Proteínas heterólogas secretadas por diferentes espécies de <i>Kluyveromyces</i> .	07
TABELA 3. Fontes de carbono assimiladas pelas leveduras <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	09
TABELA 4. Exemplos de biomoléculas separadas em sistema bifásico aquoso	38

CAPÍTULO II

TABELA 1. Parâmetros de crescimento e atividade enzimática da linhagem CBS6556 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> cultivada em meio contendo diferentes fontes de carbono em bioreator de bancada 28°C e 400rpm.	73
--	----

CAPÍTULO IV

TABELA 1. Composição (m/m) dos sistemas PEG/fosfato de potássio utilizando quatro diferentes polímeros para formação do sistema bifásico aquoso	112
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	-	Grau Celsius
A	-	Atividade enzimática
AE	-	Atividade enzimática específica
A _I	-	Atividade enzimática na fase inferior
A _S	-	Atividade enzimática na fase superior
BSA	-	Albumina de soro bovino
COD	-	Concentração de oxigênio dissolvido
C _I	-	Concentração de proteína na fase inferior
ϵ	-	Coeficiente de extinção molar
C _S	-	Concentração de proteína na fase superior
DBO	-	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	-	Demanda Química de Oxigênio
DNSA	-	Ácido dinitrosalicílico
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	-	<i>Generally Recognized As Safe</i>
K	-	Coeficiente de partição
K _m	-	Constante de afinidade
kDa	-	Kilodalton
K _E	-	Coeficiente de partição da enzima
K _P	-	Coeficiente de partição da proteína

mM	-	milimoles
ONPG	-	θ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
PEG	-	Polietilenoglicol
R	-	Fator de recuperação
S	-	Seletividade
SCP	-	“Single Cell Protein”
SBA	-	Sistema Bifásico Aquoso
U	-	Unidade internacional
X	-	Biomassa produzida
μ	-	velocidade específica de crescimento
μ g	-	micrograma (corresponde a 10^{-6} grama)
μ l	-	microlitro (corresponde a 10^{-6} litro)
η m	-	nanômetro (corresponde a 10^{-9} metro)

RESUMO

A *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura considerada não-convencional que produz β -galactosidase, enzima que hidrolisa a lactose em glicose e galactose, e que apresenta grande aplicabilidade industrial, sendo utilizada, principalmente, na redução do teor de lactose do leite e seus derivados destinados a pessoas portadoras de intolerância à lactose. A produção de biomassa e de β -galactosidase pela linhagem CBS 6556 de *K. marxianus* foi avaliada sob diferentes condições de cultivo. A atividade da enzima β -galactosidase não parece ser diretamente afetada pela taxa de oxigênio dissolvido, sendo mais importante a fonte de carbono utilizada. Em relação a fonte de nitrogênio, o aumento da atividade enzimática foi mais alta em meio contendo fosfato de amônia, a 34°C (4517,19 U/mg prot). Todavia, a velocidade específica de crescimento foi mais alta na temperatura de 30°C nesta mesma fonte de nitrogênio ($\mu=40h^{-1}$). O coeficiente de partição da enzima β -galactosidase produzida em soro de queijo “coalho” foi avaliado em sistema bifásico aquoso (SBA) polietileno glicol(PEG)/Fosfato de potássio. A partição desta enzima foi afetado tanto pelo tamanho da cadeia do PEG quanto pela concentração dos componentes do sistema. O aumento da concentração do polímero (de 14% para 19,7%) demonstrou exercer grande influência na partição da enzima, resultando em inversão do coeficiente de partição (de $K=0,008$ para $K=2,88$) quando PEG 3350 foi utilizado para formar o SBA. A maior seletividade foi encontrada utilizando PEG 3350 (4,96); e a melhor recuperação da atividade enzimática foi obtida na fase superior do sistema PEG 8000/fosfato de potássio (76%).

Palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus*, β -galactosidase, fosfato de amônia, PEG/sal.

e-mail: bruneska@uol.com.br

ABSTRACT

Kluyveromyces marxianus is non-conventional yeast that produces β -galactosidase, an enzyme that convert lactose into glucose and galactose. This enzyme has great industrial application, being used mainly in the reduction of lactose concentration in milk and derivates destined to people with lactose intolerance. The production of biomass and β -galactosidase by CBS6556 strain for *K. marxianus* was analyzed under different growth conditions. The β -galactosidase activity seems not to be affected by the dissolved oxygen rate, and the carbon source is the most relevant factor for the enzyme activity. Regard to the nitrogen source, the highest β -galactosidase activity was found in ammonia phosphate, at 34°C (4517.19U/mg prot). Nevertheless, the highest specific growth rate was obtained in the same nitrogen source, at 30°C ($\mu=40h^{-1}$). The partition coefficient of the β -galactosidase, produced in “coalho” cheese whey, was analyzed by aqueous two-phase system polyethylene glycol (PEG)/potassium phosphate. The partition behaviour was influenced by PEG chain length as much as concentration of the components in the system. The increase of polymer concentration (from 14% to 19.7%) showed to affect the β -galactosidase partition, resulting in the inversion of the partition coefficient (from $K=0.008$ to $K=2.88$) when PEG3350 was used in the system. The highest selectivity was also observed with PEG3350 (4.96), and the best enzyme recovery was obtained in the bottom phase of PEG8000/potassium phosphate system.

Key words: *Kluyveromyces marxianus*, β -galactosidase, ammonia phosphate, PEG/salt.

e-mail: bruneska@uol.com.br

INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos de grande importância econômica e biotecnológica e têm sido cada vez mais exploradas, tanto em pesquisas científicas quanto em aplicações industriais. O crescente interesse pelas leveduras é devido às diversas vantagens genéticas e fisiológicas desses microrganismos, que possibilitam, por exemplo, a utilização de resíduos industriais como meio de cultivo para a produção de diversos componentes, como biomassa, enzimas e proteínas heterólogas.

Kluyveromyces marxianus é uma levedura considerada não-convencional que tem sido cada vez mais estudada devido à sua capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono, açúcar presente no soro de queijo, resíduo proveniente das indústrias queijeiras. Para tanto, *K. marxianus* produz uma enzima denominada β -galactosidase, que hidrolisa lactose a glicose e galactose; e apresenta grande aplicabilidade nas indústrias alimentícia e farmacêutica, principalmente relacionada ao processamento de alimento para redução do teor de lactose e ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos para melhoria da qualidade de vida dos portadores de intolerância à lactose. Entretanto, para que a β -galactosidase produzida pela *K. marxianus* deva ser utilizada industrialmente, faz-se necessário estudos quanto a forma mais adequada de produção, separação e recuperação desta enzima.

O presente trabalho visa aumentar o conhecimento sobre a utilização da *K. marxianus* para a produção de biomassa e β -galactosidase, em diferentes condições de cultivo, utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como avaliar a potencialidade do sistema bifásico aquoso do tipo PEG/fosfato de potássio para separação desta enzima.

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1.1. LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos que fazem parte do Phylum Ascomycota, dependem do carbono orgânico como fonte de energia e podem ser sapróbios ou parasitas, encontrando-se normalmente associados a vegetais, insetos, húmus ou qualquer outro substrato fornecedor de açúcar (Phaff, 1990; Alexopolous *et al.*, 1996).

As leveduras se apresentam como organismos unicelulares durante a fase vegetativa, podendo ou não formar esporos durante a fase sexuada. Na fase assexuada, ou vegetativa, as células se reproduzem através de divisões mitóticas em processos denominados brotamento multilateral ou fissão, na qual a célula-filha se desprende do corpo da célula-mãe deixando uma cicatriz circular ou ovalada na superfície da célula (Phaff, 1990). A fase sexuada ocorre por esporulação e conjugação, envolvendo mitose e meiose. As leveduras se mantêm no ciclo vegetativo até que condições de estresse se estabeleçam, o que as leva a iniciarem um ciclo de vida meiótico (Castrilho-Valavicius *et al.*, 1992).

O ciclo de vida meiótico das leveduras da classe Ascomycetes é caracterizado pela formação de quatro células haplóides, denominadas ascosporos, contidos dentro de uma estrutura denominada asco. Dentre as quatro células geradas, dois apresentam marca de

acasalamento do tipo a , e dois do tipo α , fatores estes determinados pelo locus *MAT* (Nasmyth & Shore, 1987). A conjugação das células de leveduras só pode ocorrer entre células de diferentes marcas de acasalamento (Castrilho-Valavicius *et al.*, 1992; Walker, 1998). Em linhagens selvagens, pode ocorrer a interconversão de células heterotáticas, processo no qual uma célula do tipo a torna-se α , e vice-versa. Este fenômeno ocorre por conversão gênica, no qual genes silenciosos para expressão de marca de acasalamento, localizados nos loci *HMR* e *HML*, são transferidos para o locus de expressão *MAT* (Nasmyth & Shore, 1987). As linhagens de laboratório são geralmente homotáticas, nas quais uma mutação no gene *HO* impede a interconversão e as células haplóides mantêm um único sinal de acasalamento.

As leveduras possuem um genoma com poucos íntrons e seqüências repetidas, chegando ao máximo de 15.000 kb de comprimento (Oliver, 1996). Estes organismos possuem vários cromossomos lineares compostos por uma cadeia de DNA associada às histonas (Perez-Ortin *et al.*, 1989). A *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1), levedura considerada modelo de estudo, teve seu genoma completamente seqüenciado em 1996, no qual 633 cientistas da Europa, Japão e Estados Unidos descreveram mais de 12 milhões de pares de bases do genoma da levedura e mais de 6400 genes distribuídos em 16 cromossomos (Oliver, 1996).

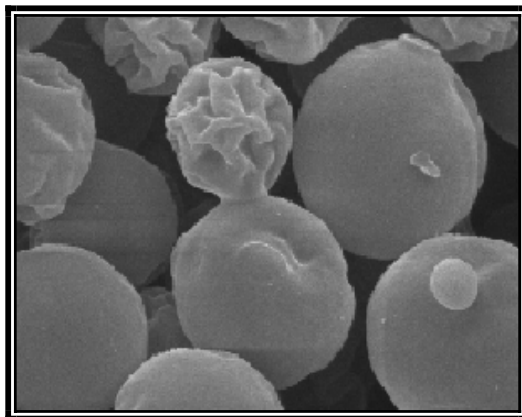


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de células de *Saccharomyces cerevisiae* (chem.ch.huji.ac.il/~eugeniik/biofuel/biofuel_cell2_2.html)

As leveduras apresentam características vantajosas para produção de proteínas heterólogas, uma vez que podem secretar para o meio várias proteínas em sua forma biologicamente ativa, fator que facilita a purificação; além de poderem promover modificações pós-traducionais, necessárias para a ótima atividade e estabilidade, como o processo de glicosilação (Hensing, 1995).

Sua biomassa apresenta composição rica em aminoácidos sulfurados e vitaminas do complexo B, tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico, entre outros. Apresenta baixos níveis de ácidos nucléicos (9,7%), elevada taxa de crescimento, capacidade de utilizar grande variedade de substratos, baixo risco de contaminação, ausência de toxinas e grande quantidade de cinzas, o que caracteriza maior constituição mineral e fornecimento de cálcio, magnésio, sódio e ferro (Anupama & Ravinda, 2000).

Algumas leveduras como *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus* são consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (van der Berg *et al.*, 1990), o que possibilita seu uso em diferentes áreas, das quais se pode citar a indústria de fermentação (vinhos, cerveja, etanol e pão), a indústria farmacêutica (vacinas, probiótico, hormônios e fatores sanguíneos), a indústria química (enzimas, pigmentos, acidulantes de alimentos e redutores químicos), além das pesquisas fundamentais (biologia celular, bioquímica, genética e biologia molecular), das pesquisas biomédicas (metabolismo de drogas, doenças humanas genéticas, câncer e AIDS), e da tecnologia ambiental (biorremediação, utilização de subprodutos industriais, controle biológico e bioabsorção de metais) (Hensing *et al.*, 1995; Walker, 1998; Belém & Lee, 1998).

1.1.1. *KLUYVEROMYCES*

O gênero *Kluyveromyces* é composto por espécies de leveduras homotáticas, diplóides, com alto polimorfismo intra-específico, podendo o número de cromossomos variar de 06 a 12, sendo 08 em sua maioria (Belloch *et al.*, 1998). Este gênero compartilha da mesma classificação da *S. cerevisiae* ao nível de Sub-família (Tabela 1). Pode ser encontrado em diversos *habitats*, tais como: grão de Kefir, leite cru, uma variedade de queijos (Roquefort, Camembert, Cheddar, mussarela de búfala, Gruyère e Beaufort), néctar, pólen, insetos, solo (Rohm *et al.*, 1992; Roostita & Fleet, 1996a,b; Spencer & Spencer, 1997; Suzzi *et al.*, 2000; Beresford *et al.*, 2001).

Tabela 1. Classificação da levedura *Kluyveromyces marxianus*, segundo Kendrick, 1992.

Reino	Fungi
Filo	Dicaryomycota
Subfilo	Ascomycotina
Classe	Saccharomycetes
Ordem	Saccharomycetales
Família	Saccharomycetaceae
Gênero	<i>Kluyveromyces</i>
Espécie	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

Fisiologicamente, a *Kluyveromyces* é classificada como fermentativa facultativa do tipo *Crabtree*-negativa, ou seja, não desenvolve fermentação alcoólica sob condições aeróbicas, mesmo na presença de excesso de glicose, o que constitui uma vantagem biotecnológica em termos de produção de biomassa (Walker, 1998). Entretanto, pode ocorrer uma má regulação do metabolismo respiro-fermentativo, resultando na formação de etanol e outros metabólitos em condições aeróbicas, fenômeno já observado em algumas linhagens de *K. marxianus* (van Dijken *et al.*, 1993).

Em condições de limitação de açúcar em quimiostato aerado, as leveduras *Crabtree*-negativas apresentam carreadores de glicose de alta afinidade, do tipo “*proton/sugar symport*”. Seu sistema de transporte de açúcar é dependente de energia, o que resulta em maior consumo de açúcar e menor açúcar residual quando comparada a leveduras *Crabtree*-

positiva, como *S. cerevisiae* (van Urk *et al.*, 1989; van Dijken *et al.*, 1993; Walker, 1998). É capaz de gerar maior biomassa em processos fermentativos quando comparada às *Crabtree*-positivas, na qual cada molécula de piruvato que é descarboxilada e reduzida a etanol não está mais disponível para o ciclo do ácido cítrico (Breunig *et al.*, 2000).

Os conhecimentos acumulados pela utilização industrial da *Kluyveromyces* na produção de biomassa alimentar e enzimas diversas confirmam que esse gênero tem uma capacidade de produção maior que a *S. cerevisiae*, o que torna esta levedura uma excelente candidata à produção de proteínas heterólogas de interesse industrial (Laloux *et al.*, 1991). Vários genes já foram clonados em *Kluyveromyces* (Tabela 2).

Tabela 2. Proteínas heterólogas secretadas por diferentes espécies de *Kluyveromyces*.

Proteína heteróloga	Promotor	Referência
α -galactosidase	<i>GAL7</i>	Bergkamp <i>et al.</i> , 1993
Lisozima humana	<i>GAL7</i>	Rossolini <i>et al.</i> , 1992
Albumina humana	<i>PGK, LAC4</i>	Fleer <i>et al.</i> , 1991
Proquimosina bovina	<i>LAC4</i>	Van der Berg, 1990
α -galactosidase	<i>INUI</i>	Rouwenhorst <i>et al.</i> , 1988
α -amilase	<i>Nat</i>	Strasser <i>et al.</i> , 1989

K. lactis é a espécie mais estudada do gênero, entretanto, *K. marxianus* constitui uma espécie superior do ponto de vista fisiológico (Rouwenhorst, 1990; Belém & Lee, 1998).

1.1.2. *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

A *K. marxianus* (Hansen) Van der Walt (1971) (Figura 2) é uma levedura encontrada em grãos de kefir, que são utilizados para produção de uma bebida com o mesmo nome, muito popular na Ásia; na qual esta levedura é responsável pela produção do etanol e gás carbônico que contribuem para sabor e aroma característicos da bebida (Belém & Lee, 1998). Esta levedura foi primeiramente descrita com o nome de *S. marxianus* em 1888, e vários sinônimos podem ser encontrados – *S. kefir*, *S. fragilis*, *K. fragilis*, entre outros, mas em 1971 Van der Walt & Johannsen atribuíram-lhe o nome de *K. marxianus* (Kreger avn Rij, 1984).



Figura 2. Microscopia óptica de fluorescência de células de *Kluyveromyces marxianus* (gentilmente cedida pela Ms. Yasodhara Lacerda – Depto. de Genética/UFPE).

K. marxianus apresenta, adicionalmente, características ideais para utilização industrial, tais como: curto tempo de geração em glicose, alta taxa de crescimento, possibilidade de cultivo em temperaturas elevadas (40 a 45°C) e na faixa de pH entre 2,6 e 6,0 (Kreger-van Rij, 1984; Rouwenhorst *et al.*, 1988; Basabe *et al.*, 1996). É capaz de

assimilar inulina, mas é a única espécie do gênero que não assimila ou fermenta α -glicosídeos como a maltose (Belloch *et al.*, 1998). Utiliza uma grande variedade de açúcares como fonte de carbono (Tabela 3) como lactose e frutanas, mediante a produção de lactase e inulinase; além de poder converter glicose, sacarose, lactose e celulose à etanol em temperaturas entre 40 – 50°C sob condições especiais de cultivo (Grootwassig & Fleming, 1980; Kreger-van Rij, 1984; Baron *et al.*, 1995).

Tabela 3. Fontes de carbono assimiladas pela *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte de Carbono	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ácido cítrico	V	-	V
Celobiose	+	+	-
D-ribose	V	-	-
D-xilose	+	V	-
Inositol	-	-	-
Lactose	+	+	-
L-arabinose	+	-	-
Maltose	-	V	V
Rafinose	+	V	V
Sacarose	+	V	+
Trealose	-	+	V

Legenda: (+) positivo, (-) negativo, (v) variável. Fonte: Kreger-van Rij, 1984.

Hensing e colaboradores (1994) obtiveram uma alta taxa específica de crescimento da *K. marxianus* ($\mu_{\max} = 0.86\text{h}^{-1}$) a 40°C em meio definido suplementado com sacarose

como fonte de carbono; uma vantagem industrial particularmente interessante que permite a redução dos custos de resfriamento durante uma fermentação em larga escala.

A *K. marxianus* tem apresentado capacidade de crescer em diversos resíduos biológicos. O melaço é um substrato de baixo custo, rico em sacarose, que pode ser utilizado para cultivo da *K. marxianus* visando à produção de β -galactosidase, enzima normalmente produzida em meio contendo lactose ou galactose como açúcares indutores (Furlan *et al.*, 2000). Suntornsuk (2000) utilizou a *K. marxianus* para produção de biomassa a partir de salmoura de alface, resíduo da indústria de *pickles*, rico em cloreto de sódio e ácido láctico.

Essa levedura tem sido indicada para a produção de proteína celular, enzimas, biomassa e etanol a partir do cultivo em soro de queijo, um sub-produto poluente da indústria de laticínios rico em lactose (Maiorella & Castillo, 1984; Duvnjak *et al.*, 1987; Moresi *et al.*, 1989; van der Berg *et al.*, 1990; Ghaly *et al.*, 1993; Castillo & Ugalde, 1993; Ferrari *et al.*, 1994; Belem & Lee, 1998). A suplementação do soro de queijo com extrato de levedura permitiu um aumento no rendimento em biomassa de culturas de *K. marxianus*, o que não foi observado quando uréia foi utilizada na suplementação deste substrato (Sonawat *et al.*, 1981; Rech *et al.*, 1999).

Apesar da *K. marxianus* ser um dos microrganismos mais utilizados para redução da lactose do soro de queijo, e conseqüente para produção de β -galactosidase, algumas diferenças metabólicas podem ser observadas entre linhagens desta espécie. Sob as mesmas condições de cultivo, a linhagem CBS 6556 foi descrita como sendo capaz de consumir todo o açúcar do soro de queijo “in natura” (70g/L), enquanto que a CBS712 não

apresentou o mesmo rendimento (Rech *et al.*, 1999). O melhor desempenho de diferentes linhagens desta espécie, tanto para produção de biomassa quanto para a produção de β -galactosidase, foi verificado em pH 5,5, entretanto ainda não há consenso sobre a melhor temperatura de crescimento que pode ser entre 30 e 37°C, a qual está diretamente relacionado com as demais condições de cultivo (Furlan *et al.*, 1995; Belloch *et al.*, 1998; Rech *et al.*, 1999).

Em processos experimentais utilizando a *K. marxianus* para produção de pão, esta levedura apresentou capacidade similar de aumento do volume da massa, quando comparada à massa “magra” produzida com *S. cerevisiae*, a levedura padrão no processo de panificação. O volume da massa de pão ainda pode ser aumentado, se a esta massa for adicionado sacarose, lactose ou soro de leite. Nos testes realizados em laboratório não foi detectada diferença entre o sabor do pão feito com *S. cerevisiae* e *K. marxianus* (Caballero *et al.*, 1995).

Esta levedura pode também ser utilizada como complemento alimentar, atuando como probiótico, em ração para aves, bovinos e suínos. Sua biomassa celular, que pode ser gerada pela fermentação de substratos alternativos de baixo custo, pode suprir estas rações com “fatores de crescimento”, reduzindo os custos com a suplementação vitamínica (Ghaly & Singh, 1989). Industrialmente, *K. marxianus* tem sido utilizada há alguns anos para produção em larga escala de “Single Cell Protein” (SCP) – material protéico proveniente de células de microrganismos desidratadas, utilizados em alimentos destinados ao consumo humano ou animal - nos Estados Unidos a partir de soro de queijo pela Amber Laboratories, Wisconsin (Bailey & Ollis, 1986). Também tem sido aplicada para

clarificação de sucos de frutas, devido a sua alta atividade pectinolítica (Schwan *et al.*, 1997).

Apesar de sua genética ainda ser pouco conhecida, vários genes de interesse biotecnológico da *K. marxianus* já foram clonados, tais como: inulinase (Laloux *et al.*, 1991), β -glucosidase (Raynal *et al.*, 1987), endo-poligalacturonase (Siekstele *et al.*, 1999), LEU2 - β -isopropilmalate desidrogenase - (Bergkamp *et al.*, 1991) e URA3 - orotidine-5'-fosfato descarboxilase - (Bergkamp *et al.*, 1993), entre outros. Também tem se mostrado bastante eficiente na expressão de proteínas heterólogas, como exemplo, a produção e secreção de proquimosina bovina e da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Van der Berg *et al.*, 1990; Romanos *et al.*, 1992; Bergkamp *et al.*, 1993).

1.2. METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS

1.2.1. GLICOSE

A glicose é o açúcar primário do metabolismo dos carboidratos em quase todos os microrganismos (Figura 3), e tanto a concentração intracelular quanto a extracelular constituem um sinal de ativação do sistema de repressão de diversos genes e vias metabólicas (Meijer *et al.*, 1998).

Para que seja metabolizada, a glicose deve ser internalizada por proteínas transportadoras que são codificadas pelos genes da família *HXT*, e que apresentam diferentes

afinidades pela glicose, sendo expressos em diferentes etapas do crescimento celular em meio contendo glicose como fonte de carbono (Walsh *et al.*, 1996; Boles & Hollenberg, 1997; Kruckeberg *et al.*, 1998; Carlson, 1998).

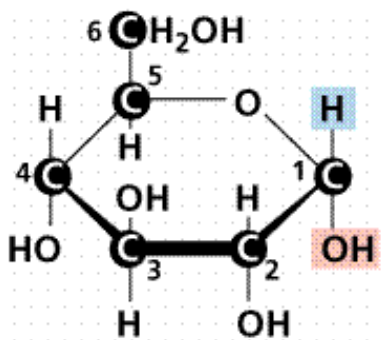


Figura 3. Desenho esquemático da estrutura molecular da D-glicose.

O gene *SNF3* tem sua expressão reprimida por glicose e sua proteína atua como um sensor para a baixa concentração extracelular do açúcar, regulando a expressão dos genes *HXT* (Bisson *et al.*, 1993; Kruckeberg *et al.*, 1998). Entretanto, o gene *RGT2*, que codifica uma proteína de membrana de alta homologia com a proteína Snf3, apresenta uma expressão constitutiva, e é sensível a altas concentrações de glicose no meio (Carlson, 1998; Kruckeberg *et al.*, 1998). A proteína Gal2, expressa a partir de um promotor constitutivo, pode transportar a glicose e galactose, com afinidades semelhantes ($K_m = \sim 2$ mM) (Özcan & Johnston, 1999).

Após a entrada de glicose na célula através destes carreadores específicos, em processo que não requer energia, o açúcar é fosforilado por quinases glicolíticas, como Hxk1p, Hxk2p

e Glk1p. Entretanto, quando cultivadas em meio contendo altas concentrações de glicose como fonte de carbono (cerca de 2%), as células apresentam um sistema de baixa afinidade ao carboidrato, sendo este constitutivo e independente da fosforilação (Walker, 1998). Na regulação do gene da invertase *SUC2*, a concentração extracelular de glicose acima de 18mM leva à repressão do sistema, enquanto que concentrações abaixo de 14 mM são consideradas desrepressivas (Meijer *et al.*, 1998).

Na *K. lactis*, existem dois sistemas de assimilação de glicose: um constitutivo, com alta afinidade para glicose ($K_m = \leq 1$ mM); e outro induzível por glicose, com baixa afinidade para o açúcar ($K_m = 20$ a 50 mM) (Özcan & Johnston, 1999). Apenas três genes foram identificados como responsáveis pelo transporte de glicose em *K. lactis*: *RAG1*, *KHT2* e *HGT1*. O gene *RAG1* codifica uma proteína transportadora de baixa afinidade, sendo necessário para o crescimento em altas concentrações de glicose e frutose, com sua transcrição induzida por alta concentração de glicose, frutose, manose e rafinose. Adicionalmente, a galactose e a lactose também podem induzir sua expressão, apesar de não serem substratos da Rag1p. O gene *KHT2* também codifica uma proteína transportadora de baixa afinidade para glicose, e sua transcrição é induzida em mais de quatro vezes por glicose, independente da concentração do açúcar. O gene *HGT1* codifica uma proteína transportadora de glicose de alta afinidade, sendo necessária para o crescimento das células em baixa concentração de glicose (Özcan & Johnston, 1999). Nesta levedura, o gene *RAG4* apresenta alta homologia aos genes *SNF3* e *RGT2* de *S. cerevisiae*, codificando uma proteína que constitui um sensor de baixa afinidade para glicose, similar às Snf3p e Rgt2p, envolvida na regulação da expressão do transporte de glicose (Kruckeberg *et al.*, 1998).

Em *K. marxianus*, a indução ou desrepressão do sistema de transporte depende da fase de crescimento em que se encontram as células (van den Broek *et al.*, 1986). A regulação deste sistema pode ocorrer por repressão catabólica, inativação catabólica ou indução. Em células cultivadas em altas concentrações de glicose, parece existir apenas um sistema de transporte deste açúcar. Entretanto, quando as células são cultivadas em meio com baixa concentração de glicose é possível observar dois sistemas de transporte para este açúcar, sendo um constitutivo, e outro um “*proton/sugar symport*”, funcional tanto para a glicose como para a galactose. Na presença de glicose durante a fase exponencial, nenhum dos “*proton/sugar symport*” está ativo (de Bruijne *et al.*, 1988).

1.2.2. GALACTOSE

A molécula de galactose difere da molécula de glicose apenas pela localização estérica do radical hidroxila (Figura 4), e sua utilização depende de cinco enzimas codificadas pelos genes *GAL* (Ostergaard, 2000). O sistema *GAL* tem sido utilizado como modelo para estudo da expressão gênica em eucariontes, devido a fácil indução do mesmo pela galactose e repressão pela glicose (Nehlin *et al.*, 1991).

Em *Saccharomyces*, a galactose é transportada para o interior da célula principalmente pela galactose permease, codificada pelo gene *GAL2* (Ostergaard, 2000). Em *K. lactis*, Boze e colaboradores (1987) descreveram três sistemas de transporte para a galactose: (a) um transporte ativo, de baixa afinidade e específico para galactose; (b) um transporte de alta afinidade por galactose, altamente reprimido por glicose, lactose e ácido láctico; e (c) um transporte de difusão facilitada. Em *K. marxianus*, as proteínas transportadoras específicas

para glicose/galactose, tornam-se ativas apenas no fim da fase estacionária, indicando que há um ativador de transporte nesta fase (de Bruijne *et al.*, 1988).

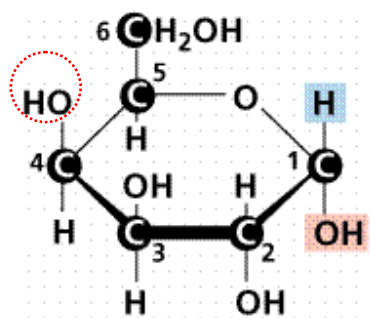


Figura 4. Desenho esquemático da estrutura molecular da D-galactose.

Uma vez no interior das células, a galactose é convertida em glicose-6-fosfato pelos genes da via de *Leloir*, - *GAL2*, *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* e *GAL5* – três dos quais dispostos sob agrupamento gênico presente no cromossomo II, como demonstrado na Figura 5 (Riley & Dickson, 1984; Nehlin *et al.*, 1991; Cardinali *et al.*, 1997).



Figura 5. Desenho esquemático do agrupamento dos genes GAL da via *Leloir* no cromossomo II (Riley & Dickson, 1984; Cardinali *et al.*, 1997).

A galactose intracelular é fosforilada em sua posição 1 pela galactoquinase (Gal1p), gerando a UDP-glicose e a galactose-1-fosfato, sendo esta convertida a glicose-1-fosfato e UDP-galactose, pela ação da uridiltransferase (Gal7p). A UDP-galactose é reconvertida a UDP-glicose pela ação da epimerase codificada pelo gene *GAL10*, enquanto que o grupo

fosfato da glicose-1-fosfato é transferido da posição 1 para a posição 6 com auxílio da fosfoglucomutase (Gal5p) (Ostergaard, 2000). A expressão destes genes é controlada de duas formas: indução por galactose e repressão por glicose. A ativação da transcrição dos genes *GAL* pode ser aumentada em mais de 1000 vezes pela presença de galactose no meio (Romanos *et al.*, 1992; Özcan & Johnston, 1999).

Disfunções no metabolismo humano da galactose resulta em galactosemia, uma enfermidade letal de origem autossômica recessiva que afeta 1 em cada 20.000 recém-nascidos. Mutações no gene humano *GALT*, que codifica a enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (homólogo do gene *GAL7* de *S. cerevisiae*) constitui a causa mais frequente de galactosemia (American Liver Foundation, 1997). Desta forma, as moléculas de galactose passam a se acumular tanto em fibroblastos quanto em eritrócitos do organismo de pacientes portadores desta desordem metabólica (Schwartz *et al.*, 1956; Miller *et al.*, 1968).

A galactose é um açúcar encontrado em resíduos como soro de queijo e materiais lignocelulolíticos, resultando de hidrólises parciais destes últimos (Ostergaard, 2000). Linhagens de *S. cerevisiae* têm sido modificadas geneticamente para permitir o crescimento em lactose através da hidrólise deste dissacarídeo pela β -galactosidase, e desta forma se produzir etanol ou biomassa a partir de soro de queijo (Farahnak *et al.*, 1986; Jeong & Vieth, 1991; Dominques *et al.*, 1999; Rubio-Teixeira *et al.*, 2001). A lignocelulose, por sua vez, está presente em resíduos da indústria açucareira, entre outros. É composto por 50% de celulose, 25% de lignina e 25% de hemicelulose (Pandey *et al.*, 2000). Este último caracteriza-se por ser um heterosacarídeo que contém diferentes monômeros de carboidratos,

inclusive de galactose, que pode variar quanto à sua concentração de acordo com os diferentes tipos de fonte da madeira (Ostergaard, 2000).

Diante de tais considerações, a *K. marxianus* se apresenta como uma levedura de grande potencial de aplicação, uma vez que é capaz de crescer em lactose e galactose, com altas taxa específica de crescimento (Cardinali *et al.*, 1997; Martins, 2000).

1.2.3. LACTOSE

A lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicose) é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de galactose, e está presente no leite e seus derivados (Figura 6). Sua utilização depende da ativação de um sistema de transporte específico e da produção de β -galactosidase (Castillo, 1990).

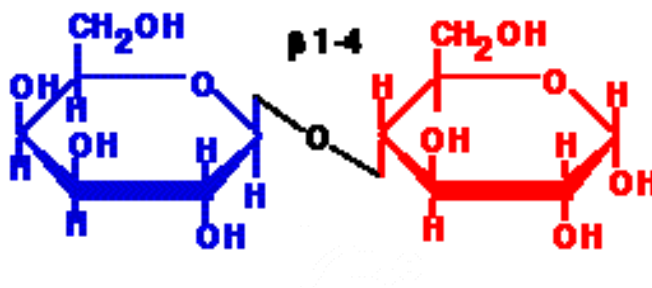


Figura 6. Desenho esquemático da estrutura molecular da D-Lactose (modificado a partir do site www.blc.arizona.edu/.../rick/expression1/inducible.html).

Uma das propriedades que distingue o gênero *Kluyveromyces* do *Saccharomyces* é a habilidade do primeiro em usar a lactose como fonte de carbono e energia. Este fato se deve à presença de genes como *LAC12* e *LAC4*, que codificam, respectivamente, a lactose permease

– responsável pelo transporte da lactose para dentro da célula – e a β -galactosidase – que hidrolisa a lactose gerando glicose e galactose (Sheetz & Dickson, 1981; Riley *et al.*, 1984).

No processo de utilização da lactose como fonte de carbono, algumas leveduras precisam hidrolisar o açúcar e transportar os dissacarídeos gerados através da membrana plasmática. Baseado neste conceito há três grupos distintos de linhagens de *K. marxianus* para utilização da lactose. As linhagens pertencentes ao grupo I apresentam atividade extracelular de β -galactosidase, fermentam lactose, galactose e glicose, e estes açúcares entram nas células por difusão facilitada. As linhagens do grupo II têm capacidade de fermentar apenas glicose e galactose, as quais são transportadas por mecanismos “*proton/sugar symport*”, após hidrólise da lactose pela atividade extracelular de β -galactosidase. O grupo III engloba a maioria das linhagens testadas, sendo capazes de fermentar a lactose e seus subprodutos. Nas células pertencentes a este grupo, a lactose é transportada provavelmente por um “*proton/sugar symport*” que está sujeito à repressão por glicose, enquanto que o transporte de galactose e glicose poderia ocorrer tanto por “*proton/sugar symport*” quanto por difusão facilitada (Carvalho-Silva & Spencer-Martins, 1990). Todavia, em linhagens do grupo III, o transporte de lactose pode ocorrer por intermédio de uma permease específica; e na ausência deste, o sistema de transporte da galactose pode também transportar lactose suficiente para permitir o crescimento celular (Dickson & Barr, 1983).

O regulon *GAL/LAC* em *Kluyveromyces* constitui um conjunto de genes que codificam as enzimas necessárias para o metabolismo da galactose e da lactose. Este sistema genético é

semelhante ao regulon *GAL/MEL* de *S. cerevisiae* (Gödeck *et al.*, 1991). O metabolismo da lactose é controlado ao nível transcricional, e co-regulado pelos genes *GAL* responsáveis pela metabolização da galactose (Breunig *et al.*, 2000). Sete são os genes que atuam neste metabolismo: *LAC4* (Sheetz & Dickson, 1981), *LAC12* (Sreekrishna & Dickson, 1985), *LAC5*, *LAC8*, *LAC9* (Sheetz & Dickson, 1980), *LAC10* (Dickson *et al.*, 1981) e *LAC11* (Riley & Dickson, 1984). Uma vez hidrolisada a lactose, a galactose liberada segue sua via de metabolização, idêntico nas leveduras *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, de forma que os genes que codificam as enzimas da via de *Leloir* em *S. cerevisiae*, *GAL1*, *GAL7* e *GAL10*, apresentam a mesma organização estrutural em *K. lactis*, correspondendo aos genes *LAC11*, *LAC5*, e *LAC8*, respectivamente (Gödeck *et al.*, 1991; Riley & Dickson, 1984). Estes genes, juntamente com *LAC4* e *LAC12*, são regulados pelos produtos dos genes *LAC9(KIGAL4)* e *KIGAL80*.

A repressão do regulon *GAL/LAC* por glicose é dependente da linhagem de *Kluyveromyces* utilizada, de forma que a redução da atividade β -galactosidase pode ser observada em até 100 vezes. Tem sido proposta a divisão das linhagens até o momento estudadas em três grupos de acordo com o nível de repressão por glicose: (1) linhagens que são fortemente reprimidas por glicose, cerca de 50 a 100 vezes, (2) linhagens que são levemente reprimidas por glicose, cerca de 2 vezes e (3) linhagens que praticamente não são reprimidas pela presença de glicose no meio. A diferença na forma de repressão das linhagens já testadas pode estar relacionada ao gene *LAC9*, que codifica uma proteína indutora do gene *LAC4*. (Breunig, 1988; Kuzhandaivelu *et al.*, 1992). Este fator de repressão e indução está relacionado ao promotor. Em *K. lactis* o promotor mais estudado corresponde ao

do gene *LAC4*, que codifica a β -galactosidase, o qual pode ser induzido em até 100 vezes pela presença de lactose ou galactose no meio (Sheetz & Dickson, 1981). Apesar da regulação destes genes ser semelhante a dos genes *GAL* de *S. cerevisiae*, há diferenças significativas uma vez que os genes *GAL* de *K. lactis*, incluindo o *LAC4*, não apresentam repressão total por glicose (Romanos *et al.*, 1992).

Quando comparada à *S. cerevisiae*, a *K. lactis* apresenta maior velocidade de crescimento em galactose, sendo a concentração de galactose intracelular a responsável pela indução do *regulon LAC/GAL* (Cardinali *et al.*, 1997), o que constitui uma vantagem industrial desta levedura.

1.3. METABOLISMO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS

O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais para o crescimento de microrganismos. A fonte de nitrogênio administrada numa dieta em animais é normalmente degradada a amônia ou glutamato, e convertida a glutamato e glutamina, metabólitos doadores do radical amino em reações de síntese para a formação de aminoácidos e ácidos nucléicos. Estas duas etapas, conversão da fonte de nitrogênio e síntese de compostos nitrogenados são de extrema importância para o crescimento dos microrganismos (Wiame *et al.*, 1995). Em plantas e microrganismos a principal fonte de nitrogênio é constituída por sais de amônia (Magazanik e Kaiser, 2002). Em leveduras, fontes de nitrogênio como amônia, asparagina e glutamina

propiciam alta taxa de crescimento, sendo preferenciais em relação à uréia ou prolina. Entretanto, o crescimento pode ser maior em meio contendo glutamato que em amônia (Cooper, 1982).

Na década de 60, Hierholzer & Holzer fizeram as primeiras observações sobre a regulação do nitrogênio na levedura *S. cerevisiae*, demonstrando que os níveis intracelulares de glutamato desidrogenase dependente de NAD (GDH - E.C. 1.4.1.2) e glutamina sintetase (GS -E.C. 6.3.1.2) eram muito baixos em células crescidas em meio contendo amônia, glutamina, ou asparagina quando comparadas aos valores obtidos em células cultivadas em glutamato ou aspartato como fonte de carbono. Desta forma, verificou-se que a via metabólica da enzima glutamato desidrogenase dependente de NADPH (E.C. 1.4.1.4) é a principal rota de assimilação de amônia nesta levedura (Magazanik, 1992).

A via GS-GOGAT (glutamina sintase-glutamato sintase) constitui a principal via de assimilação de amônia em plantas. Já na bactéria *Klebsiella aerogenes*, esta via está ativa apenas em baixas concentrações de amônia, sendo substituída pela via do GDH quando a amônia encontra-se em excesso no meio. Nas leveduras *Candida sp.* e *Schizosaccharomyces sp.* (Tempest *et al.*, 1970; Meers *et al.*, 1970; Mifflin *et al.*, 1980; Holmes *et al.*, 1989; Barel & MacDonald, 1993) e *K. lactis* (Valenzuela *et al.*, 1995) a via GS-GOGAT é a principal rota de assimilação de amônia, sem, entretanto, estar relacionada com a concentração extracelular de amônia.

1.3.1. AMÔNIA

Em *S. cerevisiae*, existem duas vias principais de conversão do nitrogênio, ou dos compostos nitrogenados. Primeiro, o nitrogênio deve ser convertido em glutamato e glutamina (Figura 7). Na segunda parte, o glutamato e a glutamina são utilizados para a biossíntese dos outros compostos orgânicos nitrogenados.

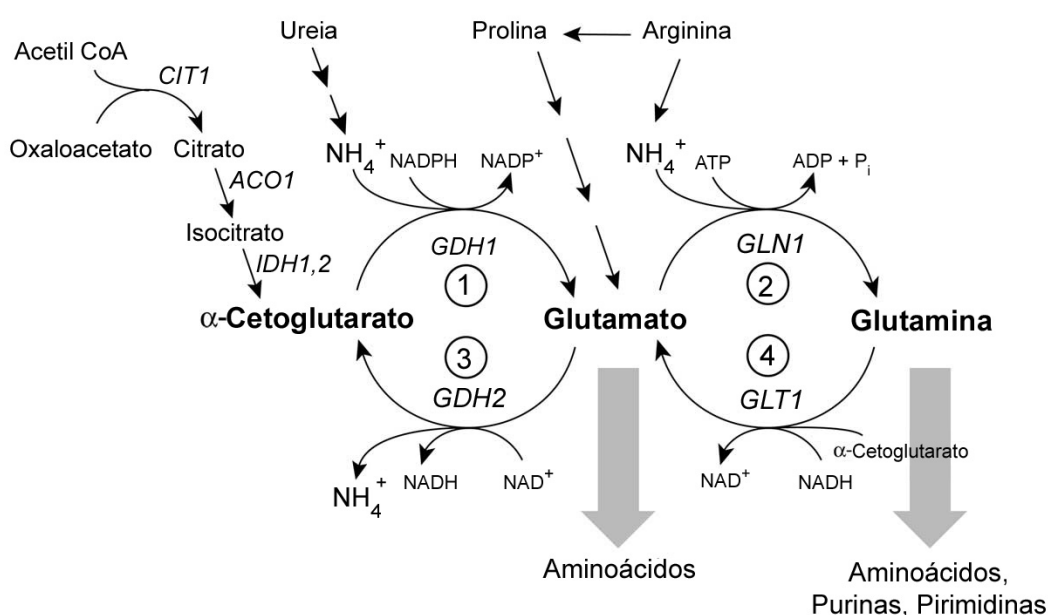


Figura 7. Desenho esquemático do metabolismo central do nitrogênio em *Saccharomyces cerevisiae* (modificado a partir de Magasanik & Kaiser, 2002).

A principal via de utilização da amônia em *S. cerevisiae* é através da reação catalisada pela glutamato desidrogenase NADP^+ -dependente, codificada pelo gene *GDH1* (α -cetoglutarato + $\text{NADPH} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{glutamato} + \text{NADP}^+$) e o glutamato é posteriormente convertido à glutamina pela ação da glutamina sintase (GS) ($\text{glutamato} + \text{ATP} \rightarrow \text{glutamina}$

+ ADP). Se as condições de cultivo favorecem apenas a formação de glutamato, amônia intracelular é liberada pela ação da glutamato desidrogenase NAD^+ -dependente, codificada pelo gene *GDH2* ($\text{glutamato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADH}$). Glutamato também pode ser formado pela ação da glutamato sintase (GOGAT) ($\text{glutamina} + \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADH} \rightarrow 2 \text{ glutamato} + \text{NAD}^+$) (Magasanik, 1992). Quando a concentração de amônia excede 5 mM, células de *S. cerevisiae* utilizam a via GDH, enquanto que concentrações mais baixas induzem a atividade da via GS-GOGAT. Células de *K. lactis* parecem utilizar principalmente a via GS-GOGAT como principal via de biossíntese de glutamato (Valenzuela *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 2000), em oposição a *S. cerevisiae*. Esta via é energeticamente desfavorável, pois consome ATP. Entretanto pode estar relacionada com a manutenção do equilíbrio redox na oxidação de NADH produzido pela glicólise, uma vez que a fermentação alcoólica não ocorre nesta levedura em condições de suprimento de oxigênio.

A mudança de expressão de *GDH1* para *GDH2* durante o cultivo ocorre devido à alteração na fonte de nitrogênio, quando a glutamina é substituída por glutamato (Miller & Magasanik, 1991). Glutamato e glutamina são os produtos finais da via de assimilação de nitrogênio, e podem ser encontrados nas formulações dos meios de cultura contendo Bactopeptona comercial (Magasanik & Kaiser, 2002).

Células de *S. cerevisiae* cultivadas em amônia apresentam menor velocidade de crescimento com maior produção de glicerol, enquanto na presença de aminoácidos esta velocidade é aumentada com conseqüente diminuição na produção de glicerol. A glutamina é

o principal metabólito intermediário para a regulação do metabolismo do nitrogênio. Entretanto, o excesso de glutamina, assim como amônia, em culturas em batelada resulta em repressão do metabolismo do nitrogênio, ao contrário do glutamato (Albers, 1996).

O controle da expressão dos genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio dá-se, provavelmente, pela ativação do gene *URE2* devido à alta concentração de glutamina intracelular, observada em células cultivadas em amônia, glutamina ou asparagina. Este gene codifica uma proteína repressora que, juntamente com o produto do gene *GLN3*, regula a síntese de GS em resposta à fonte de nitrogênio para ajustar a concentração intracelular de amônia de forma que a glutamina se mantenha em nível considerado ótimo pela célula para o crescimento (Courchesne & Magasanik, 1988).

1.3.2. URÉIA

A uréia é formada por duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono, sendo degradada pela via da alantoína-uréia. A uréia pode ser transportada para o interior da célula por dois tipos de transporte. O primeiro, com alta afinidade, requer a presença de glicose e leva a um aumento de 200 vezes na concentração de uréia no interior da célula, sendo induzido pela presença de alofanato e oxalurato.

O transporte por difusão facilitada, não sujeito a repressão por nitrogênio, é induzido quando a concentração de uréia é maior que 5mM (Cooper, 1982). Uma vez no interior da célula, a uréia é carboxilada e posteriormente hidrolisada para produzir duas moléculas de amônia e duas de dióxido de carbono (Figura 8) (Wiame *et al.*, 1985).

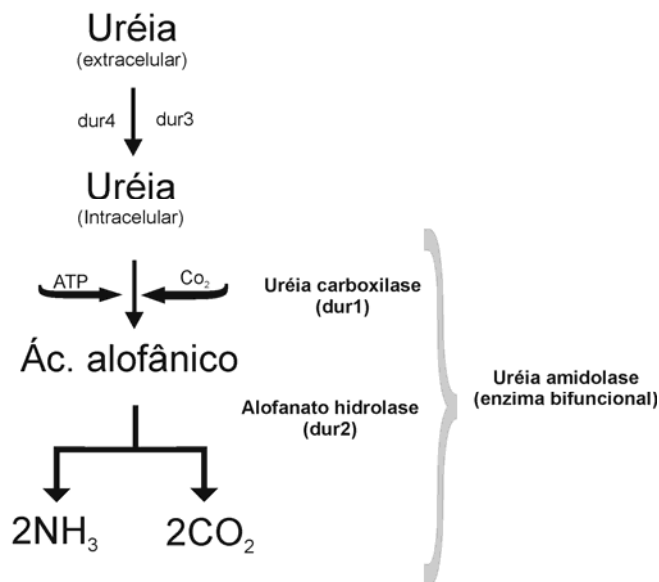


Figura 8. Esquema da via de degradação da alantoína-uréia em *Saccharomyces cerevisiae* (modificado a partir de Wiame *et al.*, 1985).

1.3.3. GLUTAMATO

Em culturas de *S. cerevisiae* contendo glutamato como fonte de nitrogênio, os níveis de glutamato desidrogenase dependente de NAD^+ e glutamina sintetase são bem maiores que os valores observados nos cultivos contendo prolina ou glutamina, uma vez que esta última produz glutamina a partir da amônia gerada pela enzima glutamato desidrogenase dependente de NAD^+ (Magasanik, 1992; ter Schure *et al.*, 1996).

Zeeman *et al.* (1999) observaram que para *K. lactis* a taxa específica de crescimento, em meio mínimo contendo glicose como fonte de carbono, foi mais alta em glutamato ($0,57h^{-1}$) do que em amônia ($0,40h^{-1}$) ou nos demais aminoácidos.

1.4. A ENZIMA β -GALACTOSIDASE

A β -galactosidase (β -D-galactoside galactohidrolase, E.C. 3.2.1.23) (Figura 09) é uma enzima que apresenta vários sinônimos como: lactase, β -D-galactoside, β -D-lactosidase, galactohidrolase, beta-D-galactanase, além de alguns nomes comerciais (Maxilact, Hydrolact, Lactozym, Oryzatym, Sumiklat). Foi primeiramente descrita por Beijerinck em 1889 em células de *S. kefir* e *S. tyrocola* (Rouwenhorst *et al.*, 1989). É capaz de converter a lactose, através da hidrólise da extremidade não-redutora da galactose, pode utilizar β -D-galactosídeos, α -D-fucosídeos e β -D-glicosídeos como substrato (http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.2.1.23). A lactose está presente no leite e seus derivados; e pode fazer parte da composição de doces, confeitados, pães e molhos por fornecer boa textura ao produto, além de servir como ligante da água ao corante; sendo três vezes menos doce que a sacarose e 50% menos que a glicose (Vesa *et al.*, 2000).

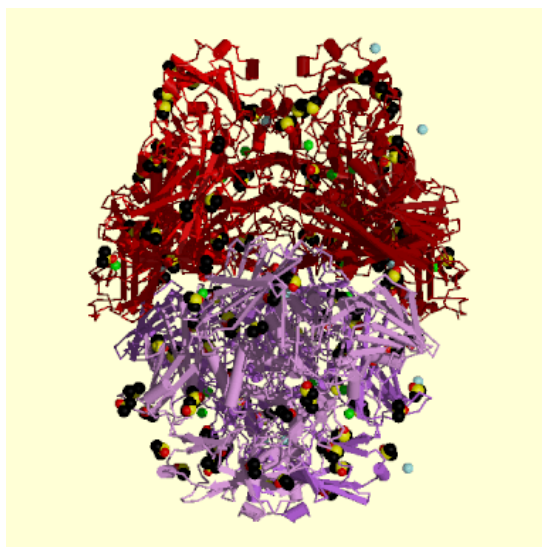


Figura 09. Estrutura 3D da molécula de β -galactosidase da *Escherichia coli*. (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1jz3/main.html>).

Esta enzima tem aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica, estando principalmente ligada ao desenvolvimento de produtos que propiciem a melhoria da qualidade de vida dos portadores de intolerância a lactose.

A hipolactasia ou intolerância a lactose é um problema de digestibilidade da lactose devido à deficiência da enzima lactase-florizin hidrolase (homóloga a β -galactosidase) que hidrolisa o açúcar do leite, e normalmente está presente e ativa na porção inicial do intestino, denominada jejuno. Esta doença pode ser congênita, determinada por um gene autossômico recessivo; ou adquirida devido a processos como gastroenterectomia, redução do intestino ou doenças como colites ou inflamação intestinal, onde há um comprometimento do epitélio intestinal (Enattah *et al.*, 2002). Sua incidência é muito alta em países asiáticos (chegando a 100% em alguns destes), entre negros dos Estados Unidos (80%), sicilianos e mexicanos

residentes nos Estados Unidos (70%) e entre os sul-americanos e africanos (50%) (Vesa *et al.*, 2000). No Brasil, dados da Unifesp-SP (2002) indicam que 70% dos brasileiros sofrem desta doença, apesar de 60% dos casos serem assintomáticos.

Na indústria alimentícia, muitos alimentos, como leite, queijo, sorvetes, bebidas lácteas e iogurte são submetidos aos processos de redução do teor de lactose para permitir seu consumo por pessoas portadoras de hipolactasia. Tais processos podem ser realizados por hidrólise ácida, porém, fatores como a desnaturação das proteínas, a formação de bioprodutos indesejáveis, a necessidade de etapas adicionais de desmineralização e descoloração aliada ao alto custo de construção de uma planta piloto resistente a condições de estresse químico fazem com este método seja substituído pelo método enzimático. Neste processo, a enzima solúvel ou imobilizada é utilizada para hidrolisar a lactose, sem que haja necessidade de etapas adicionais ao processo e com possibilidade de re-utilização do reator no caso das enzimas ligadas aos suportes insolúveis (Gekas & López-Leiva, 1985). Esta tecnologia também é utilizada para redução dos níveis de lactose do doce-de-leite, prevenindo a cristalização do produto gerada pela baixa solubilidade da lactose (Santos *et al.*, 1998).

Os microrganismos se apresentam como ótimas fontes de β -galactosidase e podem ser utilizados para produção desta enzima sob diferentes condições de cultivo (Geka & López-Leiva, 1985). Microrganismos como *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Rhizomucor sp.*, *Penicillium simplicissimum* têm sido estudados quanto as suas potencialidades de utilização industrial para produção de β -galactosidase (Geka & López-Leiva, 1985; Shaikh *et al.*, 1997). A maioria das lactases

comercializadas pela SIGMA-Aldrich Co. (USA) são derivadas de *Aspergillus oryzae*, *K. lactis* e *K. marxianus*.

Esta enzima é normalmente produzida através do cultivo da *Kluyveromyces* na presença de lactose ou galactose, açúcares indutores da produção desta enzima, sendo a taxa de conversão da lactose dependente da concentração do substrato (Santos *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2002). Em *K. lactis*, esta enzima é composta por monômeros de 124kDa, com peso molecular variando entre 130 e 440 kDa. Pode ser encontrada ativa em sua forma dimérica e tetramérica, estando este fator relacionado às condições de extração da enzima (Becerra *et al.*, 1998).

O soro de queijo é um sub-produto da indústria queijeira e um poluente ambiental em potencial, responsável pela alta demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO) de cerca de 40g/L devido à alta concentração de lactose (aproximadamente 5%). Esta característica faz do soro de queijo um resíduo que pode ser utilizado como substrato para produção da β -galactosidase e demais produtos de interesse biotecnológico pela *Kluyveromyces*, com conseqüente redução do descarte do soro de queijo *in natura*, e da poluição ambiental (Berruga *et al.*, 1997; Belém & Lee, 1998).

Vários grupos de pesquisa têm buscado as melhores condições de utilização do soro de queijo para produção de biomassa, enzimas e etanol. Para produção de β -galactosidase, tem sido relatado na literatura que altas concentrações de lactose e galactose no meio de cultura podem reprimir a produção da enzima (Dickson e Markin, 1980; Castillo, 1990; Martins *et al.*, 2002). Em *K. lactis*, a presença de 1 a 2 mM de lactose no meio de cultura pode induzir a

atividade β -galactosidase ao nível máximo quando as células são pré-cultivadas em glicerol como fonte de carbono. Segundo Dickson & Markin (1980), a β -galactosidase de *K. lactis* apresenta uma regulação por glicose do tipo repressão catabólica transiente, na qual células pré-cultivadas neste açúcar apresentam uma fase *lag* antes de alcançarem a taxa diferencial máxima para a síntese da β -galactosidase quando submetidas ao cultivo em lactose. Entretanto, nesta levedura a glicose não é capaz de impedir a captação ou utilização da lactose pelas células, como também não há consumo preferencial de glicose em relação à lactose como fonte de carbono (Dickson & Markin, 1980). O período transiente é acompanhado pelo acúmulo inicial da lactose, havendo uma queda da população celular devido à indução do transporte de lactose e das enzimas catabólicas (Dickson & Barr, 1983; Inchaurredo *et al.*, 1998). Quando a concentração de lactose extracelular se encontra em 5mM, a biomassa apresenta uma redução, enquanto a lactose é acumulada (Inchaurredo *et al.*, 1998).

A β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces* é geralmente mais estável em pH neutro, sendo mais indicada para utilização em soros de queijo doces, enquanto que a enzima produzida por *Aspergillus niger* é mais utilizada em soros ácidos, com pH entre 3,5 e 4,5 (Santos *et al.*, 1998). Além disto, a β -galactosidase proveniente de leveduras é mais termolábil que as fúngicas e bacterianas, com a enzima proveniente de células de *Kluyveromyces* permeabilizadas ou imobilizadas apresentando estabilidade térmica até 52°C (Tomáška *et al.*, 1995). Em *K. marxianus*, a atividade da β -galactosidase é maior a 37°C, mas ocorre uma grande redução quando incubada a 40°C. Entretanto, esta enzima mantém 40% de sua atividade sob a temperatura de 4°C (Brandy *et al.*, 1995; Rech *et al.*, 1999).

1.5. PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE BIOMOLÉCULAS

A maioria das técnicas de separação utilizadas em processos bioquímicos industriais para isolamento e recuperação de enzimas são altamente dependentes do tamanho da partícula, como é o caso da filtração e centrifugação (Kula *et al.*, 1982; Castro & Cabral; 1988). A extração líquido-líquido é um procedimento já utilizado industrialmente, na qual ocorre a separação dos componentes em solução pela sua distribuição entre duas fases líquidas imiscíveis (Hatton, 1985; Kennedy & Cabral, 1993). Este processo apresenta vantagens como fácil escalonamento, fácil manipulação e baixo custo de montagem, não envolvendo equipamentos mais sofisticados. A possibilidade de uso de componentes atóxicos, passíveis de esterilização, com capacidade de formar emulsões estáveis com o material biológico e imiscíveis em água são fatores que influenciam na escolha do melhor método de extração líquido-líquido. A utilização do sistema bifásico aquoso possibilitou a solução de alguns problemas decorrentes do uso de solventes orgânicos e ao efeito desnaturante destes compostos em uma fase orgânica no processamento de bioprodutos sensíveis (Albertsson, 1986; Matiasson *et al.*, 1987; Cabral *et al.*, 1993).

1.5.1. SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO

A extração líquido-líquido utilizando o sistema de duas fases aquosas foi primeiramente descrito pelo microbiologista Beijerinck (1896) para formação de duas fases quando gelatina, ágar e água eram misturadas em determinadas concentrações. Entretanto, este procedimento só ganhou atenção nos anos 50, quando Per-Ake Albertsson utilizou o

polietileno glicol (PEG) e fosfato de potássio ou dextrana para formação de sistemas de duas fases na presença de água, iniciando o histórico de utilização dos sistemas bifásicos aquosos (SBA) PEG/sal e PEG/Dextrana para estudos analíticos e purificação de biomoléculas (Albertsson, 1986; Diamond *et al.*, 1992).

O PEG é um homopolímero não iônico e hidrofílico, constituído por repetições de resíduos de etileno ligados por um átomo de oxigênio $[\text{HO}-(\text{HH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}]$ (Ribeiro, 2000). Apresenta amplas utilizações industriais, sendo encontrado na composição de produtos farmacêuticos e cosméticos. Em procedimentos bioquímicos, o PEG é utilizado para formação de sistemas de extração líquido-líquido e para precipitação de biomacromoléculas, uma importante etapa do processo de cristalografia que permite o estudo da estrutura molecular das proteínas a partir de cristais (Albertsson, 1986; Abbott *et al.*, 1991; McPherson, 1999).

Os sistemas de duas fases aquosas são normalmente formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrofílicos ou de um polímero e uma solução de sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação das duas fases, com predomínio de um dos componentes em cada fase (Albertsson, 1986).

Cada SBA é caracterizado por um único diagrama de fases, que contém a composição das fases em equilíbrio para o sistema e auxiliam no desenvolvimento de modelos termodinâmicos (Diamond & Hsu, 1992; Zaslavsky, 1995). Um diagrama de fases é apresentado na Figura 10, na qual a concentração do componente A (que pode ser um sal) é grafado na abscissa e a concentração do componente B (um polímero) na ordenada; ambos expressos em percentual (massa/massa). A linha curva que separa as duas áreas é chamada de binodal, acima da qual todas as misturas representadas apresentam duas fases,

enquanto que as misturas abaixo desta linha apresentam-se homogêneas (Zaslavsky, 1995). A linha que une dois pontos acima da binodal denomina-se linha de amarração (“tie-line”), e qualquer ponto sobre esta linha resulta num sistema em que as fases têm a mesma composição, embora apresentem volumes diferentes. O comprimento da “tie-line” (AB e AC) depende da concentração total do sistema, e à medida que o comprimento diminui ($CB \rightarrow C'B'$), o sistema aproxima-se do ponto crítico (K), o ponto na binodal em que os volumes e composições das fases tornam-se teoricamente iguais (Ribeiro, 2000).

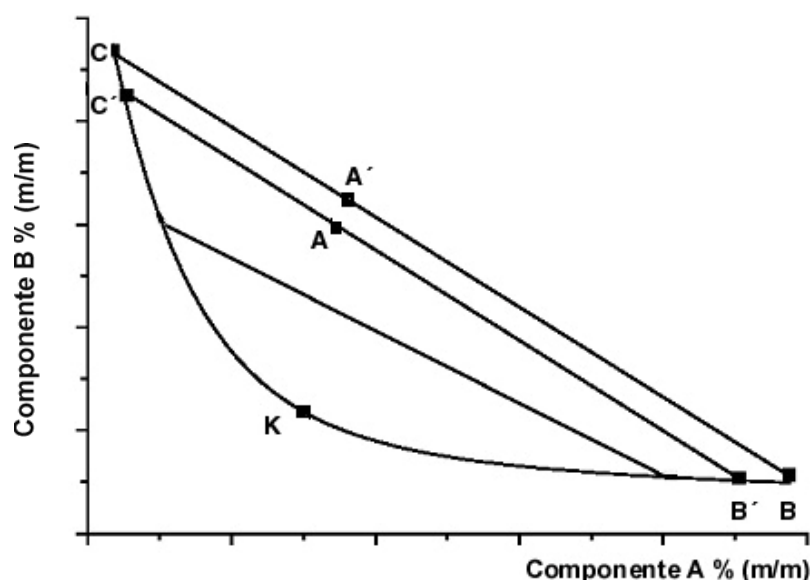


Figura 10. Diagrama de fases de um sistema bifásico aquoso com o componente A e o componente B, em percentual (*massa/massa*) (modificado a partir de Oliveira *et al.*, 2002).

Diferentes “tie-lines” resultam em sistemas de diferentes composições em cada fase. A composição dos sistemas pode ser facilmente caracterizada pelo comprimento da “tie-

line”, uma vez que sistemas que compartilham a mesma “tie-line” tem uma mesma composição na fase superior e inferior, e apresentam comportamento de partição similar (Walter, 1985).

Este diagrama de fases pode ser influenciado por vários fatores, tais como:

- ❖ Massa molar dos polímeros, na qual com o aumento da massa molar há uma redução na concentração deste polímero para que haja separação das fases (Diamond & Hsu, 1992);
- ❖ Hidrofobicidade do polímero, na qual usualmente quanto maior a hidrofobicidade entre dois polímeros que compõem o sistema, menor a concentração de polímero necessária para que ocorra a separação das fases (Albertsson, 1986);
- ❖ Tipo de sal utilizado nos sistemas polímero/sal. Neste sistema, quanto maior a carga do ânion, menor a concentração de sal necessária para formar as fases. Adicionalmente, ânions multivalentes, como o fosfato, são mais eficazes para formar o SBA do que sais monovalentes como a hidroxila ($\text{PO}_4^{-3} > \text{citrato} > \text{SO}_4^{-2} > \text{OH}^-$) (Ananthapadmanabhan & Goddard, 1986);
- ❖ Tempo de separação das fases, que varia consideravelmente para os diferentes sistemas (5 a 30 min para sistemas PEG/sal ou PEG/Dextrana, e 1 a 6 horas para sistemas Ficoll/Dextrana), de acordo com a diferença de densidade, a viscosidade. Este tempo é mais longo quando a concentração dos polímeros está mais próxima do ponto crítico (K), devido a pequena diferença de densidade, ou mais distante quando a concentração dos polímero e a viscosidade são altas, de forma que composições

intermediárias favorecem separação de fases em menor tempo (Albertsson, 1986);

- ❖ Temperatura, que pode variar de acordo com o tipo de sistema utilizado. Sistemas PEG/sal formam fases mais facilmente em temperaturas mais altas, enquanto que nos sistemas PEG/Dextrana a separação das fases é melhor obtida em baixa temperatura (Diamond & Hsu, 1992; Zaslavsky, 1995).

Ambas as fases de um sistema bifásico aquoso são caracterizadas pela grande quantidade de água (80 - 90%), com ambas as densidades próximas a 1. A diferença de densidade entre as fases é maior em sistemas PEG/fosfato (0,04 – 0,01) do que em sistemas PEG/Dextrana (0,02 – 0,07). A tensão interfacial também é baixa nestes sistemas, sendo menor à medida que a composição do sistema se aproxima do ponto crítico (Kula, 1985). Demais vantagens como fácil escalonamento a partir de experimentos laboratoriais; rápida transferência de massa e equilíbrio com baixo gasto de energia; possibilidade de utilização em processos contínuos; separação seletiva e rápida; e possibilidade de utilização em temperatura ambiente torna o SBA um procedimento cada vez mais estudado e aplicado para separação de biomoléculas (Albertsson, 1986).

1.5.2. PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

A partição de biomoléculas em sistema bifásico aquoso tem sido aplicado as células de plantas e animais, organelas celulares, membranas, enzimas, DNA, entre outros (Kim & Yoo, 1991; Strdanský *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2002; Kepka *et al.*, 2004). O coeficiente

de partição de uma substância solúvel é caracterizado pela sua distribuição entre as fases do sistema bifásico aquoso, sendo utilizado para quantificar o grau de separação encontrado no processo de extração, e é definida pela equação:

$$K = \frac{C_s}{C_i}$$

sendo C_s e C_i as concentrações de equilíbrio dos componentes particionados nas fases superior e inferior, respectivamente (Blázquez *et al.*, 2001). Quando partículas sólidas são adicionadas ao sistema, como células e organelas, a interface do sistema também deve ser considerada, uma vez que a mesma adsorve quantidades significativas de material (Albertsson, 1986).

As características de partição dependem das propriedades de superfície da biomolécula a ser separada. Aspectos como massa molar, forma, tamanho; hidrofobicidade e sítios específicos de ligação presentes na superfície da molécula afetam o comportamento de partição, porém a carga da superfície do material biológico é o fator de maior significância para partição (Walter, 1977; Brooks *et al.*, 1985). Alteração nas condições dos sistemas, como pH, força iônica, massa molar e tipo de polímero pode levar a alteração no coeficiente de partição de uma biomolécula (Chaves *et al.*, 2002).

Em sistemas do tipo PEG/sal, a partição do material biológico é fortemente influenciada pela concentração do sal, o que pode ser atribuído aos efeitos do “salting-out”, que depende do tipo de sal utilizado no sistema (Kula *et al.*, 1982; Kim, 1986). O efeito do sal na partição da biomolécula é causado pela distribuição não-homogênea dos íons de sal nas duas fases, o que resulta em uma diferença de potencial elétrico entre a fase superior e inferior. Este efeito resulta, geralmente, numa fase superior mais densa e rica em PEG,

enquanto que a fase inferior torna-se menos densa, negativamente carregada e rica em sal (Bandyopadhyay, 1987; Han & Lee, 1997). Desta forma, biomoléculas carregadas negativamente em pH neutro normalmente migram para a fase superior, e o coeficiente de partição tende a aumentar em torno do pH 7,0 quando a concentração dos íons fosfato num sistema PEG/fosfato é aumentada (Albertsson, 1986). Normalmente, o aumento da “tie-line” nestes sistemas promove a transferência das proteínas da fase rica em sal (inferior) para a fase rica em PEG (superior), e caso a solubilidade das proteínas nesta fase não seja suficientemente elevada, deverá ocorrer precipitação destas na interface (Kim, 1986).

O sistema bifásico aquoso tem sido utilizado para partição de substâncias solúveis e partículas insolúveis (Tabela 4), permitindo estudos de analíticos e estruturais, além da separação e recuperação das biomoléculas de interesse.

Tabela 4. Exemplos de biomoléculas separadas em sistema bifásico aquoso.

Biomoléculas	Sistema	Referências
β -glucosidase	PEG/Dextrana	Johansson & Reczey, 1998
α -amilase	PEG/Dextrana	Kim & Yoo, 1991
Celulase	PEG/Dextrana	Ülger & Saglam, 2001
β -galactosidase	PEG/Fosfato	Kuboi <i>et al.</i> , 1995
	PEG/Reppal	Chen & Hang, 1991
Proteínas do soro	PEG/sal	Alves <i>et al.</i> , 2000
		Wu <i>et al.</i> , 2001
Pectinases	PEG/Fosfato	Lima <i>et al.</i> , 2002
Células de <i>K. marxianus</i>	PEG/Dextrana	Strdanský <i>et al.</i> , 1994
DNA plasmidial	PEG/Dextrana	Kepka <i>et al.</i> , 2004

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N.L.; BLANKSCHTEIN, D.; HATTON, T.A. On protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Macromolecules**, v.24, p.4334-4348, 1991.

ALBERS, E.; LARSSON, C.; LINDER, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 3187-3195, 1996.

ALBERTSSON, P-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd ed, Wiley, New York, 1986.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology, 4th ed, John Wiley & Sons, Inc, Canada, 1996.

ALVES, J.G.L.F.; CHUMPITAZ, L.D.A.; DA SILVA, L.H.M.; FRANCO, T.T.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.235-239, 2000.

American Liver Foundation. <http://sadio.ucsf.edu/alf/alfinal/infogalactosemia.html> 1997.

ANANTHAPADMANABHAN, K.P.; GODDARD, E.D. Correlation between clouding and aqueous biphasic formation in polyethylene oxide/inorganic salt system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.113, p.294-296, 1986.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18, p.459-479, 2000.

BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd ed, McGraw-Hill Book Company. Singapore, p.839-847, 1986.

BANDYODHYAY, D. *In*: Pretlow T.G.I.I, Pretlow T.G., editors. Cell separation. Methods and Selected Applications, vol 4. Orlando, Academic Press, p. 171-194, 1987.

BAREL, I.; MACDONALD, D.W. Enzyme defects in glutamate-requiring strains of *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Microbiology Letters**, v.113, p.267-272, 1993.

BARRON, N.; MARCHANT, R.; McHALE, L.; McHALE, A.P. Partial characterization of β -glucosidase activity produced by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on cellobiose-containing media at 45°C. **Biotechnology Letters**, v.17, p.1047-1050, 1995.

BASABE, L.; CABRERA, N.; YONG, V; MENEDEZ, J.; DELGADO J.M; RODRIGUEZ, L. Isolation and characterization of mutants as an approach to a transformation system in *Kluyveromyces marxianus*. **Current Genetics**, v.30, p. 89-92, 1996.

BECERRA, M.; CERDÁN, E.; GONZÁLEZ SISO, M.I. Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. **Biotechnology Techniques**, v.12, p.253-256, 1998.

BELEM, M.A.F & LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: An alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, p.565-598, 1998.

BELLOCH, C.; BARRIO, E.; GARCIA, M.D.; QUEROL, A. Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Yeast**, v.14, p.1341-54, 1998.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COOGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p.259-274, 2001.

BERGKAMP RJ, GEERSE RH, VERBAKEL JM, MUSTERS W, PLANTA RJ. Cloning and disruption of the LEU2 gene of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Yeast**, v.7, p.963-70, 1991.

BERGKAMP RJ, GEERSE RH, VERBAKEL JM, PLANTA RJ. Cloning and sequencing of the URA3 gene of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Yeast**, v.9, p.677-81, 1993a.

BERGKAMP, R.J.M.; BOOTSMAN, T.C.; TOSCHKA, H.Y.; MOOREN, A.T.A.; KOX, L.; VERBACKEL, J.M.A.; GEERSE, R.H.; PLANTA, R.J. Expression of an α -galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p. 309-317, 1993b.

BERRUGA, M.I.; JASPE, A.; SAN JOSE, C. Selection of yeasts strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, v.40, p.119-123, 1997.

BISSON, L.M.; COONS, D.M.; KRUCKEBERG, A.L.; LEWIS, D.A. Yeast sugar transporters. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, p. 259-308, 1993.

BLÁZQUEZ, G.; CAMACHO, F.; CALERO, M.; ALARCÓN, F.-J. Interaction probabilities in a four components aqueous two-phase system: polymer + salt + water + protein. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.4451-4456, 2001.

BOLES, E.; HOLLENBERG, C.P. The molecular genetics of hexoses transport in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p. 85-111, 1997.

BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: Biochemical characteristics and attempted genetical analysis. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.15-23, 1987.

BRANDY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L.; MCHALE, A.P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of

Kluyveromyces marxianus during growth on lactose-containing media. **Enzyme Microbial Technology**, 17:696-699.

BREUNIG, K.D. Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. **Molecular & General Genetics**, v.216, p.422-427, 1988.

BREUNIG, K.D.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; BIANCHI, M.M.; BOURGAREL, D.; FALCONE, C.; FERRERO, I.; FRONTALI, L.; GOFFRINI, P.; KRIJGER, J.J.; MAZZONI, C.; MILKOWSKI, C.; STEENSMA, H.Y.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M.; ZEEMAN, A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.771-780, 2000.

BROOKS, E.; SHARP, K.A.; FISCHER, D. In: Walter, H.; Brooks, D.E.; Fischer D. editors. Partitioning in Aqueous Two-phase Systems. Theory, Methods, Uses and Application to Biotechnology. Orlando, Academic Press, p.11-84, 1985.

CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERREIRO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. **Food Research International**, v.28, p.37-41, 1995.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid Extraction of Biomolecules using Aqueous Two-phase Systems. In: Recovery Process for Biological Materials, John Wiley and Sons Ltd (Eds), New York, p. 273-301, 1993.

CARDINALI, G.; VOLLENBRIÖCH, V.; JEON, M.S.; DE GRAAE, A.A.; HOLLENBERG, C.P. Constitutive expression in *gal7* mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of the *Gal/Lac* regulon. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, p.1722-1730, 1997.

CARVALHO-SILVA, M. & SPENCER-MARTINS, I. Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.57, p.77-81, 1990.

CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. **Current Opinion in Genetics & Development**, 8:560-564, 1998.

CASTILHO-VALAVICIUS, B.A.; TAKITA, M.A.; THOMPSON, G.M.; PIESTUN, V.S. The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.44, p.301-309, 1992.

CASTILLO, F J. Lactose metabolism by yeast. *In*: Verachtert H. De Mot R, eds Yeast: Biotechnology and Biocatalysis, vol 5. New York: Marcel-Dekker, p. 297-320, 1990.

CASTILLO, F.J.; UGALDE, U.O. Pattern of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p. 386-393, 1993.

CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. Reversed micelles in biotechnological processes. **Biotechnology Advances**, v.6, p.151, 1988.

CHAVES, A. C. Produção e purificação de proteína recombinada de *Schistosoma mansoni* utilizando sistemas de duas fases aquosas. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2000.

CHAVES, A.C.; SILVEIRA, E.; BEZERRA, R.P.; MOREIRA, K.A.; LUCENA-SILVA, N.L.C.; ABATH, F.G.C.; PORTO, A.L.F.; CABRAL, J.M.S.; LIMA-FILHO, J.L. Influence of partition parameters on a recombinant antigen of *Schistosoma mansoni* expressed on *E. coli* using poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.645-648, 2002.

COOPER, T.G. Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *In*: Molecular Biology of yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression, ed. J.N Strathern, E.W. Jones & J.R. Broach Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, p. 399-461. 1982.

COURCHESNE, W.E.; MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 708-713, 1988.

DE BRUIJNE, A.W.; SCHUDDEMAT, J.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; VAN STEVENINCK, J. Regulation of sugar transport systems of *Kluyveromyces marxianus*: the

role of carbohydrates and their catabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.939, p.569-576, 1988.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemistry Engineering**, v.47, p.89-135, 1992.

DICKSON, R.C.; BARR, K. Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.154, p.1245-1251, 1983.

DICKSON, R.C.; DICKSON, L.R.; MARKIN, J.S. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.137, p.51-61, 1979.

DICKSON, R.C.; MARKIN, J.S. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.142, p.777-785, 1980.

DICKSON, R.C.; SHEETZ, R.M.; LACY, L.R. Genetic regulation: yeast mutants constitutive for β -galactosidase activity have an increased level of β -galactosidase messenger ribonucleic acid. **Molecular and Cellular Biology**, v.1, p. 1048-56, 1981.

DOMINQUES, L.; DANTAS, M.M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology and Bioengineering**, v.64, p.692-697, 1999.

DUVNJAK, Z.; HOULE, C. & MOK, K.L. Production of ethanol and biomass from various carbohydrates by *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v.9, p.342-346, 1987.

ENATTAH, N S; SAHI, T; SAVILAHTI, E; TERWILLIGER, J D; PELTONEN, L; JÄRVELÄ, I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nature Genetics**, v.30, p.233-237, 2002.

FARAHNAK, F.; SEKI, T.; RYU, D.Y.; OGRYDZIAK, D. Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.362-367, 1986.

FERRARI, M.D.; LOPERENA, L. & VARELA, H. Ethanol production from concentrated whey permeate using a fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v.16, p.205-210, 1994.

FLEER, R.; YEH, P.; AMMELLAL, N.; MAURY, I.; FOURNIER, A.; BACCHETTA, F.; BADUEL, P.; JUNG, G.; L'HÔTE, H.; BECQUART, J.; FUKUHARA, H.; MAYAUX, J.F. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. **Bio/Technology**, v.9, p.968-975, 1991.

FOLHA DE SÃO PAULO (São Paulo). Condição afeta 7 de 10 brasileiros, São Paulo, 2002. Disponível em: <http://www.unifesp.br/comunicacao/ass-imp/clippingg.htm>. Acesso: 15 jan 2002.

FURLAN, A.S.; SCHNEIDER, A.L.S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M.F.; JONAS, R. Formulation of a lactose-free, low cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v.22, p.589-593. 2000.

FURLAN, A.S.; CARVALHO-JONAS, M.F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G.B; JONAS, R. Application of the microtiter reader system for screening of β -D-galactosidase producing microorganisms. **Brazilian Archives in Biology and Technology**, v.38, p.1261-1268, 1995.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v.29, p.565-568, 1985.

GHALY, A.E.; BEN-HASSAN, R.M.; MANSOUR, M.H. & NASSAR, M.A. Modeling batch production of single cell protein from cheese whey. II. Lactose metabolism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.43, p.12-24, 1993.

GHALY, A.E.; SINGH, R.K. Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.22, p.181-203, 1989.

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

GROOTWASSING, J.W.D.; FLEMING, S.E. Non-specific β -fructofuranidase (inulinase) from *K. fragilis*, batch and continuous fermentation simple method and some industrial proprieties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.2, p. 45-53, 1980.

HAN, J.H.; LEE, C.H. Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems. **Colloid Surface B**, v.9, p.109-116, 1997.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.516-521, 1994.

HENSING, M.C.M.; ROUWEHORST, J.J.; HEIJEN, J.P.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.67, p.261-279, 1995.

HOLMES, A.R.; COLLING, A.; FARNDEN, K.J.F.; SHEPERD, M.G. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.1423-1430, 1989.

HIERHOLZER, G.; HOLZER, H. Repression der synthese Von DPN-abhanginer Glutamin-Säure Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* durch ammonium ionen. **Biochemische Zeitschrift**, v.339, p. 175-185, 1963.

INCHAURRONDO, V.A.; FLORES, M.V.; VOGET, C.E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.291-298, 1998.

JEONG, Y.S.; VIETH, W.R. Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in an immobilized yeast membrane bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.587-590, 1991.

JOHANSSON, G.; RECZEY, K. Concentration and purification of b-glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.161-172, 1998.

KENNEDY, F.; CABRAL, J.M.S. Recovery Process for Biological Materials, John Wiley, New York, 1993.

KEPKA, C.; RHODIN, J.; LEMMENS, R.; TJERNELD, F.; GUSTAVSSON, P.-E. Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography A**, v.1024, p.95-104, 2004.

KIM, S.H.; YOO, Y.J. Characteristics of an aqueous two-phase system for α -amilase production. **Journal of Fermenting Bioengineering**, v.71, p.373-375, 1991.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The yeasts: a taxonomic study. 3rd edition, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1984.

KRUCKEBERG, A.L.; WALSH, M.C.; VAN DAM, K. How do yeast cells sense glucose? **BioEssays**, v.20, p. 972-976, 1998.

KUBOI, R.; UMAKOSHI, H.; KOMASAWA, I. Extractive cultivation of *Escherichia coli* using poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase systems to produce intracellular β -galactosidase. **Biotechnology Progress**, v.11, p.202-207, 1995.

KULA, M.R.; KRONER, K.H.; HUSTED, T.H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*, v.24, p.73-118, 1982.

KUZHANDAIVELU, N.; JONES, W.K.; MARTIN, A.K.; DICKSON, R.C. The signal for glucose repression of the lactose-galactose regulon is amplified through subtle modulation of transcription of the *Kluyveromyces lactis* *KI-GAL4* activator gene. **Molecular and Cellular Biology**, v.12, p.1924-1931, 1992.

LALOUX, O.; CASSART, J.P.; DELCOUR, J.; VAN BEEUMEN, J.; VANDENHAUTE, J. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. **FEBS Letters**, v.289, p.64-68, 1991.

LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.63-68, 2002.

LLORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the *Hemiascomycetous* yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Letters**, v.487, p.71-75, 2000.

MAGASANIK, B. & KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v.290, p.1-18, 2002.

MAGAZANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. *In*: Jones; Pringle; Broach (eds). The molecular and cell biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p.283-317, 1992.

MAIORELLA, B.L.; CASTILLO, F.J. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. **Process Biochemistry**, v.19, p.157-161, 1984.

MARTINS, D B G; SOUZA JR, C G; SIMÕES, D A; MORAIS JR, M A. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentration of galactose. **Current Microbiology**, v.44, p.379-382, 2002.

MARTINS, D.B.G. Indução da atividade da β -galactosidase na levedura *Kluyveromyces marxianus* em diferentes condições de cultivo. Dissertação de mestrado em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 2000.

MATIASSON, B.; LING, T.G.I. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. Biochemistry and Biotechnology, Venal, N.S. and Hudson, M.J. (Eds), p.270-292, 1987.

MCPHERSON, A. Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, 1999.

MEERS, J.L.; TEMPEST, D.W. & BROWN, C.M. Glutamine(amide): 2-oxoglutarate transferase oxido reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.64, p.187-194, 1970.

MEIJER, M.M.C.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A.J.; VERRIPS, T. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 273, p. 24102-24107, 1998.

MIFFLIN, B.J.; LEA, P.J.; WALLSGROVE, R.M. The role of glutamine in ammonium assimilation and reassimilation in plants. *In*: Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation, p. 213-234. Academic Press, NY, 1980.

MILLER, S.M.; MAGAZANIK, B. Role of the complex upstream region of the GDH2 gene in nitrogen regulation of the NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.11, p.6229-6247, 1991.

MORESI, M.; PATETE, M.; TRUNFIO, A. Scaling-up a batch whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.495-501, 1989.

NASMYTH, K.; SHORE, D. Transcriptional regulation in the yeast life cycle. **Science**, v.237,p.1162-1170, 1987.

NEHLIN, J.O.; CARLBERG, M.; RONNE, H. Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. **The EMBO Journal**, v.10, p.3373-3377, 1991.

OLIVEIRA, L A; SARUBBO, L A; PORTO, A L F, CAMPOS-TAKAKI, G M; TAMBOURGI, E.B. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. **Process Biochemistry**, v.38, p.693-699, 2002.

OLIVER, S.G. From DNA sequence to biological function. **Nature**, v.379, p.597-600, 1996.

OSTERGAARD, S. Metabolic Engineering of the galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. Thesis, Technical University of Denmark, Denmark, 2000.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63, p.554-569, 1999.

PAN, I.-H.; LEE, Y.-K. Rapid process of purification of an extracellular β -xylosidase by aqueous two phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v.754, p.179-184, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. & SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p. 69-80, 2000.

PEREZ-ORTIN, J.E.; MATAALLANA, E.; FRANCO, L. Chromatin structure of yeast genes. **Yeast**, v.5, p.219-283, 1989.

PHAFF, H.J. Isolation of yeast from natural source. In: Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. Labeda (ed), US Mc-Graw-Hill Inc., p.53-59, 1990.

RAMÍREZ, I.B.-R.; MEBRAHTU, S.; JERGIL, B. Affinity partitioning for membrane purification exploiting the biotin–NeutrAvidin interaction: Model study of mixed liposomes and membranes. **Journal of Chromatography A**, v.971, p.117-127, 2002.

- RAYNAL A, GERBAUD C, FRANCINGUES M.C., GUERINEAU M. Sequence and transcription of the β -glucosidase gene of *Kluyveromyces fragilis* cloned in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v.12, p.175-84, 1987.
- RECH, R.; CASSINI, C.F.; SECCHI, A.; AYUB, M.A.Z. Utilization of cheese whey for β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial and Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.91-96, 1999.
- RIBEIRO, S. C. A. D. Extração de DNA plasmídico por sistemas de duas fases aquosas. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, IST, Lisboa, 2000.
- RILEY, M.I.; DICKSON, R.C. Genetic and biochemical characterization of the galactose gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.158, p.705-712, 1984.
- ROHM, H.; ELISKASES-LECHNER, F.; BRÄUNER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.370-376, 1992.
- ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v.8, p.423-488, 1992.
- ROMERO, M.; GUZMÁN-LEÓN, S.; ARANDA, C.; GONZÁLEZ-HALPHEN, D.; VALENZUELA, L.; GONZÁLEZ, A. Pathways for glutamate biosynthesis in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Microbiology**, v.146, p.239-245, 2000.
- ROOSTITA, R.; FLEET, G.H. Growth of yeasts in milk and associated changes in milk composition. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.205-219, 1996b.
- ROOSTITA, R.; FLEET, G.H. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.393-404, 1996a.
- ROSSOLINI, G.M.; RICCIO, M.L.; GALLO, E.; GALLEOTI, C.L. *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombinant. **Gene**, v.119, p.75-81, 1992.

ROUWENHORST, R.J. Production and localization of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces* yeasts. PhD Thesis, Delft University of Technology, Netherlands, 1990.

ROUWENHORST, R.J.; PRONK, J.T.; VAV DIJKEN, J.P. The discovery of beta-galactosidase. **Trends in Biochemical Sciences**, v.14, p.416-8, 1989.

ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; VAN DER BAAN, A.A.; SCHEFFERS, W.A.; VAV DIJKEN, J.P. Production, distribution, and kinetics properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1131-1137, 1988.

RUBIO-TEXEIRA, M.; AREVALO-RODRIGUEZ, M.; LEQUERICA, J.L.; POLAINA, J. Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. **Journal of Biotechnology**, v.84, p. 97-106, 2001.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.558-567, 1998.

SCHWAN, R.F.; COOPER, R.M.; WHEALS, A.E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.234-244, 1997.

SCHWARTZ, V.; GOLBERG, L.; KOMROWER, G.M.; HOLZEL, A. Some disturbances of erythrocyte metabolism in galactosemia. **Biochemical Journal**, v.62, p.34-40, 1956.

SHAIKH, S.A.; KHINE, J.M.; KHAN, M.I. Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.239-245, 1997.

SHEETZ, R.M.; DICKSON, R.C. *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, v.98, p.729-745, 1981.

SHEETZ, R.M.; DICKSON, R.C. Mutations affecting synthesis of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, v.95, p.877-890, 1980.

SIEKSTELE, R.; BARTKEVICIUTE, D.; SASNAUSKAS, K. Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1). **Yeast**, v.15, p.311-322, 1999.

SONOWAT, H.M.; AGRAWAL, A.; DUTTA, S.M. Production of b-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Folia Microbiologica**, 26:370-376, 1981.

SPENCER, J.F.M.; SPENCER, D.M.. Yeasts in natural and artificial habitat. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1997.

SREEKRISHNA, K.; DICKSON, R.C. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, v.82, p. 7909-13, 1985.

STRASSER, A.W.M.; SELK, R.; DOHMEN, R.J.; NIERMANN, T.; BIELEFELD, M.; SEEBOTH, P.; TU, G.; HOLLENBERG, C.P. Analysis of the α -amilase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and secretion of its gene product in transformants of different genera. **European Journal of Biochemistry**, v.184, p.699-706, 1989.

STRED'ANSKÝ, M.; TOMÁŠKA, M.; TOMAŠKOVÁ, A.; ŠTURDÍK, E. Lactose hydrolysis in an aqueous two-phase system by whole-cell β -galactosidase of *Kluyveromyces marxianus*: partition and separation characteristics. **Journal of Chromatography A**, v.668, p.179-183, 1994.

SUNTORNUSUK, W. Yeast cultivation in lettuce brine. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.815-818, 2000.

SUZZI, G.; LOMBARDI, A.; LANORTE, M.T.; CARUSO, M.; ANDRIGHETTO, C.; GARDINI, F. Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.117-123, 2000.

TEMPEST, D.W.; MEERS, J.L.; BROWN, C.M. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogene* by a hitherto unknown route. **Biochemistry Journal**, v.117, p.405-407, 1970.

TER SCHURE, E.G.; SILLJÉ, H.H.W.; RAEVEN, L.J.R.M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A.J.; VERRIPS, C.T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.141, p.1101-1108, 1996.

TOMÁŠKA, M.; STREDÁNSKÝ, M.; GEMEINER, P.; ŠTURDÍK, E. Improvement of the thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v.30, p.649-652, 1995.

ÜLGER, C.; SAĞLAM, N. Partitioning of industrial cellulose in aqueous two-phase systems from *Trichoderma viride* QM9414. **Process Biochemistry**, v.36, p.1075-1080, 2001.

VALENZUELA, L.; GUZMÁN-LEÓN, S.; CORIA, R.; RAMÍREZ, J.; ARANDA, C.; GONZÁLEZ, A.. A NAD-glutamate dehydrogenase mutant of the petit-negative yeast *Kluyveromyces lactis* uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis. **Microbiologia**, v.141, p.2443-2447, 1995.

VAN DEN BROEK, P.J.A.; SCHUDDEMAT, J.; VAN LEEUWEN, C.C.M.; VAN STEVENINCK, J. Characterization of 2-deoxyglucose and 6-deoxyglucose transport in *Kluyveromyces marxianus*: Evidence for two different transport mechanisms. **Bichimica et Biophysica Acta**, v.860, p.626-631, 1986.

VAN DER BERG, J.A.; VAN DER LAKEN, K.J.; RENNIERS, T.C.H.M.; RIETVELD, K.; SCHAAP, A.; BRAKE, A.J.; BISHOP, R.J.; SCHULTZ, K.; MEYER, D.; RICHMAN, M.; SCHUSTER, J.L. *Kluyveromyces* as host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. **Biotechnology**, v.8, p.135-139, 1990.

VAN DER WALT, J.P.; JOHANNSEN, E. *Kluyveromyces van der Walt* emend. Van der Walt. In: Kreger-van Rij, N.J.W. ed. The Yeasts: A taxonomic study, 3th ed, p.224-251, 1984.

VAN DIJKEN, J.P.; WEUSTHUIS, R.A.; PRONK, J.T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.343-352, 1993.

VAN URK, H.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeast. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.123-127, 1989.

VESA, T.H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, p.165s-175s, 2000.

WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V.T. Animal Feed. **Science Technology**, v.67, p. 253-258, 1997.

WALKER, G.M. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd. England, 1998.

WALSH, M.C.; SCHOLTE, M.; VALKIER, J.; SMITS, H.P.; VAN DAM, K. Glucose sensing and signalling properties in *Saccharomyces cerevisiae* require the presence of at least two members of the glucose transporter family. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.2593-2597, 1996.

WALTER, H. In: Catsimpoolas, N. (Ed.), Methods of cell separation, Plenum Press, New York, v.1, p.307-354, 1977.

WALTER, H.; Brooks, D.E.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology. London: Academic Press, 1985.

WIAME, J.-M.; GRENSON, M.; ARSTJR, H.N. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. In: Rose, A.H.; Tempest, D.W. **Advances in Microbial Physiology**, Academic Press, v.26, p.1-87, 1985.

WU, Y.-T.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase partitioning. **Journal of Chromatography A**, v.929, p.23-29, 2001.

ZASLAVSKY, B.Y. Aqueous two-phase partitioning – Physical Chemistry and Bioanalytical Applications, Mercel Dekker, Inc. New York, 1995.

ZEEMAN, A.-M.; LUTTIK, M.A.H.; PRONK, J.T.; VAN DIJKEN, J.P.; STEENSMA, H.Y. Impaired growth on glucose of a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Kluyveromyces lactis* is due to a limitation in mitochondrial acetyl-Coenzyme A uptake. **FEMS Microbiology Letters**, v.177, p.23-28, 1999.

CAPÍTULO II- MANUSCRITO A

PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* CULTIVADAS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA

BIOTECHNOLOGY LETTERS

Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* cultivadas em diferentes fontes de carbono

Danyelly Bruneska Gondim Martins¹, Nora Inês Perotti², Faustino Siñeriz², José Luiz de Lima Filho^{1,3}, Willian McDonald Ledingham⁴, Marcos Antonio de Moraes Júnior^{1, 5,*}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brazil, ² Planta Piloto de Procesos Microbiologicos Industriales - Universidad de Tucumán – San Miguel de Tucumán, Argentina; ³ Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brazil; ⁴Department of Biochemistry and Microbiology – University of Saint Andrews – Fife, KY16 9AL – UK
⁵ Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brazil

*Autor para correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, Av Moraes Rego s/n, CEP: 50670-901– Cidade Universitária – Recife – PE – Brazil. Fax: +55 81 32718485.

e-mail address: moraism@lika.ufpe.br

Palavra-chave: levedura, *Kluyveromyces*, β -galactosidase, lactose, galactose.

Resumo

A produção de β -galactosidase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 foi analisada utilizando diferentes fontes de carbono. A atividade específica da β -galactosidase foi 1,95 e 1,7 vezes maior em meio contendo apenas galactose (1375,40U/A_{600nm}) quando comparada a atividade da enzima em meio glicose/galactose (827,69U/A_{600nm}) ou glicose/lactose (703,18U/A_{600nm}), respectivamente. O mesmo comportamento pôde ser constatado para formação de biomassa, com redução de 3,4 vezes para concentração celular em meio de glicose/galactose e 2,4 vezes maiores para glicose/lactose.

Introdução

A *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura da mesma família da *Saccharomyces*, mas que difere desta, pode assimilar e fermentar lactose como fonte de carbono (Kreger-van Rij, 1984). Esta levedura é considerada GRAS (“Generally Regarded As Safe”) pelo FDA (“Food and Drug Administration”), o que significa que pode ser utilizada para produção de bioprodutos para consumo animal e humano, tais como biomassa e enzimas (Bailey & Ollis, 1986; Van der Berg et al., 1990).

A β -galactosidase (lactase, E.C. 3.2.1.23) é uma enzima intracelular que catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose, permitindo desta forma o crescimento da maioria das espécies de *Kluyveromyces* em substratos que contenham lactose (Sheetz & Dickson, 1980; Sheetz & Dickson, 1981). Esta enzima tem aplicação na indústria

alimentícia e farmacêutica, onde é utilizada para obtenção de produtos com baixo teor de lactose e na fabricação de medicamentos destinados a pessoas que tem intolerância a lactose (Gekas & Lopez-Leiva, 1985; Vesa et al., 2000). A utilização de linhagens de *K. marxianus* na produção desta enzima tem sido analisada mediante várias condições de cultivo, principalmente utilizando diferentes fontes de carbono. As células de *K. marxianus* têm a capacidade de crescer em uma variedade de substratos muito maior quando comparada a *S. cerevisiae*, e desta forma ser empregada em sua forma selvagem para produção de biomassa e proteína em diferentes meios de cultivo (Rouwenhorst et al., 1988; Hensing et al., 1994). A produção da enzima β -galactosidase pela *Kluyveromyces* tem sido descrita por diversos autores, sob diferentes condições de cultivo; inclusive utilizando diversos resíduos industriais (Fiedurek & Szczodrak, 1994; Nor et al., 1994; Inchaurredo et al., 1994; Rech et al., 1999; Furlan et al., 2000; Martins et al., 2002). Entretanto, pouca atenção tem sido dado aos cultivos contendo fontes de carbono mistas, aspecto muito comum em resíduos industriais. Neste artigo, a produção de biomassa e de β -galactosidase pela *K. marxianus* CBS6556 foi avaliada, utilizando substrato carbonado misto em cultivo em batelada.

Materiais e Métodos

Linhagem e meio de manutenção: a linhagem CBS6556 de *Kluyveromyces marxianus*, obtida do *Centraalbureau voor Schimmelcultures* – Holanda, foi utilizada para produção de

biomassa e β -galactosidase. A linhagem foi mantida em meio rico YPL [peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e D-lactose 2% (p/v)] a 4°C.

Condições de cultivo: o meio de cultivo foi composto (em p/v) de: 0,5 g/l de peptona; 1,5 g/l de extrato de levedura; 2,0 g/l de sulfato de amônia. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 e a D-Lactose, D-Glicose e D-Galactose foram utilizadas como fonte de carbono, simples ou mistas, para uma concentração final de 10 g/l (p/v), na qual para os substratos mistos foi utilizada 5 g/l (p/v) de cada açúcar. O cultivo em batelada foi realizado em fermentador LH Fermentation 502D (LH Engineering Co. Ltd, Stoke Poges, UK) a 30°C e 400 rpm de agitação controlada, para 1 litro de meio de cultivo. Células de *K. marxianus* foram coletadas, a partir do meio YPL sólido, com auxílio de uma alça e transferidas para um Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultivo. Os frascos foram incubados por 16 h a 30°C e sob agitação constante de 200 rpm. Após este período, o conteúdo do frasco foi transferido para o bioreator contendo 950ml do mesmo meio de cultivo; a partir do qual foi acompanhado o crescimento da CBS6556 a 28°C e 400rpm de agitação constante, sem controle de pH ou oxigênio dissolvido.

Determinação da biomassa: o crescimento celular foi acompanhado por espectrofotometria a 600 nm, e os valores convertidos em biomassa seca (g/l) por utilizando uma equação gerada a partir de uma correlação linear prévia.

Determinação da atividade enzimática: a atividade enzimática foi realizada como descrita por Ausubel et al. (1989). A atividade da enzima β -galactosidase foi correlacionada com a densidade óptica a 600nm das células homogeneizadas em tampão Z.

Resultados e Discussão

Produção de Biomassa

A linhagem CBS6556 de *K. marxianus* foi cultivada em batelada nos meios complexos contendo galactose, glicose/galactose e glicose/lactose. Na Tabela 1 pode-se observar que as velocidades específicas de crescimento foram similares nos meios utilizados. Entretanto, a produção de biomassa foi maior em meio contendo apenas galactose como fonte de carbono, com valores 3,4 e 2,4 vezes maior que os observados para glicose/galactose e glicose/lactose, respectivamente. Quando células de leveduras são pré-cultivas em determinadas condições e, são subitamente expostas a diferentes condições de incubação pode ocorrer um aumento da fase *lag* do crescimento celular (Pirt, 1975). O período de incubação de 16 horas da CBS6556 em meio misto pode ter resultado na mudança do metabolismo de assimilação de açúcar para permitir o consumo da segunda fonte de carbono disponível. No cultivo em meio contendo glicose/galactose, a glicose foi inicialmente consumida durante a fase exponencial e, apenas no início da fase estacionária a galactose passou a ser metabolizada, verificado pela indução da atividade enzimática nesta mesma fase. Desta forma, a exposição das células ao mesmo meio de cultivo resultou em aumento da fase *lag*, permitindo a adaptação celular à presença de glicose, e reduzindo a biomassa formada. Este fato foi anteriormente descrito para células de *K. lactis* cultivadas em diferentes fontes de carbono. Células pré-cultivadas em glicose quando expostas a galactose apresentaram $K_m = 10\text{mM}$ para o sistema de transporte deste açúcar, enquanto

que as células pré-crescidas em galactose apresentaram menor constante de afinidade para transporte da galactose $K_m = 1,2$ (Boze et al., 1987).

Produção de β -galactosidase

A produção de β -galactosidase foi maior quando a galactose foi utilizada como fonte de carbono, chegando a 1375U/A_{600nm}, que representa um aumento máximo de 3,4 vezes do valor inicial de atividade após 8 horas de cultivo (Tabela 1). Para os meios de cultivo contendo glicose, o aumento máximo da atividade foi de 1,2 vezes para glicose/lactose e 1,5 vezes para glicose/galactose, em um tempo de incubação de mais de 10 horas. Em todos os casos, a atividade da enzima diminuiu nas primeiras horas de cultivo (Figuras 1 a 3), como observado anteriormente por Martins et al. (2002) para atividade da β -galactosidase em células cultivadas em frasco aerado contendo meio definido com galactose. Esta resposta de diminuição na atividade enzimática devido às altas concentrações do açúcar indutor já foi descrita para a *Kluyveromyces* (Castillo, 1990; Martins et al., 2002).

A variação da atividade enzimática no meio contendo galactose (Figura 1) obedeceu ao mesmo padrão descrito anteriormente para cultivo da linhagem CBS6556 de *K. marxianus* em frasco, na qual a atividade β -galactosidase mostrou-se flutuante ao longo do tempo de cultivo, como descrito por alguns autores para outras linhagens de *K. marxianus* e *C. pseudotropicalis* quando cultivadas em lactose (Pedriqué & Castillo, 1982; Barberis & Segovia, 1997; Rech et al., 1999; Martins et al., 2002). O mecanismo que leva a atividade

desta enzima se apresentar de forma contínua ou flutuante ainda não foi completamente elucidado, e pode estar relacionado com a regulação das enzimas das diferentes vias metabólicas, como a glicólise e a via de *Leloir*.

Por outro lado, a redução da atividade inicial da β -galactosidase observada nos meios de cultivo contendo duas fontes de carbono está relacionada tanto a alta concentração de açúcar no meio, quanto ao tipo de açúcar inicialmente metabolizado pela levedura. Neste caso, o consumo inicial de glicose resulta na redução gradativa da atividade enzimática, como demonstrado por Martins et al. (2002), sendo retomada com o início da metabolização dos açúcares indutores da produção da enzima (Figuras 2 e 3). A variação na concentração de oxigênio dissolvido no meio parece não influenciar na produção enzimática. Isto ficou evidenciado pelos resultados obtidos nos cultivos contendo o açúcar indutor mais glicose (Figuras 2 e 3). Nos cultivos em glicose/galactose, um aumento na atividade enzimática em 10 horas de incubação foi observado mesmo quando a concentração de oxigênio dissolvido foi baixa (Figura 2). Já para os cultivos em glicose/lactose, o aumento na concentração de oxigênio dissolvido promovido pelo aumento da aeração não foi acompanhado pelo aumento na atividade enzimática durante as primeiras seis horas de incubação (Figura 3). Desta forma, a concentração de oxigênio dissolvido (COD) no meio parece não influenciar na produção da β -galactosidase pela linhagem CBS6556 de *K. marxianus*, assim como observado em cultivos de *K. fragilis* NRRL-Y1109 (sin. *K. marxianus*) em lactose por Barberis & Segovia (1997). Em tais estudos o controle da concentração de oxigênio dissolvido em 30% não resultou em variação na atividade β -galactosidase em relação aos cultivos sem controle de COD

(Barberis & Segovia, 1997). Entretanto, estes resultados vão de encontro aos descritos para células de *K. marxianus* cultivadas em batelada utilizando melaço e xarope de milho como substratos, na qual o aumento no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio resultou no aumento de 50% da atividade da enzima (Schneider et al., 2001).

Alguns trabalhos não têm considerado o possível efeito da COD para a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces* (Grubb & Mawson, 1993; Fiedurek & Szczodrak, 1994; Fiedurek et al., 1996). Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que este parâmetro não deve realmente ser importante para a produção de β -galactosidase por células de *K. marxianus* CBS6556.

Conclusão

Em células de *Kluyveromyces marxianus* CBS6556, a produção de biomassa parece ser afetada pela presença de glicose no meio de cultivo. Da mesma forma, a produção da β -galactosidase teve a sua atividade reduzida na presença deste açúcar, mesmo na presença da galactose ou lactose. Nos cultivos em batelada, não há a necessidade de controle da concentração de oxigênio dissolvido, pelo fato que este parâmetro não exerceu nenhuma influência na produção da β -galactosidase por células da linhagem CBS6556 de *K. marxianus*.

Agradecimentos

À CAPES (Brasil), CNPq, FACEPE, UFPE e Pesquisa & Tecnologia Ltd.

Referências

- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.F.; Moore, D.D.; Smith, J.A. Current Protocols in molecular biology, vol 2. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1989.
- Bailey, J.E.; Ollis, D.F. Biochemical engineering fundamentals. 2nd edition, McGraw-Hill Book Company. Singapore, 1986.
- Barberis, SE.; Segovia, R.F. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture. *Biotechnol. Tech.* **11**:797-799, 1997.
- Boze, H.; Moulin, G.; Galzy, P. Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: Biochemical characteristics and attempted genetical analysis. *J. Gen. Microbiol.*, **133**:15-23, 1987.
- Castillo, F.J. Lactose metabolism by yeast. *In*: Verachtert H. De Mot R, eds Yeast: *Biotechnology and Biocatalysis*, vol 5. New York : Marcel-Dekker, pp. 297-320, 1990.
- Fiedurek, J.; Gromada, A.; Jamroz, J. Effect of medium components and metabolic inhibitors on β -galactosidase production and secretion by *Penicillium notatum* 1. *J. Basic. Microbial.* **1**:27-32, 1996.

- Fiedurek, J.; Szczodrak, J. Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Acta Microbiol Pol.* **43**:57-65, 1994.
- Furlan, A.S.; Schneider, A.L.S.; Merkle, R.; Carvalho-Jonas, M.F.; Jonas, R. Formulation of a lactose-free, low cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **22**:589-593, 2000.
- Gekas, V.; Lopez-Leiva, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* **29**:565-568, 1985.
- Grubb, C.F.; Mawson, A.J. Effects of elevated solute concentration on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnol. Lett.* **15**:621-626, 1993.
- Hensing, M.; Vrouwenvelder, H.; Hellinga, C.; Baartmans, R.; Van Dijken, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**:516-521, 1994.
- Kreger-van Rij, N.J.W. The yeasts: a taxonomic study. 3rd edition, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1984
- Martins, D.B.G.; Souza Jr, C.G.; Simões, D.A.; Morais Jr, M.A. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentration of galactose. *Curr. Microbiol.* **44**:379-382, 2002.
- Nor, Z.M.; Tamer, M.I.; Mehrab, M.; Scharer, J.M.; Moo-Young, M.; Jervis, E.J. Improvement of intracellular β -galactosidase production in fed-batch cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.*, **23**:845-849, 2001.

- Pedrique M, Castillo F (1982) Regulation of β -galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:303-310.
- Pirt, S.J. Principles of microbes and cell cultivation. *Blackwell Scientific Publications*. London, UK, 1975.
- Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAS (1999) Utilization of cheese whey for β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **23**:91-96.
- Rouwenhorst, R.J.; Visser, L.E.; Van Der Baan, A.A.; Scheffers, W.A.; Vav Dijken, J.P. Production, distribution, and kinetics properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**:1131-1137, 1988.
- Schneider, A.L.S.; Merkle, R.; Carvalho-Jonas, M.F.; Jonas, R.; Furlan, S. Oxygen transfer on β -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. *Biotechnol. Lett.* **23**:547-550, 2001.
- Sheetz, R.M.; Dickson, R.C. *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genet.* **98**:729-745, 1981.
- Sheetz, R.M.; Dickson, R.C. Mutations affecting synthesis of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Genet.* **95**:887-890, 1980.
- Van der Berg, J.A.; Van der Laken, K.J.; Renniers, T.C.H.M.; Rietveld, K.; Schaap, A.; Brake, A.J.; Bishop, R.J.; Schultz, K.; Meyer, D.; Richman, M.; Schuster, J.L. *Kluyveromyces* as host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnol.* **8**:135-139, 1990.

Vesa, T.H; Marteau, P.; Korpela, R Lactose intolerance. *J Am Col Nut.* **19**:165s-175s, 2000.

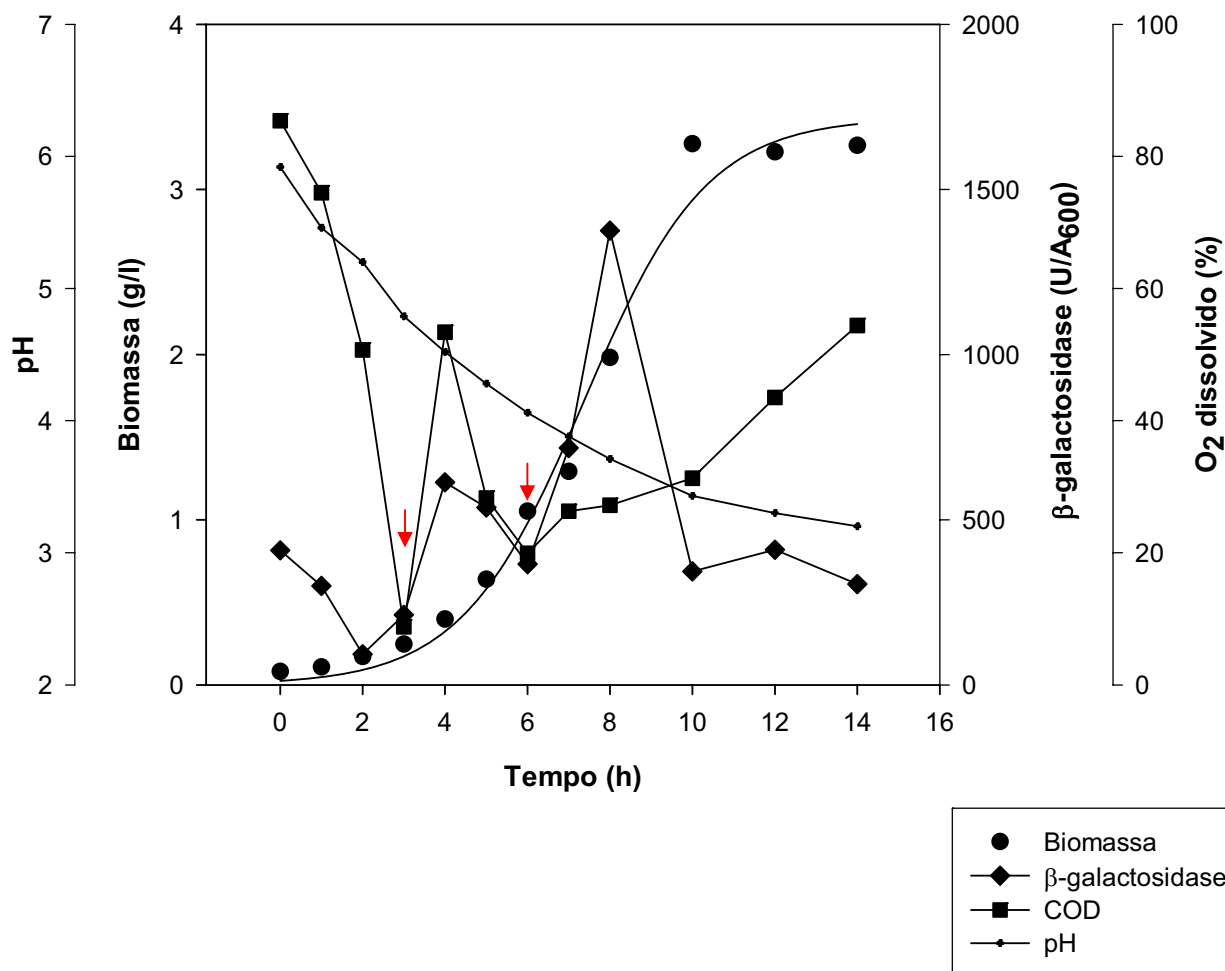


Figura 1. Perfil de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 em meio contendo galactose a 28°C e 400rpm. Biomassa [g/l (●)]; atividade β-galactosidase [U/A₆₀₀ (◆)]; oxigênio dissolvido [% (■)] e pH (·). As setas indicam o aumento na aeração.

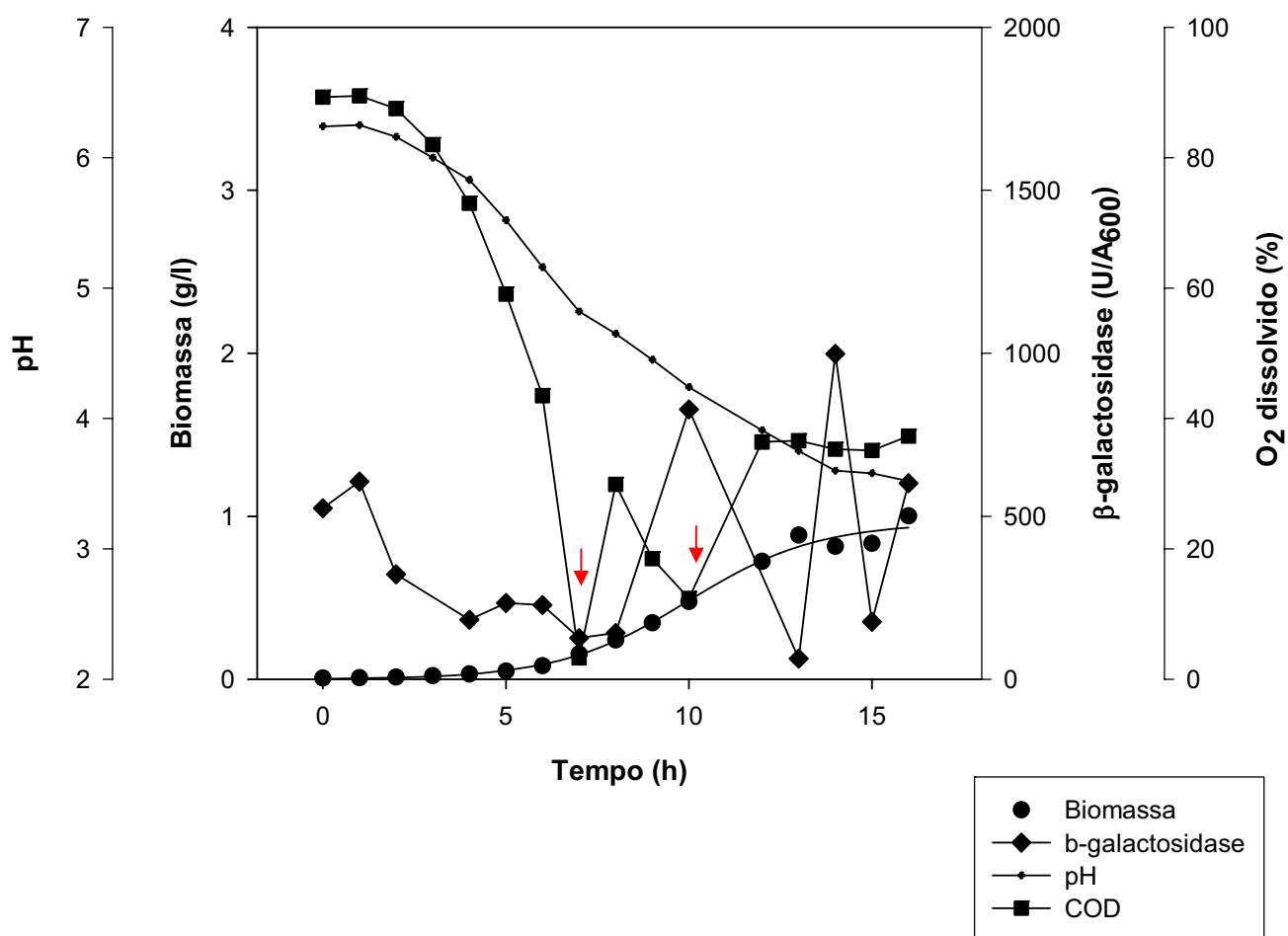


Figura 2. Perfil de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 em meio contendo glicose/galactose a 28°C e 400rpm. Biomassa [g/l (●)]; atividade β -galactosidase [U/A₆₀₀ (◆)]; oxigênio dissolvido [% (■)] e pH (·). As setas indicam o aumento na aeração.

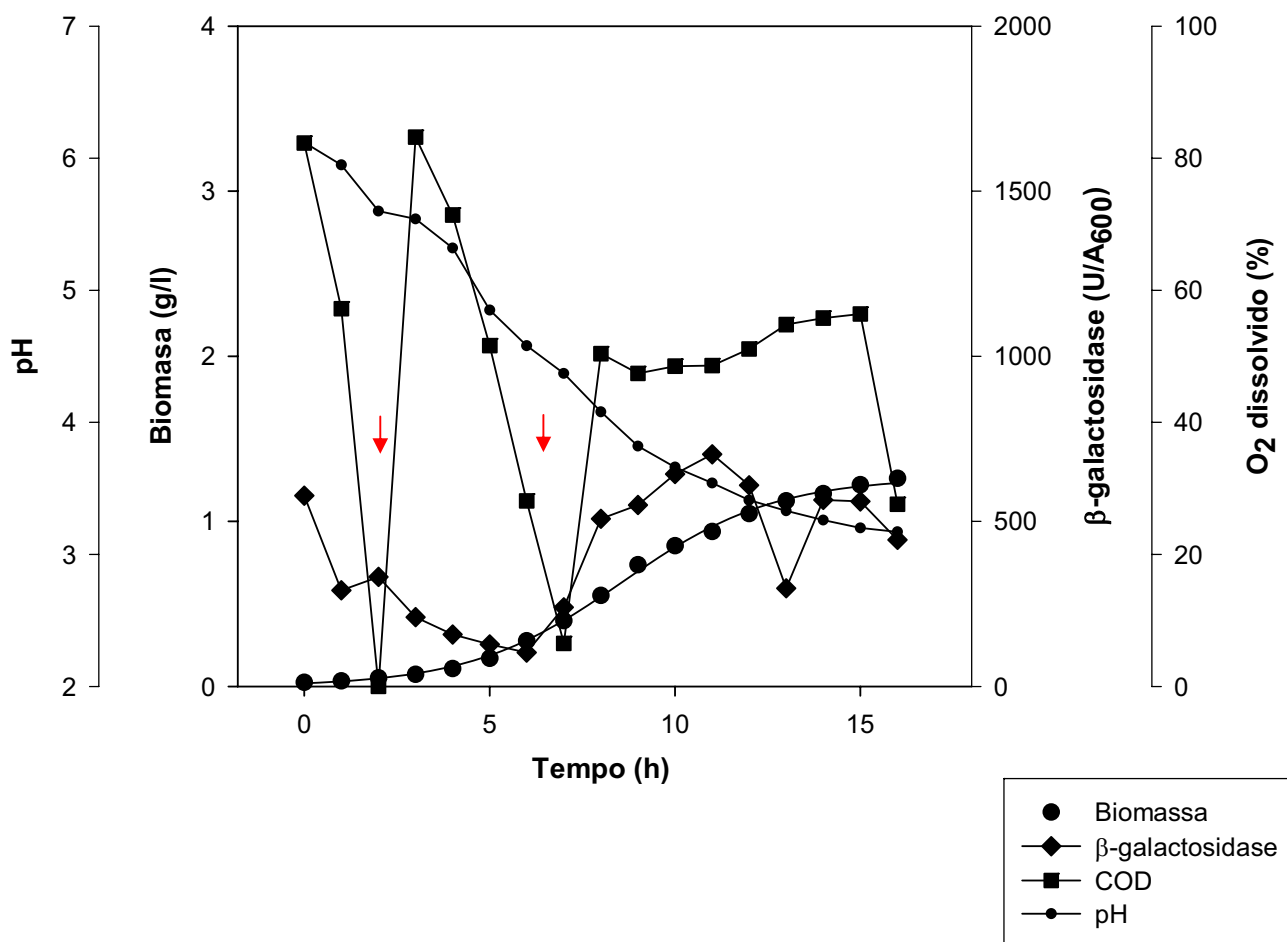


Figura 3. Perfil de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 em meio contendo glicose/lactose a 28°C e 400rpm. Biomassa [g/l (●)]; atividade β-galactosidase [U/A₆₀₀ (◆)]; oxigênio dissolvido [% (■)] e pH (·). As setas indicam o aumento na aeração.

Tabela 1. Parâmetros de crescimento e atividade enzimática da linhagem CBS6556 de *Kluyveromyces marxianus* cultivada em meio contendo diferentes fontes de carbono em bioreator de bancada 28°C e 400rpm.

Fonte de carbono	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$X_{\text{máx}}$ (g/l)	β -gal (U/A ₆₀₀) (h) ^a
Galactose	0,45	2,72	1375,40 (8)
Glicose/galactose	0,44	0,80	827,69 (10)
Glicose/lactose	0,42	1,10	703,18 (11)

^a tempo de cultivo no qual foi observada a maior atividade enzimática.

CAPÍTULO III- MANUSCRITO B

EFEITO DA TEMPERATURA E DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE
 β -GALACTOSIDASE POR *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA
BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

**Efeito da temperatura e da fonte de nitrogênio na produção de β -galactosidase por
*Kluyveromyces marxianus***

Martins, D.B.G.^{1,2}; Lima Filho, J.L.^{1,5}; Moraes Júnior, M.A.^{1,3,*}.

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE; 2. Doutoranda em Ciências Biológicas/UFPE; 3. Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. 4. Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco

Autor para correspondência: * Av. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Recife – PE - Brasil. CEP: 50732-901. Telefone: 55 81 32718486 Fax: 55 81 32718485. e-mail: bruneska@lika.ufpe.br

Palavra-chave: lactose, enzima, β -galactosidase, *Kluyveromyces marxianus*, glutamato, amônia, uréia, temperatura.

RESUMO

Os efeitos da fonte de nitrogênio e da temperatura de cultivo sobre a taxa de crescimento e a produção de β -galactosidase pela linhagem CBS6556 de *Kluyveromyces marxianus* foram avaliadas. Esta linhagem apresentou maior velocidade específica de crescimento a 30°C em meio definido contendo lactose e suplementado com fosfato de amônia dibásico ($\mu = 0,40 \text{ h}^{-1}$) glutamato ($\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$) ou uréia ($\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$). Os cultivos a 34°C apresentaram velocidades específicas de crescimento semelhantes, em torno de $\mu = 0,30 \text{ h}^{-1}$ para todas as fontes testadas. Nesta temperatura, foram obtidos os maiores valores de atividade da enzima β -galactosidase, destacando-se nos cultivos em fosfato de amônia dibásico (4517,19 U/mg prot) e uréia (2890,52 U/mg prot) após 12 horas de cultivo em meio mineral contendo lactose 1%.

INTRODUÇÃO

β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma enzima de interesse industrial muito utilizada no processamento de leite e derivados para a redução da concentração de lactose, principalmente dos produtos destinados à pessoas com intolerância à lactose (1). Também é utilizada na redução da concentração de lactose em doce de leite, prevenindo sua cristalização, uma vez que a lactose apresenta baixa solubilidade (11% p/v a 4°C em água), e aumentando a doçura do produto, já que a lactose é duas vezes menos doce que a glicose (1-3).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* tem sido considerada uma boa fonte produtora de β -galactosidase. Esta enzima tem sido utilizada em preparos comerciais e em processos biotecnológicos, a partir de diferentes formas de cultivo da *K. marxianus* (4). Cultivos em batelada, batelada alimentada e cultivos contínuos vem sendo otimizados a partir do ajuste de diversos parâmetros como substratos (fontes de carbono e nitrogênio), oxigênio, temperatura e pH para permitir maior produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces*, e desta forma maior rendimento e menor custo de produção (5-9).

Diversos compostos nitrogenados podem ser utilizados pelas leveduras. Estes compostos atuam na regulação de processos celulares como meiose, esporulação, crescimento morfológico, velocidade de crescimento e glicólise (10-13), bem como podem aumentar ou reduzir a concentração de determinados produtos como biomassa, etanol, glicerol e outros metabólitos e enzimas de interesse (14). Entretanto, nem todas as fontes de nitrogênio propiciam um bom crescimento celular (15). A *K. marxianus* apresenta a capacidade de utilizar uma variedade de compostos nitrogenados como fonte de nitrogênio (16). Adicionalmente, esta levedura apresenta a capacidade de crescer em altas temperaturas, até 40°C, em meio contendo sacarose. Isto representa uma vantagem industrial, uma vez que reduz os riscos de contaminação do cultivo por outros microrganismos, além de reduzir os custos de resfriamento do bioreator (17, 18).

Neste trabalho, a produção de biomassa e da enzima β -galactosidase pela linhagem CBS6556 de *K. marxianus* foi avaliada, sob diferentes temperaturas de crescimento, em meio mineral suplementado com lactose e contendo quatro tipos de fonte de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem e meio de manutenção: a linhagem CBS6556 de *K. marxianus* foi obtida do *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Holanda; e foi mantida em estoques congelados a -80°C em meio YPL [2% (p/v) peptona, 1% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) lactose] contendo glicerol 50% (19) na concentração de 10^6 cels/ml.

Meio de cultivo: As células foram cultivadas em meio mineral (1,0 g/l de KH_2PO_4 ; 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/l de NaCl; 0,1 g/l de CaCl_2) suplementado com 1 ml/l de solução de aminoácidos (1,0 mg/l de L-histidina; 2,0 mg/l de L-metionina; 2,0 mg/l de L-triptofano), 1 ml/l de solução de vitaminas (2,0 µg/l de biotina; 400,0 µg/l de pantotenato de cálcio; 2,0 µg/l de ácido fólico; 2000,0 µg/l de inositol; 400,0 µg/l de niacina; 200,0 µg/l de ácido p-aminobenzóico; 400,0 µg/l de piridoxina-HCl; 200,0 µg/l de riboflavina; 400,0 µg/l de tiamina-HCl) e 1 ml/l da solução de elementos traço (500,0 µg/l de H_3BO_3 ; 40,0 µg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 100,0 µg/l de KI; 200,0 µg/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 400,0 µg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 200,0 µg/l de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 400,0 µg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Lactose foi utilizada como fonte de carbono na concentração final de 10 g/l. Glutamato, fosfato de amônia dibásico, sulfato de amônia e uréia foram utilizados como fonte de nitrogênio na concentração final de 5g/l. Todos os meios foram ajustados para pH 6 com HCl ou NaOH.

Condições de cultivo: Frascos de Erlenmeyer contendo 10 ml de meio mineral foram inoculados com 1 ml da suspensão de células congeladas e incubados sob agitação orbital a 180 rpm. Após 12 horas de cultivo, o volume do frasco foi transferido para um novo frasco contendo 40ml do mesmo meio de cultivo e incubado sob as condições anteriormente

mencionadas durante 8 horas. O volume deste novo cultivo foi transferido para um terceiro frasco contendo 600 ml do mesmo meio para determinação do crescimento celular, por espectrofotometria a 600nm, e produção de β -galactosidase nas mesmas condições de cultivo. O volume da cultura não excedeu 1/5 do volume total em cada frasco. Todos os cultivos foram realizados em diferentes temperaturas entre 26° C e 42° C.

Preparação do extrato celular: as células coletadas foram centrifugadas a 5000 x g por 15 minutos e lavadas em água destilada. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 5 ml de tampão Z (40mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 60mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10mM de KCl, 50mM de 2-mercaptoetanol), e uma quantidade de pérolas de vidro (465-600 nm) equivalente a 1 ml foi adicionada à suspensão celular. As células foram lisadas a partir de 8 ciclos de 45 segundos alternados entre agitação vigorosa e resfriamento em gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 x g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo para determinação da atividade enzimática e da concentração de proteína no extrato. Todas as etapas foram realizadas a 4°C.

Atividade enzimática: a atividade da enzima β -galactosidase foi determinada como descrita por Miller (20). Uma unidade de atividade de β -galactosidase é definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de ONPG por minuto a 30°C e pH 7.0. A concentração de ONP formada foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A determinação da concentração de proteína no extrato celular foi realizada como descrita por Bradford (21). Os resultados foram expressos em unidades de enzima por miligrama de proteína no extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da fonte de nitrogênio e da temperatura na velocidade específica de crescimento

O efeito da amônia como fonte de nitrogênio sobre a velocidade específica de crescimento da *K. marxianus* nas formas de sais de sulfato (sulfato de amônia) e fosfato (fosfato de amônia dibásico) foi avaliado. Também foram testadas duas fontes de nitrogênio orgânicas nas formas de uréia e glutamato. O efeito das diferentes fontes de nitrogênio foi associado com o cultivo em diferentes temperaturas de crescimento. Os resultados da Fig. 1 demonstram que os maiores valores de velocidade específica de crescimento foram observados na temperatura de 30°C, exceto para os cultivos em sulfato de amônia. As culturas em fosfato de amônia apresentaram a maior velocidade de crescimento ($\mu = 0,41 \text{ h}^{-1}$), um pouco acima das culturas em glutamato ($\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$). Por outro lado, as culturas em sulfato de amônia apresentaram a menor velocidade de crescimento ($\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$). O aumento da temperatura de cultivo promoveu uma redução significativa na velocidade de crescimento nas diferentes fontes de nitrogênio, exceto para os cultivos em uréia que mantiveram valores de velocidade de crescimento acima de $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$, mesmo em temperaturas até 42°C.

Fiedurek & Szczodrak (5) descreveram que o fosfato de amônia monobásico (0,2%) e a uréia foram as melhores fontes de nitrogênio para formação de biomassa por *K. fragilis* (sin. *K. marxianus*) linhagem 1 a 34°C em meio complexo contendo lactose, apresentando o dobro da concentração celular após 72 horas quando comparado com os cultivos em fosfato de amônia dibásico ou sulfato de amônia. A uréia é considerada uma fonte de nitrogênio

não-preferencial para células de *S. cerevisiae* pelo fato de proporcionar menor velocidade de crescimento em relação ao glutamato e a amônia (22). Entretanto, levando em consideração os resultados de Fiedurek & Szczodrak (54) e aqueles apresentados na Fig. 1, pode-se sugerir que a uréia é uma fonte preferencial de amônia para células de *K. marxianus* e pode ser utilizada como fonte de nitrogênio suplementar para geração de biomassa por esta levedura em substratos industriais. Esta hipótese é fundamentada pelo aumento observado na produção de biomassa de diferentes linhagens de *K. marxianus* a partir da suplementação de soro de queijo com uréia (23). Este aumento não foi observado quando sulfato de amônia foi adicionado ao soro de queijo (23, 24).

Efeito da fonte de nitrogênio e da temperatura na produção de β -galactosidase

A produção de enzimas também pode ser afetada pelo tipo de fonte de nitrogênio no meio de cultivo (5, 25, 26). Neste aspecto, a influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de β -galactosidase por *K. marxianus* foi avaliada sob diferentes temperaturas de cultivo. As culturas em sulfato de amônia a 30°C apresentaram o mesmo perfil de produção enzimática observado anteriormente por Martins et al. (27). Entretanto, as maiores atividades enzimáticas foram observadas nos cultivos a 34°C para as outras fontes de nitrogênio testadas (Fig. 2), as quais propiciaram velocidades de crescimento muito semelhantes nesta temperatura (Fig. 1). A produção da enzima nos cultivos em sulfato de amônia a 34°C foi muito baixa em relação às outras fontes de nitrogênio, enquanto que as culturas em glutamato apresentaram altas atividades enzimáticas apenas em 24 h de incubação (Fig. 2). Por outro lado, os cultivos em fosfato de amônia dibásico apresentaram

a maior produção da enzima, com atividade específica de 4517 U/mg prot em 12 horas de cultivo (Fig. 2). Os cultivos em uréia também apresentaram bons resultados de atividade enzimática (2890,52 U/mg prot), embora tenha apresentado 64% da atividade observada em fosfato de amônia dibásico (Fig. 2). Estes resultados diferem daqueles descritos por Fiedurek & Szczodrak (5), nos quais a atividade β -galactosidase de *K. fragilis* em uréia foi sete vezes maior do que aquela obtida nos cultivos em fosfato de amônia dibásico. Esta diferença nos resultados pode estar relacionada principalmente às diferenças nas condições de cultivo utilizadas, nas quais meio de cultivo complexo foi utilizado por aqueles autores, além das diferenças fisiológicas das linhagens utilizadas. Para o fungo filamentoso *Penicillium notatum*, a atividade desta enzima mostrou-se alta em meio contendo fosfato de amônia dibásico, enquanto nenhuma atividade foi detectada em uréia (25). Outras enzimas também apresentam sua atividade aumentada ou reduzida de acordo com o tipo de fonte de nitrogênio utilizado no cultivo. Este é o caso das enzimas aldose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida tenuis*, responsáveis pelo metabolismo da xilose, que apresentaram os menores valores de atividade em uréia quando comparada a diversas fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (26). Para fosfatase ácida extracelular de *P. notatum*, não foi possível detectar atividade enzimática no meio de cultivo contendo uréia como fonte de nitrogênio (25).

Tanto para *K. lactis* como para *K. fragilis* a maior produção da enzima foi observada em cultivos contendo fosfato de amônia monobásico (5, 28). Estes resultados demonstram que a fonte de nitrogênio utilizada na preparação do meio de cultivo, obviamente em associação com uma fonte de carbono indutora como lactose ou galactose (Martins et al.,

2002), representa um importante fator na produção da enzima β -galactosidase pela levedura *K. marxianus*.

A produção de β -galactosidase pela linhagem CBS6556 de *K. marxianus* a 34°C foi maior em fosfato de amônia dibásico do que em uréia, mesmo com as células apresentando velocidades máximas de crescimento semelhantes nestas duas fontes de nitrogênio. Desta forma, a maior produção desta enzima pela CBS6556 pôde ser alcançada em 12 horas de cultivo em meio mineral contendo lactose 1% e fosfato de amônia dibásico 0,5%.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela CAPES (Brasil), CNPq, FACEPE, Universidade Federal de Pernambuco e Pesquisa & Tecnologia Ltd.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vesa TH, Marteau P, Korpela R (2000) Lactose intolerance. *J. Am. Coll Nutr.*, v.19, p.165s-175s.
2. Gekas, V.; Lopez-Leiva, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.*, v.29, p.565-568, 1985.
3. Schneider, A.L.S.; Merkle, R.; Carvalho-Jonas, M.F.; Jonas, R.; Furlan, S. Oxygen transfer on β -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. *Biotechnol. Lett.* 23:547-550, 2001.

4. Bailey, J.E.; Ollis, D.F. Biochemical engineering fundamentals. 2nd edition, McGraw-Hill Book Company. Singapore, p.839-847, 1986.
5. Fiedurek, J.; Szczodrak, J.; Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Microbiol. Pol.*, v.43, p.57-65, 1994.
6. González-Siso, M.I. β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Process Biochem.*, 29:565-568, 1994.
7. Furlan, A.S.; Schneider, A.L.S.; Merkle, R.; Carvalho-Jonas, M.F.; Jonas, R. Formulation of a lactose-free, low cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, v.22, p.589-593, 2000.
8. Barba, D.; Beolchini, F.; Del Re, G.; Di Giacomo, G.; Veglió, F. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochem.*, 36:531-536, 2001.
9. Nor, Z.M.; Tamer, M.I.; Mehrab, M.; Scharer, J.M.; Moo-Young, M.; Jervis, E.J. Improvement of intracellular β -galactosidase production in fed-batch cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.*, 23:845-849, 2001.
10. Murray, L.E.; Rowley, N.; Dawes, I.W.; Johnston, G.C.; Singer, R.A. A yeast glutamine tRNA signals nitrogen status for regulation of dimorphic growth and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.95, p.8616-8624, 1998.
11. Jennings, D.H. The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press, UK, 1995.

12. Bely, M.; Sablayrolles, J.M.; Barre, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng*, v.70, p.246-252, 1990.
13. Wiame, J.-M.; Grenson, M.; Arstjr, H.N. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. In: Rose, A.H.; Tempest, D.W. *Adv. Microbial Physiol.*, Academic Press, v.26, p.1-87, 1985.
14. Albers, E.; Larsson, C.; Linder, G.; Niklasson, C.; Gustafsson, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl Environm Microbiol*, v.62, p. 3187-3195, 1996.
15. Ter Schure, E.G.; van Riel, N.A.W.; Verrips, C.T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Ver.* 24:67-83, 2000.
16. Kreger-Van Rij, N.J.W. The yeasts: a taxonomic study. 3rd edition, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1984.
17. Rouwenhorst, R.J.; Visser, L.E.; Van Der Baan, A.A.; Scheffers, W.A.; Van Dijken, J.P. Production, distribution, and kinetics properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.54, p.1131-1137, 1988.
18. Hensing, M.; Vrouwenvelder, H.; Hellinga, C.; Baartmans, R.; van Dijken, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.y*, v.42, p.516-521, 1994.

19. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning, a laboratory manual, vols. 1, 2 and 3, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989.
20. Miller, J.M. Experiments in molecular genetics, p.352. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
21. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quatification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.
22. Magasanik, B.; Kaiser, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, v.290, p.1-18, 2002.
23. Kar, T.; Misra, A.K. Effect of fortification of concentred whey on growth of *Kluyveromyces* sp. *Revista Argentina de Microbiologia*, 30:163-169, 1998.
24. Souza Jr, C.G.; Ledingham, W.M.; Morais Jr, M.A. Utilization of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, v.23, p.1413-1416, 2001.
25. Fiedurek, J.; Gromada, A.; Jamroz, J. Effect of the medium components and metabolic inhibitors on β -galactosidase production and secretion by *Penicillium notatum* 1. *J. Basic Microbiol.*, v.36, p.27-32, 1996.
26. Kern, M.; Nidetzky, B.; Kulbe, K.D.; Haltrich, D. Effect of nitrogen sources on the levels of aldose reductase and xilitol dehydrogenase activity in the xylose-fermenting yeast *Candida tenuis*. *J. Ferment. Bioeng.*, 85:196-202, 1998.
27. Martins, D.B.G.; Souza Jr, C.G.; Simões, D.A.; Morais Jr, M.A. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentration of galactose. *Curr. Microbiol.*, v.44, p.379-382, 2002.

28. Selim, M.H.; El-Diwany, A.J. Some factors influencing production of β -galactosidase.

Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 9:81-86, 1985.

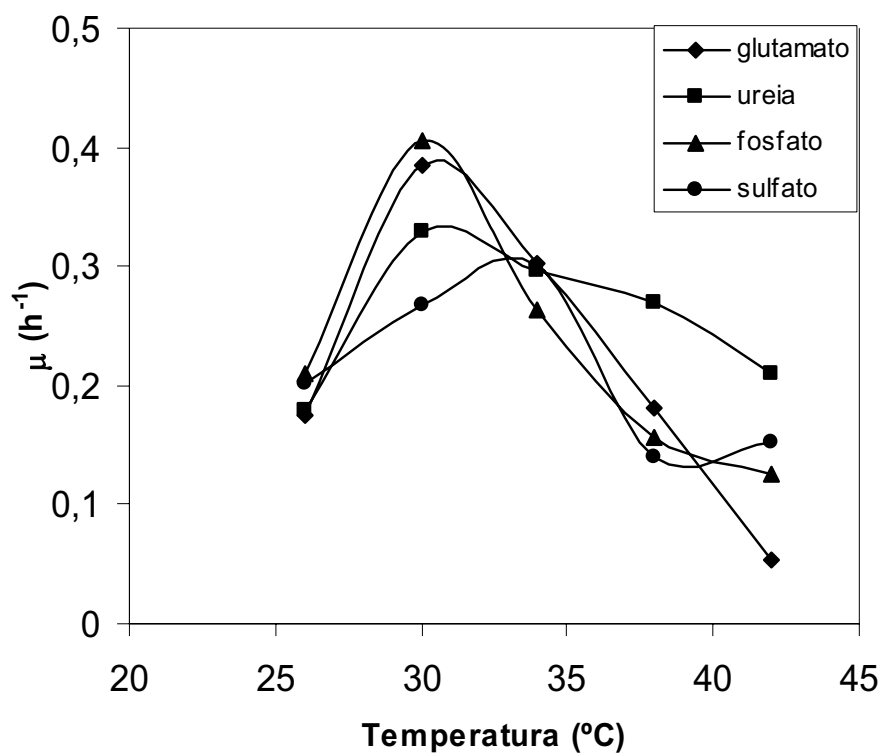


Figura 1. Variação da velocidade máxima de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 em meio de cultivo definido contendo lactose 1% e diferentes fontes de nitrogênio 0,5% (glutamato, uréia, sulfato de amônia e fosfato de amônia) em função da temperatura de incubação (26, 30, 34, 38 e 42°C).

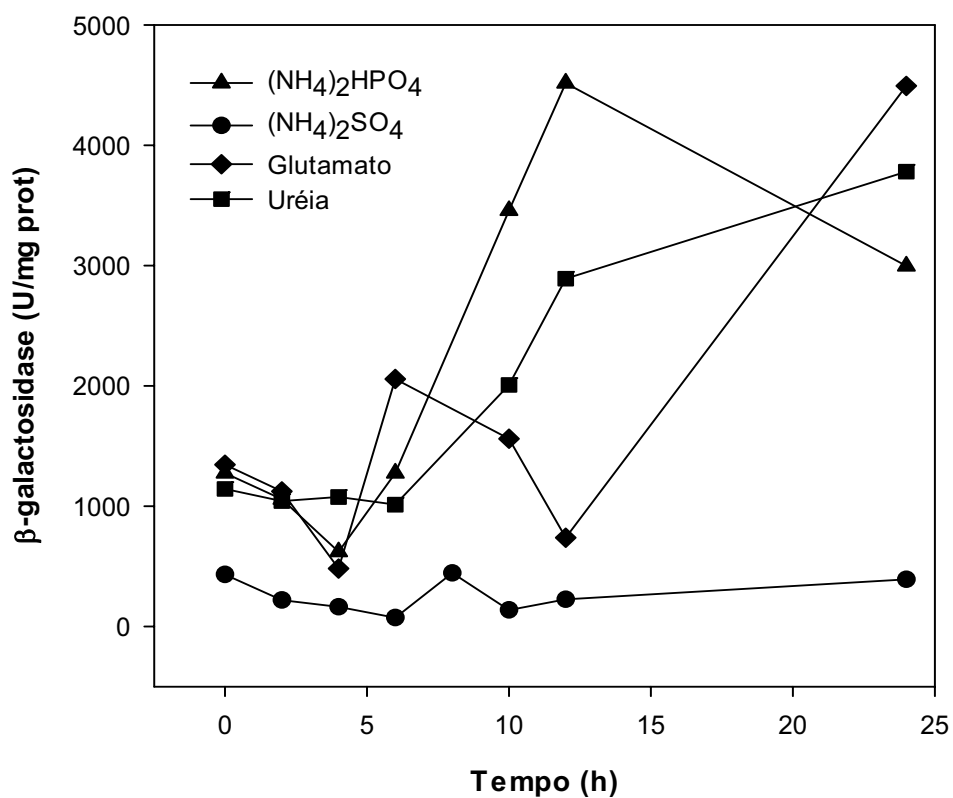


Figura 2. Atividade específica da β-galactosidase (U/mg prot) em extratos celulares de *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 cultivada em meio definido contendo lactose 1% e diferentes fontes de nitrogênio 0,5% sob temperatura de 34°C.

CAPÍTULO III- MANUSCRITO C

**PARTIÇÃO DA β -GALACTOSIDASE DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* EM SISTEMA BIFÁSICO
AQUOSO COMPOSTO POR POLIETILENO GLICOL/FOSFATO DE POTÁSSIO**

MANUSCRITO SUBMETIDO PARA A REVISTA
PROCESS BIOCHEMISTRY

**Partição de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em sistema bifásico aquoso
composto por polietileno glicol/fosfato de potássio**

Martins, D.B.G.^{1,*}; Bittencourt, K.F.M.¹; Moreira, K.A.¹; Moraes Júnior, M.A.^{1,2}; Porto,
A.L.F.^{1,3}; Lima Filho, J.L.^{1,4}.

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/Universidade Federal de Pernambuco; 2. Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco; 3. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco; 4. Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco.

* Autor para correspondência: Av. Prof. Moraes Rego, s/n CEP: 50732-901, Recife – Pernambuco – Brasil. Fone: 55 81 3271 8487 Fax: 55 81 3271 8485. e-mail: bruneska@uol.com.br

Palavra-chave: sistema bifásico aquoso, β -galactosidase, *Kluyveromyces marxianus*, partição

Resumo

O comportamento de partição da β -galactosidase, produzida pela *Kluyveromyces marxianus* cultivada em soro de queijo coalho, foi analisado em sistema bifásico aquoso (SBA) composto por polietileno glicol (PEG)/fosfato de potássio. Tanto o tamanho da cadeia do PEG quanto o comprimento da linha de amarração afetam a partição da β -galactosidase. O aumento da concentração do polímero (de 14% para 19,7%) demonstrou exercer grande influência na partição da enzima, resultando em inversão do coeficiente de partição (de $K=0,008$ para $K=2,88$) quando PEG 3350/fosfato foi utilizado para formar o SBA. A maior seletividade foi encontrada neste sistema (4,96); e a melhor recuperação da atividade enzimática nos foi obtida na fase superior do sistema PEG 8000/fosfato de potássio (76%). Estes resultados demonstram a potencialidade do sistema bifásico aquoso, preferencialmente o sistema composto por PEG 3350 para partição da enzima β -galactosidase, removendo as proteínas contaminantes em uma simples etapa após a extração da enzima.

Introdução

A β -galactosidase (lactase, E.C. 3.2.1.23) é uma hidrolase intracelular que converte lactose em glicose e galactose, e apresenta grande interesse econômico para aplicação industrial em alimentos e medicamentos [1-6]. A lactose é um dissacarídeo utilizado na produção de doces, confeitados, pães e molhos por fornecer boa textura e cor, além do

efeito ligante à água [7]. Entretanto, diversas pessoas são intolerantes a lactose devido a uma insuficiência metabólica na produção da β -galactosidase, uma enzima que se localiza no jejuno, porção inicial do intestino delgado, o que resulta na limitação quanto ao uso de leite e derivados na dieta alimentar [7,8]. A levedura *Kluyveromyces marxianus* é uma produtora em potencial da enzima β -galactosidase, e tem a capacidade de usar o soro de queijo, resíduo da indústria queijeira, como substrato para crescimento, uma vantagem econômica a nível industrial [3,9-11].

Por outro lado, o uso desta enzima em processos industriais requer algumas etapas de tratamento, e as mais críticas são a purificação e a recuperação [12]. De acordo com Diamond & Hsu, [13], 50 a 90% do custo de produção de bioprodutos é determinado pela estratégia de purificação. O sistema bifásico aquoso é um método seletivo para purificação de biomoléculas e para estudo analítico de componentes celulares como proteínas, ácidos nucléicos e enzimas [14]. É uma técnica bem estabelecida de bioseparação de enzimas e proteínas, baseado na formação de duas fases a partir da mistura de um polímero solúvel em água com uma solução de sais, ou de dois polímeros solúveis. O SBA oferece vantagens em processos de extração contínua e de purificação de enzimas a partir de uma mistura de componentes celulares [15,16]. Adicionalmente, o SBA apresenta baixa pressão osmótica, alta atividade da água, baixa tensão interfacial entre as duas fases e efeito estabilizante dos polímeros e sais sobre a enzima, bem como rápida transferência de massa com reduzido gasto de energia através de mistura mecânica, possibilidade de separação rápida a temperatura ambiente com alta seletividade e fácil escalonamento, o que o torna industrialmente atrativo e econômico [17].

As características de partição de uma molécula dependem das propriedades de superfície do material biológico a ser separado. Peso molecular, forma das moléculas e localização e quantidade dos sítios de ligação específica são alguns fatores que afetam o comportamento de partição, mas a carga da superfície da biomolécula é o fator mais importante que afeta a separação em SBA [15].

O sistema PEG/sal tem sido utilizado para separação de proteínas em larga escala normalmente devido ao tamanho dos componentes de suas fases. A grande diferença de densidade entre as fases, e a baixa viscosidade leva a um menor tempo de separação em sistemas PEG/sal quando comparado aos sistemas PEG/Dextrana [18]. O efeito do sal na partição é causado pela distribuição não-uniforme dos íons de sal na fase superior e inferior, e pela diferença da corrente elétrica gerada pelo desequilíbrio na distribuição dos sais. Após a fase de separação, a fase superior torna-se rica em PEG, e fase inferior, rica em sal [15]. O mecanismo que causa a distribuição das biomoléculas não foi completamente elucidado, e a utilização do SBA tem sido limitada devido à complexidade em prever o comportamento de partição da molécula [19].

Neste trabalho, a partição da enzima β -galactosidase produzida pela *K. marxianus* CBS6556 cultivada em soro de queijo coalho foi analisada em quatro diferentes sistemas PEG/fosfato de potássio.

Materiais e Métodos

Reagentes: Polietileno glicol (PEG) 550, 1000, 3350 e 8000, albumina sérica bovina (BSA), θ -nitrofenil- β -D-galactopiranoside (ONPG) e pérolas de vidro ($\varnothing$ 450-600 μ m) foram obtidas da SIGMA Chemical Company – St. Louis, MO, USA. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Linhagem e manutenção: *K. marxianus* CBS6556, obtida a partir do *Centraalbureau voon Schimmelcultures*, Baarn – Holanda, foi utilizada neste estudo. Esta linhagem foi mantida em meio rico [2% (m/v) peptona, 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) lactose e 2% (m/v) ágar] a 4°C.

Meio e condições de cultivo: como substrato para crescimento da CBS 6556 e produção da enzima β -galactosidase foi utilizado o soro de queijo coalho. O mesmo foi previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos e filtrado sob condições assépticas para remoção das proteínas precipitadas. Uma alça de células foi coletada a partir de uma placa de cultura e inoculada em frasco de Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de soro de queijo, e a cultura foi incubada a 30°C e 200 rpm em sistema de agitação orbital. Após 12 h de cultivo, o volume do frasco foi transferido para um Erlenmeyer de 500 ml contendo 90 ml do mesmo meio, e incubado sob as mesmas condições por 20 h. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada e tratado para liberação da enzima.

Preparação do extrato celular: as células ressuspensas foram em 5 ml de tampão Z (40mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 60mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10mM KCl, 50mM 2-

mercaptoetanol), e uma quantidade de pérolas de vidro equivalente a 1 ml foi adicionada à suspensão celular. As células foram permeabilizadas através de lise mecânica em 8 ciclos de 45 segundos alternados entre agitação vigorosa e resfriamento em gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 x g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Todas as etapas foram realizadas a 4°C.

Determinação enzimática: a atividade da enzima β -galactosidase foi determinada como descrita por Miller, [20]. Uma unidade de atividade de β -galactosidase é definida como sendo a quantidade de enzima necessária que hidrolisa 1 μ mol de ONPG por minuto a 30°C e pH 7.0. A concentração de ONP formada foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade enzimática específica é definida como sendo a razão das unidades de enzima pela concentração de proteínas em miligramas.

Determinação protéica: a concentração de proteínas no extrato enzimático e nas fases de cada SBA foram determinadas de acordo com Bradford [21]. Uma curva de calibração construída com albumina sérica bovina foi utilizada como padrão para cálculo da concentração protéica.

Partição em sistema bifásico aquoso: o SBA foi preparado em temperatura ambiente (20°C $\pm$ 1) a partir de soluções estoque de PEG (550, 1000, 3350 e 8000) a 50% (m/m) em água e tampão fosfato de potássio a 40% (m/m) - pH 7,0, nas concentrações apresentadas na Tabela 1, como descrito em Sebastião et al, [22]. De acordo com a concentração de cada componente em cada uma das fases do sistema, diferentes linhas de amarração (“tie-line”) foram obtidas. Para formar o sistema, as soluções de PEG e sais foram misturadas para o peso final de 3 gramas utilizando tubos de centrifuga de 15 ml graduados. O pH do sistema

PEG/fosfato de potássio foi considerado como sendo próximo ao pH da solução estoque de sais. O volume de 500 μ l de extrato enzimático, correspondendo a 8% (m/m) do peso total, foi adicionado a cada sistema, e cada qual foi misturado por agitação vigorosa em vórtex durante 30 segundos. Ao tubo controle foi adicionado o mesmo volume de tampão Z, e agitado sob as mesmas condições. Todos os tubos foram centrifugados a 5000 x g por 5 minutos a 4°C, para separação das fases, e amostras foram coletadas de cada uma das fases, com auxílio de uma seringa, sem perturbar a interface do sistema. A concentração de proteínas e de β -galactosidase foi determinada em cada fase como descrito anteriormente.

Coefficiente de partição: é definido como sendo a taxa de concentração de uma molécula em particular na fase superior pela concentração da mesma na fase inferior [23], e foi calculado para β -galactosidase em cada linha de amarração de todos os sistemas PEG/fosfato de potássio, como descrito na equação 1.

$$K = \frac{As}{Ai} \quad (1)$$

O mesmo princípio foi utilizado para analisar o coeficiente de partição das proteínas contaminantes. Os valores obtidos através da equação 1 foram convertidos em valores logarítmicos para melhor visualização gráfica.

Seletividade: é definida como sendo a razão do coeficiente de partição da enzima β -galactosidase pelo coeficiente de partição das proteínas contaminantes (equação 2).

$$S = \frac{K_E}{K_P} \quad (2)$$

Recuperação (%): a recuperação da atividade enzimática foi calculada pela razão da atividade da enzima na fase em estudo pela atividade total da enzima adicionada ao sistema, como descrito na equação 3.

$$R(\%) = \frac{As}{Ai} \times 100 \quad (3)$$

Resultados e Discussão

Efeito da massa molar do PEG na partição

Normalmente, o coeficiente de partição diminui com o aumento do tamanho da cadeia do PEG, como observado para α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* em sistema PEG/dextrana, para β -galactosidase de *E.coli* e para pectinases em sistema PEG/fosfato de potássio [24-26].

Para β -galactosidase de *K. marxianus*, o comportamento de partição em função da massa molar do PEG foi analisada na Figura 1, onde é possível observar que, diferentemente do comportamento das proteínas contaminantes, o aumento do tamanho da

cadeia do PEG levou a um aumento no coeficiente de partição da enzima no sistema PEG/fosfato de potássio. Este comportamento também foi descrito para β -galactosidase de *E. coli* em sistema PEG/sal utilizando sulfato de amônia [25]. O comportamento de partição pode ser observado para as proteínas contaminantes nos sistemas analisados (Figura 2).

Os sais presentes nos sistemas bifásicos aquosos afetam o coeficiente de partição do material bioativo [15,19]. O comportamento de partição das enzimas pode ser afetado pelo tipo de sal utilizado no SBA, como observado para α -amilase de *B. amiloliquefaciens* [26,27]. Este fator também pode aumentar ou diminuir a atividade enzimática, como descrito por Chen & Wang [25] para β -galactosidase de *E. coli*. Entretanto, a estrutura e as propriedades da β -galactosidase também diferem de acordo com o microrganismo produtor [28], o que dificulta uma previsão do comportamento de partição da enzima em SBA. Este fato poderia explicar o padrão de partição incomum observado em nosso trabalho.

Influência do comprimento das tie lines

No sistema PEG/fosfato, ambos os componentes afetam o coeficiente de partição da enzima, e na maioria dos casos, o aumento do comprimento das linhas de amarração foi seguido pelo aumento do valor de K [17]. Este comportamento foi observado para β -galactosidase nos PEGs com diferentes massas molar, exceto para o PEG 8000, cujo coeficiente de partição diminuiu (Figura 1). O aumento do valor de K_E também foi observado para endo-poligalacturonase de *K. marxianus* e α -amilase de *B.*

amiloliquefaciens em sistema PEG/fosfato [26,29]. Chen & Wang [25] descreveram um leve ou inexistente efeito da concentração do polímero na atividade β -galactosidase de *E. coli* em PEG 4000/fosfato. Porém, este comportamento foi diferente do observado por Stred'anský, et al [28] para partição de β -galactosidase em sistema PEG/Dextrana, na qual o valor de K_E diminuiu com o aumento da concentração do polímero.

Na Figura 2, observa-se uma leve influência do aumento da concentração do polímero e do sal sobre o coeficiente de partição da proteína, com aumento em todos os sistemas testados.

Os melhores resultados foram obtidos na linha de amarração 3 do sistema PEG/fosfato de potássio, cuja partição da enzima direcionou-se para a fase superior (Figura 1), enquanto que as proteínas contaminantes migraram para a fase inferior (Figura 2). Neste sistema, uma inversão do coeficiente de partição da β -galactosidase, de 0,008 para 2,88, pode ser observado como consequência do aumento da concentração do polímero (de 14% para 19,7%) e da concentração de fosfato de potássio (de 11,8 % para 17,7%).

Seletividade dos sistemas bifásicos aquosos

Altos valores de seletividade indicam o potencial do sistema para extração seletiva de β -galactosidase em sistema bifásico aquoso [14]. A seletividade dos sistemas é demonstrada na Figura 3; onde podemos observar um aumento da seletividade com o aumento da concentração dos componentes dos sistema. Estes valores são mais

evidenciados no sistema PEG 3350/fosfato de potássio, na qual o aumento da concentração de polímero e sais resultou no aumento de 40 vezes no valor de seletividade (0,12 – 4,96).

Estes resultados são melhores do que aqueles descritos por Silva & Franco [14], cuja seletividade foi de $2,7 \times 10^{-5}$ utilizando PEG 4000/fosfato para extração seletiva de β -galactosidase.

Como a seletividade é uma função do coeficiente de partição, este comportamento poderia ser controlado pela adição de diferentes sais ao sistema, permitindo desta forma um alto grau de purificação e recuperação de biomoléculas em uma das fases do SBA [30-32].

Recuperação da atividade β -galactosidase

Este fator foi influenciado pela massa molar do polímero, resultando em aumento da recuperação da atividade da enzima na fase inferior da maioria dos sistemas testados, como resultado do aumento da cadeia molecular do PEG. A taxa de recuperação mais alta foi de 76% na fase inferior do sistema PEG 8000/fosfato de potássio. Entretanto, o aumento na concentração de polímeros e sais em SBA levou à redução da taxa de recuperação da enzima nos sistemas testados (Figura 4). Um comportamento semelhante foi descrito por Chen & Wang [25] para recuperação de β -galactosidase de *E. coli* em diferentes sistemas PEG/fosfato; cujo aumento da massa molecular do polímero foi acompanhado pelo aumento da taxa de recuperação. Estes autores descreveram a máxima atividade de β -galactosidase bacteriana na fase superior do sistema PEG 6000/fosfato

(78%), apesar de não detectarem grande variação na taxa de recuperação em relação ao aumento da concentração do polímero. Kohler et al [33] descreveu uma taxa de recuperação de 82% para β -galactosidase na fase superior de sistema PEG 4000/fosfato, e coeficiente de partição de $K=17$. Entretanto, a adição de um ligante bioespecífico, ρ -aminofenil-1-tio- β -D-galactopiranoside (APGP), a este sistema reduziu a taxa de recuperação de 39% para partição da β -galactosidase de *K. fragilis*, com concentração a enzima na fase inferior [14].

Conclusões

A potencialidade do sistema bifásico aquoso para partição de β -galactosidase de *K. marxianus* foi avaliada utilizando sistemas PEG/fosfato de potássio. O comportamento da enzima mostrou-se dependente do tamanho da cadeia do polímero, bem como da concentração dos componentes do sistema. O sistema PEG 3350/fosfato de potássio apresentou a maior seletividade e uma forte influência da concentração do polímero e do sal no coeficiente de partição da enzima, resultando em inversão dos valores de K_E . Este sistema pode ser utilizado para maiores estudos para concentração e purificação desta enzima em uma das fases através da mudança do tipo de sal que compõe o sistema ou mesmo pela adição de sais ao sistema, permitindo alteração do comportamento de partição da biomolécula.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela CAPES (Brasil), CNPq, FACEPE, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Pesquisa & Tecnologia Ltd.

Referências

- [1] Furlan SA, Schneider ALS, Merkle R, Carvalho-Jonas MF, Jonas R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using lactose-free medium. *Acta Biotechnol* 2001; 21:57-64.
- [2] Belem MAF, Lee BH. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochem* 1999; 34:501-509.
- [3] Belem MAF, Lee BH. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit Rev Food Sci* 1998; 38:565-598.
- [4] Rustom IYS, Foda MI, López-Leiva MH. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. *Food Chem* 1998; 62(2):141-147.
- [5] Castillo FJ. Lactose metabolism by yeast. In: Verachtert H. De Mot R, eds *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis*, vol 5. New York : Marcel-Dekker, 1990; 297-320.
- [6] Gekas V, Lopez-Leiva M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem* 1985; 29:565-568.

- [7] Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. J Am Col Nut 2000; 19:165s-175s.
- [8] Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. Nat Genet 2002; 30:233-237.
- [9] Martins DBG, Souza Jr CG, Simões DA, Morais Jr MA. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentration of galactose. Curr Microbiol 2002; 44:379-382.
- [10] Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAZ. Utilization of cheese whey for β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. J Ind Microbiol Biotechnol 1999; 23:91-96.
- [11] Maiorella BL, Castillo FJ. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. Process Biochem 1984;157-161.
- [12] Artolozaga MJ, Jonas R, Schneider AL, Furlan SA, Carvalho-Jonas MF. One step partial purification of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 using STREAMLINE-DEAE. Bioseparation, 1998; 7:137-1143.
- [13] Diamond AD, Hsu JT. Aqueous two-phase systems for biomolecules separation. Adv Biochem Eng Biotechnol, Berlin 1992; 47: 89-135.
- [14] Silva ME, Franco TT. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. Rev Microbiol 1999; 30:324-331.
- [15] Han JH, Lee CH. Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems. Colloid Surf B 1997; 9:109-116.

- [16] Wang W-H, Kuboi R, Komasa I. Aqueous two-phase extraction of dehydrogenases using triazine dyes in PEG/phosphate systems. *Chem Eng Sci* 1992; 47:113-121.
- [17] Albertsson P-A. Partition of cell particles and macromolecules, 3rd ed, Wiley, New York, 1986.
- [18] Zafarani-Moattar MT, Gasemi J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. *Experimental and Correlation. Fluid Phase Equilib* 2002; 198:281-291.
- [19] Oliveira LA, Sarubbo LA, Porto ALF, Campos-Takaki GM, Tambourgi EB. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. *Process Biochem* 2002; 38:693-699.
- [20] Miller JM. Experiments in molecular genetics, p.352. Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, New York, 1972.
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [22] Sebastião MJ, Cabral JMS, Aires-Barros MR. Improved purification protocol of a *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase by phase partitioning in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and phosphate. *Enzyme Microb Technol* 1996; 18:251-260.

-
- [23] Del-Val MI, Otero C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. *Enzyme Microb Technol* 2003; 33:118-126.
- [24] Lima AS, Alegre RM, Meirelles AJA. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydr Polym* 2002; 50:63-68.
- [25] Chen J-P, Wang C-H. Lactose hydrolysis by β -galactosidase in aqueous two-phase systems. *J Ferment Bioeng* 1991; 71:168-175.
- [26] Kim SH, Yoo YJ. Characteristics of an aqueous two-phase system for α -amylase production. *J Ferment Bioeng* 1991; 71:373-375.
- [27] Barkir JN, Hatton TA, Suter UW. Protein partition in two phase aqueous polymer systems. *Biotechnol Bioeng* 1989; 34(4):541-558.
- [28] Stred'anský M, Tomáška M, Tomasková A, Sturdik E. Lactose hydrolysis in an aqueous two-phase system by whole-cell β -galactosidase of *Kluyveromyces marxianus*: partition and separation characteristics. *J Chromatogr A* 1994; 668:179-183.
- [29] Wu Y-T, Pereira M, Venâncio A, Teixeira J. Separation of endo-polygalacturonase using aqueous two-phase partitioning. *J Chromatogr A* 2001; 929:23-29.
- [30] Kuboi K, Yano K, Komasaawa I. Evaluation of surface properties and partitioning of proteins in aqueous two-phase extraction systems. *Solv Extr Res Dev* 1994; 1:42-52.
- [31] Kuboi R, Umakoshi H, Komasaawa I. Extractive cultivation of *Escherichia coli* using poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase systems to produce intracellular β -galactosidase. *Biotechnol Prog* 1995; 11:202-207.
-

- [32] Tanaka H, Kuboi R, Komasawa I, Tuchido T. Control of autolysis of *Bacillus subtilis* for selective production of intracellular enzymes in aqueous two-phase systems. J Ferment Biotechnol 1993; 75:424-428.
- [33] Köhler K, Veide A, Enfors S-O. Partitioning of β -galactosidase fusion proteins in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems. Enzyme Microb Technol 1991; 13:204-209.

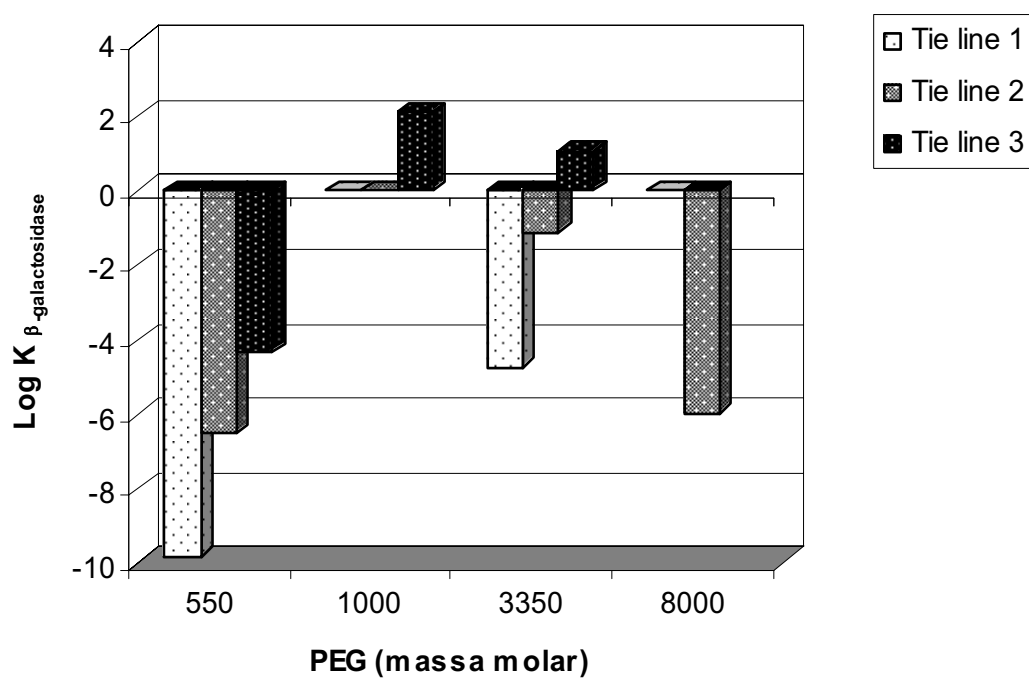


Figura 1. Efeito da massa molar do polímero e da “tie-line” sobre o coeficiente de partição da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* nos sistemas PEG/fosfato de potássio a 25°C.

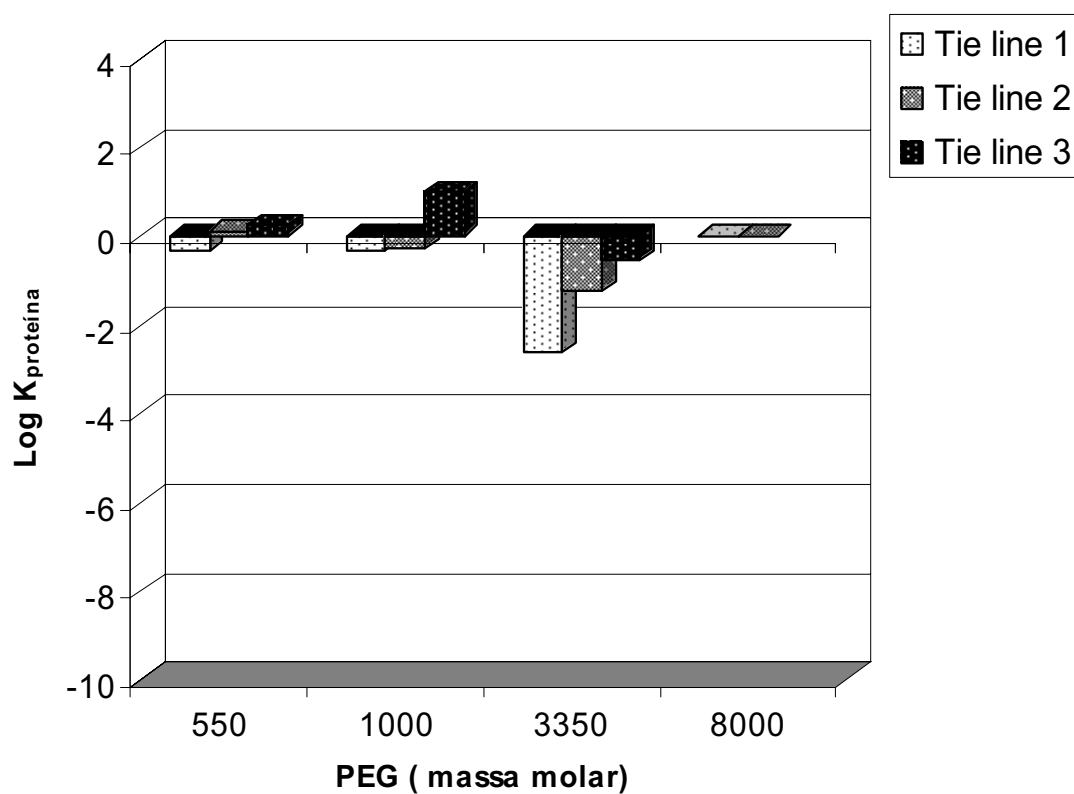


Figura 2. Efeito da massa molar do polímero e da “tie line” sobre o coeficiente de partição das proteínas contaminantes nos sistemas PEG/fosfato de potássio a 25°C.

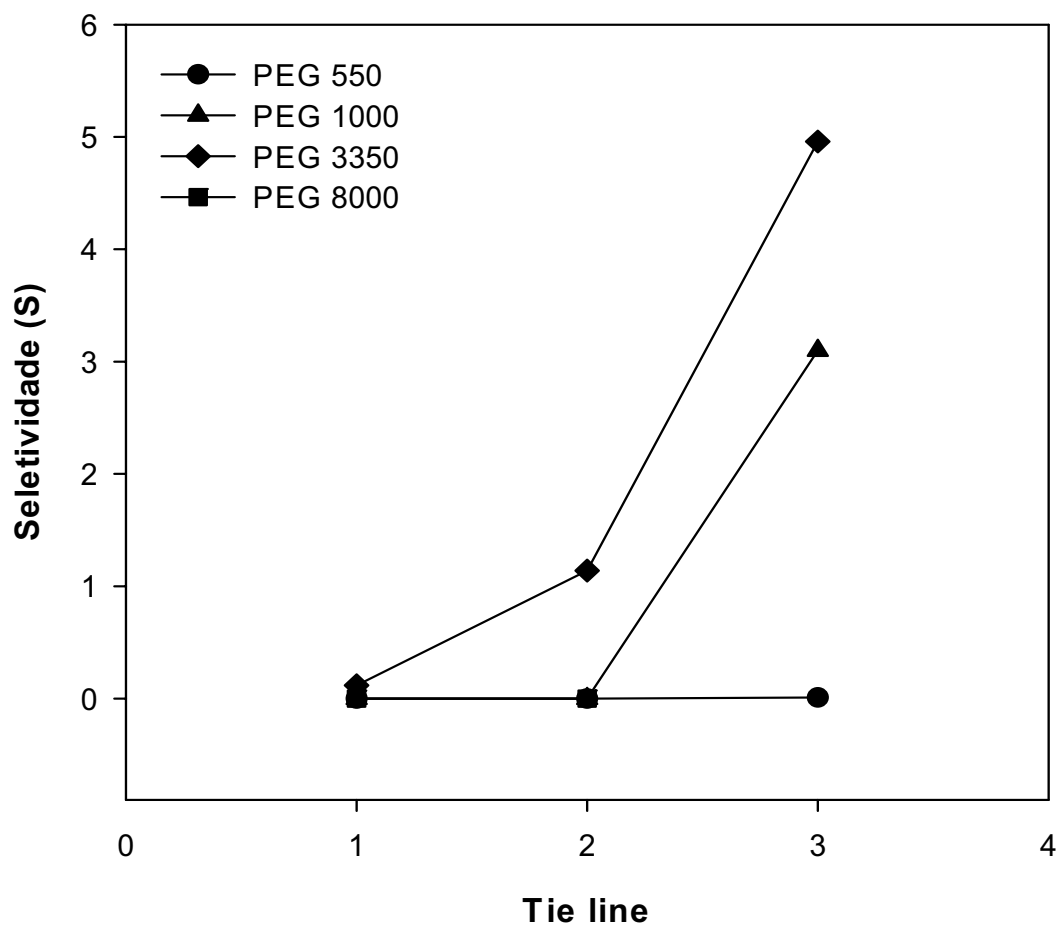


Figura 3. Seletividade dos sistemas PEG/fosfato de potássio para partição da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CBS6556.

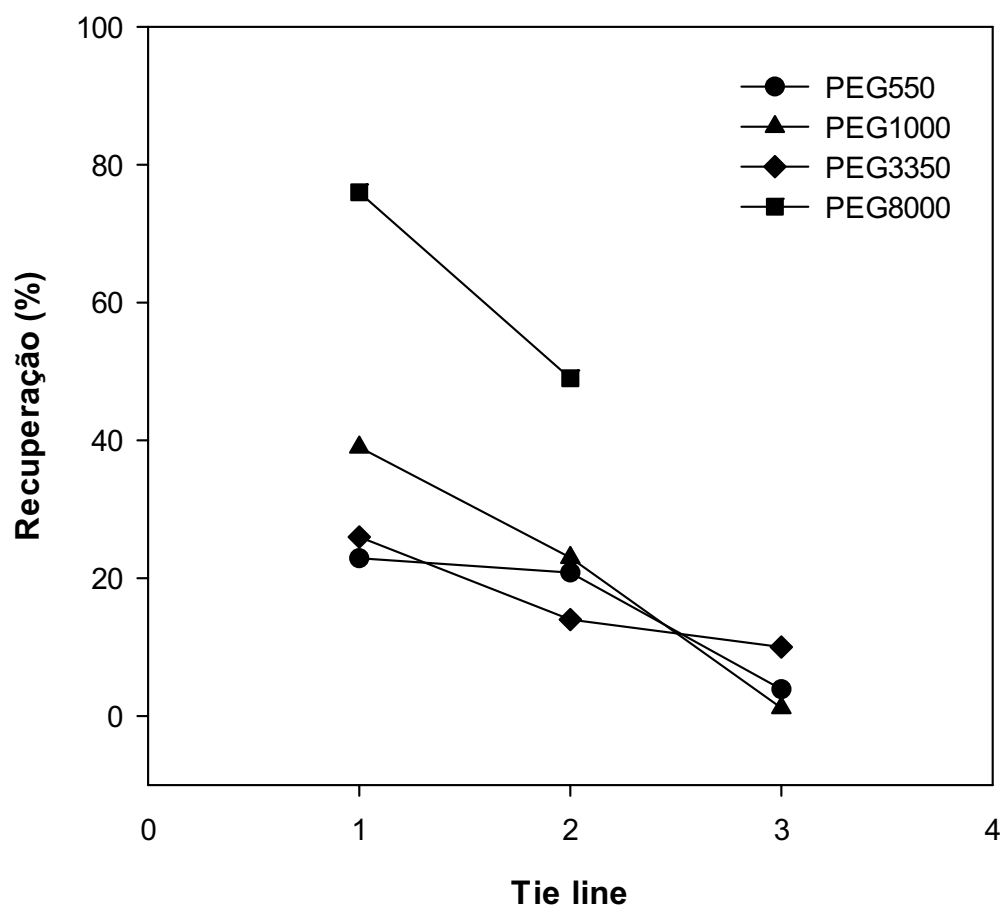


Figura 4. Recuperação da atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 nos sistemas PEG/fosfato de potássio.

Tabela 01. Composição (m/m) dos sistemas PEG/fosfato de potássio utilizando quatro diferentes polímeros para formação do sistema bifásico aquoso [22].

<i>Sistemas</i>	<i>“Tie line”</i>	<i>PEG</i> (%)	<i>K₂HPO₄/KH₂PO₄</i> (%)
<i>PEG 550</i>	1	16,7	14,8
	2	17,7	15,7
	3	19,7	17,7
<i>PEG 1000</i>	1	16,2	14,3
	2	17,7	15,7
	2	19,7	17,7
<i>PEG 3350</i>	1	14,0	11,8
	2	17,7	15,7
	3	19,7	17,7
<i>PEG 8000</i>	1	11,8	9,8
	2	14,0	11,8

CONCLUSÕES

- A utilização da glicose em meios de cultivo contendo lactose ou galactose não resultou em aumento da produção da biomassa, bem como reduziu a atividade da β -galactosidase em linhagem CBS6556 de *K. marxianus*.
- A interação da fonte de nitrogênio com a temperatura de crescimento resultou em diferentes velocidades de crescimento para linhagem CBS6556 de *K. marxianus*, sendo a temperatura de 30°C a mais adequada para produção de biomassa em meio contendo lactose e fosfato de amônia dibásico.
- Para cultivos em lactose, a uréia pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para produção de biomassa pela CBS 6556 de *K. marxianus* numa faixa de temperatura de 34 a 42°C, sem significativa perda da velocidade de crescimento.
- A temperatura de 34°C foi a melhor para a produção da enzima β -galactosidase por CBS6556 (4517,19 U/mg prot), em meio contendo lactose e fosfato de amônia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.
- O coeficiente de partição da enzima β -galactosidase em sistema bifásico aquoso foi influenciado pelo tamanho da cadeia do PEG quanto e pela concentração dos componentes do sistema, sendo o sistema PEG3350/Fosfato de potássio o mais indicado para separação desta enzima das proteínas contaminantes.

ADENDOS

PAINÉIS E ARTIGOS PUBLICADOS

1. **Martins, DBG**; Souza Júnior, CG; Simões, DA; Morais Júnior (2002) The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentration of galactose. *Current Microbiology* 44:379-382.
2. Souza, PRS; Souza Jr, CG; **Martins, DBG**; Morais Jr, MA; Lima Filho, JL (2003) Production of single cell protein by *Kluyveromyces marxianus* in urea and ammonia sulphate as nitrogen sources. *XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia* – Florianópolis – SC.
3. **Martins, DBG**; Morais Jr, MA; Lima Filho, JL (2003) Influence of the nitrogen source in the lactase production by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. *XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia* – Florianópolis – SC.
4. Stamford, TCM; Calina, M; **Martins, DBG**; Campos-Takaki, G. (2003) Influencia del stress salino en la producción de biomasa de *Cunninghamella elegans* (542). *XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia* – Florianópolis – SC
5. Maia, MMD; Maia, PFCMD; **Martins, DBG**; Lima Filho, JL. (2003) Immobilization of yeast cells and invertase in glass surface using glutaraldehyde as biofunctional agent. *XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. Caxambu – MG
6. Nogueira, ACF; Bittencourt, KFM; Maia, MMD; **Martins, DBG**; Lima Filho, JL. (2003) Single Cell Protein production by *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* cells using factorial planning. *XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. Caxambu – MG.
7. Maia, MMD; Maia, PFCMD; Lima, MMF; Bezerra, PS; Rizvi, IBC; **Martins, DBG**; Lima Filho, JL. (2002) Sucrose hydrolysis by a commercial invertase immobilized on sugar cane bagasse. *XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. Caxambu – MG
8. Nogueira, ACF; Bittencourt, KFM; Maia, MMD; **Martins, DBG**; Lima Filho, JL. (2002) *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 growth in residue from a sucrose-rich syrup factory. *XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. Caxambu – MG

9. Mafra, MF; **Martins, DBG**; Morais Jr., MA; Lima Filho, JL. (2002) *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 growth using “coalho” and ricotta cheese whey as substrate for SCP production. *XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. Caxambu – MG
10. Nogueira, ACF; Bittencourt, KFM; Maia, MMD; **Martins, DBG**; Lima Filho, JL. (2001) Single cell protein production using *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* grown in residues from sucrose-rich syrup factory. *I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia*. São Paulo – SP

News & Notes

The β -Galactosidase Activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 Decreases by High Concentrations of Galactose

Danyelly Bruneska Gondim Martins,¹ Cláudio Galvao de Souza, Jr.,¹ Diogo Ardaillon Simões,²
Marcos Antonio de Moraes, Jr.^{1,3}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³Setor de Biologia Molecular/LIKA, Universidade Federal de Pernambuco Av. Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil

Received: 8 August 2001 / Accepted: 15 October 2001

Abstract. In this paper we report on the effect of different concentrations of lactose and galactose in the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. The results clearly demonstrate a decrease in enzyme specific activity during cultivation at high concentrations of L-lactose or D-galactose, despite the fact that these carbohydrates are normally used for induction of the β -galactosidase activity. Therefore, maximum induction of β -galactosidase in *K. marxianus* batch cultures was obtained at low concentrations of the inducer carbohydrates, in the range between 0.5 to 15 mM. Those informations can help to design low cost medium with higher β -galactosidase productivity by *K. marxianus* cells.

β -Galactosidase or lactase (E.C. 3.2.1.23) has important applications in food and pharmaceutical industries, being used to the saccharification of whey and in the treatment of milk to reduce its lactose content [reviewed in 2]. The latter use is particularly relevant for populations with high incidence of the genetic deficiency for lactose metabolism, like black populations in Central Africa, United States, and Brazil [2]. The yeast *Kluyveromyces marxianus* has been employed for the degradation of lactose in cheese whey, a polluting by-product of the dairy industry, as well as for the production of biomass, bioingredients, and enzymes [2]. In principle, these bioconversions can be accompanied by the production of proteins of industrial interest that could be recovered after the fermentation process. Among them, β -galactosidase itself has gained attention for industrial applications. Many strategies have been used for β -galactosidase production using industrial media like cheese whey [8] and molasses [5], and using different cultivation strategy [7]. However, only a few reports can be found on the effect of inducers on the fermentation process [4].

The aim of this work was to study the regulation of β -galactosidase expression in the yeast *Kluyveromyces marxianus* by its natural inducers, lactose and galactose, in different batch fermentation conditions. The results presented show that induction of β -galactosidase production was dependent on D-galactose concentration. However, at high concentrations, D-galactose caused an unexpected decrease in β -galactosidase activity after a short period of induction. The effect is probably due to the accumulation of an internal glycolysis metabolite when cells are consuming lactose or D-galactose at high rates.

Material and Methods

Yeast strain and media. The *K. marxianus* strain CBS 6556 was cultivated in rich medium YP (2% peptone and 1% yeast extract) or in minimal medium MM (0.16% YNB and 0.5% ammonium sulphate) supplemented with 20 g/L of each carbon source tested. Solid media contained 2% agar. Cheese whey, supplied *in natura* by local cheese producers, was autoclaved and used for cell cultivation without any supplementation. It contained lactose at 36 g/L.

Culture conditions. In order to prepare inocula with different induction states, one yeast colony from YP-dextrose agar plate was used to inoculate 20 mL of the appropriate medium in Erlenmeyer flasks.

Correspondence to: M.A. de Moraes, Jr.; email: morais@lika.ufpe.br

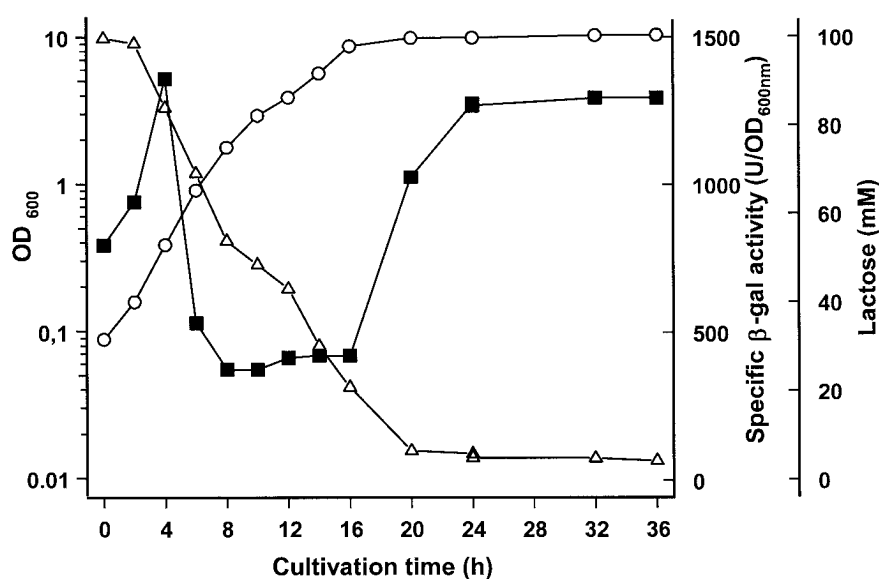


Fig. 1. Shake flask cultivation of *K. marxianus* CBS6556 in cheese whey. Cells grown in glucose were used as inoculum and the following parameters were evaluated: optical density (○), specific β -galactosidase activity (■), and lactose concentration (△). Cultivations were done in triplicate as described in Material and Methods.

Flasks were incubated for 16 h at 28°C under constant agitation (180 rpm) in an oscillatory bath. For the inoculation of the experiments, grown cells were washed in sterile water and diluted in the specific media to an optical density of 0.2 (600 nm).

Measurement of cell density, lactose concentration, and β -galactosidase activity. Lactose was measured by the DNSA method, calibrated with pure lactose (Sigma Co.). The cell density was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀). The specific β -galactosidase activity was measured using the chromogenic substrate o-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) as described [1]. One unit of β -galactosidase activity (U) is defined as the amount of enzyme that hydrolyze 1 μ mole of ONPG per minute at 30°C and pH 7.0. The specific activity was expressed in enzyme units per unit of cell density (U/OD₆₀₀) [4]. Enzyme specific activities were measured in three independent experiments, with triplicates for each point. Standard deviations did not exceed 15–20% of the mean value [4].

Results and Discussion

Figure 1 shows the evolution of β -galactosidase activity and cell growth of *K. marxianus* in batch cultures on cheese whey. It can be observed that the specific enzyme activity initially increased and attained a maximum of 1400 U/OD₆₀₀ after 4 h of incubation. However, as the incubation continued, β -galactosidase specific activity drastically decreased. This initial period comprised the exponential growth phase, when cells were growing with a μ maximum of 0.43 h⁻¹. A second phase of high β -galactosidase activity was observed after 16 h of incubation, when the lactose concentration was below 0.36 g/L (10 mM) and the culture entered the stationary phase of growth. Enzyme activity reached 1300 U/OD₆₀₀ at 24 h and maintained this value after cessation of growth (Fig. 1). Similar response can also be found in the results of chemostat cultures of *K. lactis* after pulses of D-

galactose or lactose [6] and in batch cultures of *K. marxianus* CBS6556 in high lactose medium [8]. As that transient response has not been taken into account by the authors, we further characterised the influence of increasing concentration of D-galactose on the β -galactosidase activity in defined laboratory media.

Cells previously grown on D-glucose were used to inoculate media containing 20 g/L of D-glucose, D-galactose, or lactose, and the β -galactosidase activity was evaluated during the first 4 h of incubation. As shown in Fig. 2, incubation on D-glucose medium promoted a decrease of the β -galactosidase activity, as it could be anticipated from its known repressive effect. In contrast, incubation on D-galactose and lactose induced the production of β -galactosidase to a maximum of 1800 U/OD₆₀₀. It shows that the β -galactosidase induction in *K. marxianus* is a short-term adaptation process and promptly reversible after cultivation in D-glucose, as already reported for *K. lactis* [4, 6]. However, a significant decrease of the specific activity was observed thereafter. Interestingly, when D-galactose grown cells ("induced cells") were used to inoculate a 20 g/L D-galactose medium, an immediate decrease in the enzyme activity was observed during the first hour of incubation (Figure 2). In this case, however, the activity raised again to its previous value as the incubation continued. Furthermore, glycerol-grown cells were used to inoculate synthetic media containing increased concentrations of D-galactose. The maximum β -galactosidase activity of 1560 U/OD₆₀₀ was achieved in the medium with 0.9 g/L (5 mM) of D-galactose, and a significant decrease in activity was observed for higher D-galactose

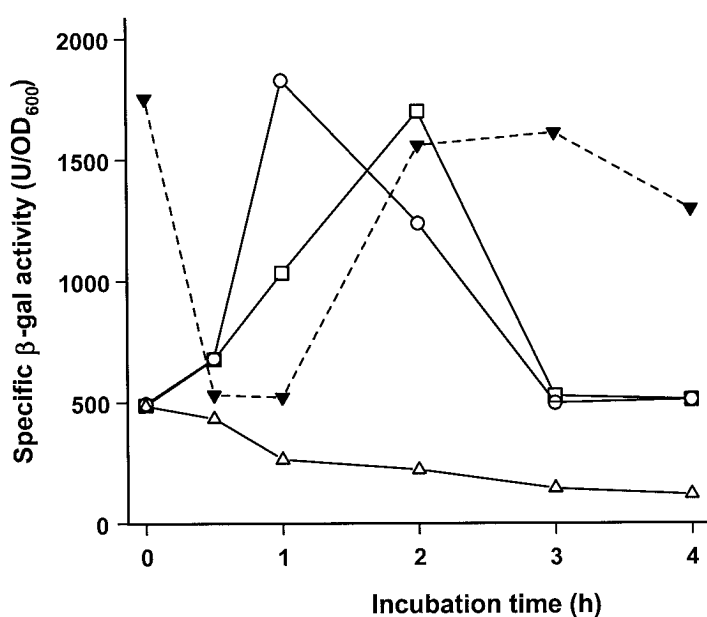


Fig. 2. Time course of specific β -galactosidase activity in different carbon sources. Cells grown in glucose-minimal medium were used to inoculate minimal media containing glucose (Δ), galactose ($\circ$), or lactose ($\square$). Cells grown in galactose-minimal medium were used to inoculate galactose minimal medium ($\blacktriangledown$). Cultivations were done in triplicate as described in Material and Methods.

initial concentrations (Fig. 3). Additionally, a 45% decrease of the initial enzyme activity was observed when D-galactose-grown (induced cells) were incubated for 4 h for concentrations above 5 mM D-glucose. As this regards to the expression of β -galactosidase, these results suggest that when *K. marxianus* cells are shifted to a high concentration of D-galactose or lactose, a repressive mechanism is superimposed to the inducing effect of the substrate. Recent report described the occurrence of repression associated with the presence of D-galactose in

Saccharomyces cerevisiae, probably due to accumulation of glycolytic intermediates generated during the metabolism of D-galactose through the Leloir pathway and subsequent glycolytic pathway [9].

Further, glycerol-grown cells were incubated in a medium containing 0.09 g/L (0.5 mM) of D-galactose, to avoid that substrate-promoted “repressive” effect. As shown in Fig. 4, the maximum level of enzyme activity was almost achieved after 15 min of incubation on D-galactose, and this level was maintained up to 120 min.

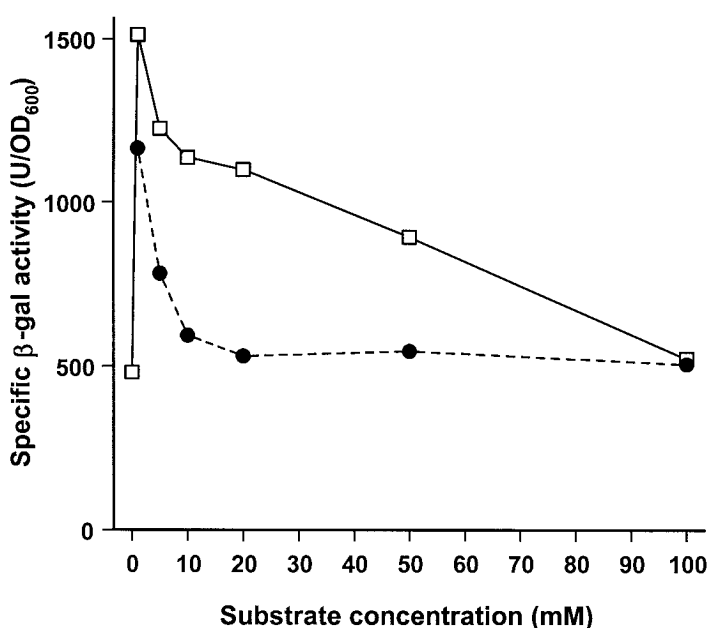


Fig. 3. Specific β -galactosidase activity of CBS6556 cells after 4 h of cultivation in different concentrations of D-glucose or D-galactose. Glycerol grown cells were used to inoculate galactose-minimal medium ($\square$) and galactose grown cells were used to inoculate glucose-minimal medium ($\bullet$). Cultivations were done in triplicate as described in Material and Methods.

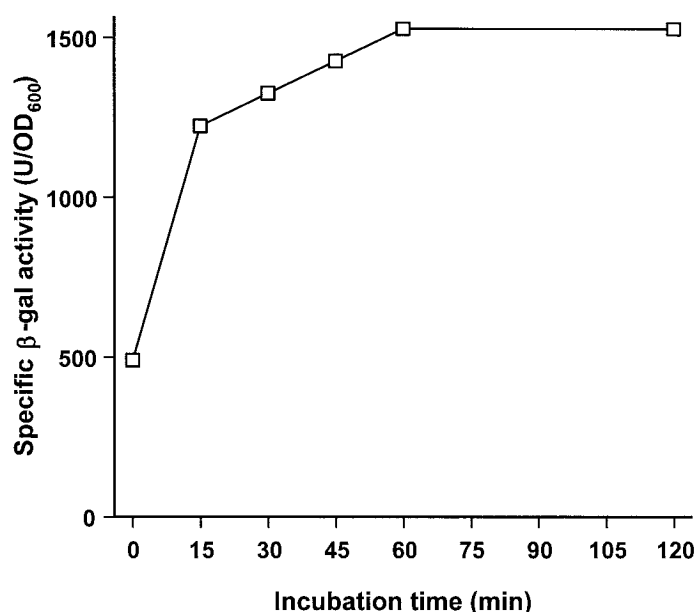


Fig. 4. Evolution of specific β -galactosidase activity of CBS6556 cells cultivated in minimal medium containing 0.5 mM of galactose. Cells were pre-cultured on glycerol. Cultivations were done in triplicate under the conditions described in Material and Methods.

Dickson and Barr [3] have shown that the maximum induction of β -galactosidase in *K. lactis* was achieved by using lactose at 1 mM, which yields 0.5 mM of D-galactose after complete hydrolysis. Indeed, low concentrations as 10 mM lactose (Fig. 1) or 0.5 mM of D-galactose (Fig. 4) were also effective to induce β -galactosidase to its maximum level in *K. marxianus* CBS6556.

At the time of this manuscript preparation, Nor et al. [7] showed that high cell-specific rates of β -galactosidase production by *K. fragilis* (former name of *K. marxianus*) was achieved at lactose concentration below 0.5 g/l (1.4 mM), using the corrected feed-forward control strategy. Additionally, Furlan et al. [5] described the β -galactosidase production in lactose-free molasses medium, which is cheaper than cheese whey. Increasing industrial demand for β -galactosidase requires methods for production with economically feasibility. Therefore, future efforts to combine the use of low-cost medium like molasse fed with cheese whey to a concentration that ensures higher β -galactosidase activity may be a good alternative for the commercial scale production.

Additionally, the molecular bases of that repressive response are still a matter of investigation even in *S. cerevisiae* and are poorly understood in *K. lactis*. Therefore, future work in our laboratory will concentrate on the study of *GAL/LAC* gene expression during the repressive period under different substrate concentrations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNPq and Facepe. The authors thanks to M. Piper and P. Lapujarde (TU Delft) for their helpful discussion on this work.

Literature Cited

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA (1989) Current protocols in molecular biology, vol. 2. New York: John Wiley & Sons, Inc.
2. Belem MAF, Lee BH (1998) Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Crit Rev Food Sci Nutr 38:565–598
3. Dickson RC, Barr K (1983) Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. J Bacteriol 154:1245–1251
4. Dickson RC, Martin JS (1980) Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J Bacteriol 142:777–785
5. Furlan AS, Schneider ASL, Merkle R, Carvalho-Jonas MF, Jonas R (2000) Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol Letters 22:1195–1198
6. Inchaurredo VA, Flores MV, Voget CE (1998) Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. J Indust Microbiol Biotechnol 20:291–298
7. Nor ZM, Tamer MI, Mehrvar M, Scharer JM Moo-Young M, Jervis EJ (2001) Improvement of intracellular β -galactosidase production in fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnol Letters 23:845–849
8. Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAZ (1999) Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. J Indust Microbiol Biotechnol 23: 91–96
9. Rodrigues C, Flores C-L (2000) Mutations in *GAL2* or *GAL4* alleviate catabolic repression produced by galactose in *Saccharomyces cerevisiae*. Enz Microbiol Tech 26:748–755



PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN BY *Kluyveromyces marxianus* IN UREA AND AMMONIA SULPHATE AS NITROGEN SOURCES

Souza, P.R.E.¹; Souza Jr. C.G.¹; Martins, D.B.G.¹; Morais Jr., M.A.^{1,2}; Lima Filho, J.L.^{1,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco – PE - Brasil; ²Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco- PE - Brasil. ³Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco – PE - Brasil

bruneska@lika.ufpe.br

INTRODUCTION

Different nitrogen sources can be used for supplementation of industrial residues to produce biomass and by-products. Lower levels of yeast assimilable nitrogenous compounds (YAN) have been related to lower fermentation rates and longer fermentations (Bely et al., 1990). These effects depend on the nitrogen source, since growth on good or good nitrogen sources such as ammonia, seems to yield relatively higher growth rates than on poor one such as urea (ter Schure et al., 2000). Advances in industrial biotechnology offer potential opportunities for economic utilization of agro-industrial residues, as substrate carbon source in bioprocesses. Single cell protein (SCP) production is used as innovative and alternative proteinaceous and this protein is extracted from cultivated microbial biomass (Anupama & Ravindra, 2000). Many microorganisms, like bacteria, algae, yeast or filamentous fungi, had been employed to bioconversion of these residues in value-added products, like enzymes, amino acids, ethanol and single cell protein (SCP) that can be used as food additives for human consumption (reference). *Kluyveromyces marxianus* is non-conventional yeast, recognized as GRAS by FDA that has gained attention due to its physiological and genetic properties, like rapid growth without by-product formation, high secretion capacity, ability of growth in a variety of carbon sources as cellobiose, lactose, xylose and inulin, in a wide range of pH and temperature (reference). In this work, two strains of *K. marxianus*, ATCC36907 and CBS6556, were studied for biomass formation in mineral medium containing sucrose as carbon source and urea or ammonia sulphate as nitrogen source.

RESULTS AND DISCUSSION

The specific growth rate of *K. marxianus* strains, grown in ammonia or urea-containing media at 30°C, varied between 0.41 and 0.47, in both nitrogen sources (Table 1). These results are similar to that showed by Albers (1996) using *S. cerevisiae* for biomass production growing in minimal media containing glucose and ammonia sulfate. The residual sugar in the medium was higher for ATCC36907 growing in urea, which resulted in lower biomass production (data not shown). The residual nitrogen remained very high even after 12 hours of cultivation, mainly when urea was used. When the temperature was increased to 35°C, the specific growth rate also increased, except for ATCC 36907 in ammonia sulphate as nitrogen source (Table 2). In this condition, *K. marxianus* CBS 6556 strain showed best results growing in ammonia ($\mu = 0.53 \text{ h}^{-1}$) and urea ($\mu = 0.51 \text{ h}^{-1}$), which is similar to that obtained by Albers (1996) for *S. cerevisiae* growing in glucose media supplemented in amino acids ($\mu = 0.53 \text{ h}^{-1}$). The sugar was completely depleted when the cells were growing at 35°C, in ammonia sulphate and urea. The residual nitrogen was lower for CBS6556 growing in ammonia sulphate and for ATCC36907 in urea, 55 and 52%, respectively. These data suggests a difference in the regulation of the nitrogen central metabolism between two strains of the same specie, and its also dependent of the growth temperature. Our results demonstrate that *K. marxianus*, mainly CBS6556 strain, can be used for Single Cell Protein in sucrose-media, supplemented with urea, a cheap nitrogen source that resulted in the highest specific growth rate at 35°C. So, this yeast, already used for reduction of the concentration of lactose in cheese whey, can also be used in sucrose-containing residues, as molasses, very common in sugar factories.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and Maintenance: *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 and ATCC 36907 strain, were used in this study. The strains were maintained in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose and 2% agar).

Growth conditions: for the initial growth, one single loopful of each strain was collected from agar plate and inoculated in minimal media (Verduyn, 1991) containing 2% sucrose and 1% of urea or ammonia sulphate. The cells were cultivated for 12 hours at 30 or 35°C, 150 rpm rotatory shaker. After this period, an aliquot of these cultures was used to inoculate to the same media at the initial absorbance $OD_{600} = 0.1$ in Erlenmeyer flasks containing the same media, and sample were harvested for biomass measurement.

Cell growth measurement: was performed spectrophotometrically at 600nm; and the value was converted to dry weight using a linear correlation.

Sugar determination: the sugar content was analyzed by DNSA method, as described by Miller (1959) with some modifications for sucrose hydrolysis step. An aliquot of 500ml of the supernatant was heated at 100°C for 10 minutes in the presence of 50ml 1N H₂SO₄. After rapid cooling, 50ml of 1M NaOH was added to the reaction, followed by 750ml of DNS reagent. The mix was heated at 100°C for 10 minutes and the absorbance checked at 590nm.

Nitrogen determination: urea and ammonia consumption was quantified by using enzymatic kit (Celm, Brazil).

Table 01. Specific growth rate (h^{-1}), biomass formation (g/l), sugar consumption (%) and nitrogen uptake (%) by *Kluyveromyces marxianus* strains after 12 hours of cultivation at 30°C and 150rpm in sucrose-minimal media containing ammonia sulphate or urea as nitrogen sources.

<i>K. marxianus</i> strain	μ (h^{-1})	Residual sugar (%)	Residual nitrogen (%)
Ammonia sulphate			
ATCC36907	0.47	26.7	70.6
CBS6556	0.44	47.5	81.5
Urea			
ATCC36907	0.43	58.7	91.6
CBS6556	0.41	30.4	84.9

Table 02. Specific growth rate (h^{-1}), biomass formation (g/l), sugar consumption (%) and nitrogen uptake (%) by *Kluyveromyces marxianus* strains after 12 hours of cultivation at 35°C and 150rpm in sucrose-minimal media containing ammonia sulphate or urea as nitrogen sources.

<i>K. marxianus</i> strain	μ (h^{-1})	Residual sugar (%)	Residual nitrogen (%)
Ammonia sulphate			
ATCC36907	0.45	-	78.1
CBS6556	0.53	-	55.8
Urea			
ATCC36907	0.49	-	52.8
CBS6556	0.51	-	88.1

REFERENCES

- Albers, E., Larsson, C., Liden, G., Niklasson, C. and Gustafsson, L. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p. 3187-3195 (1996).
Anupama & Ravindra P. *Biotechnology Advances* v.18, pp. 459-479 (2000).
Bely M, Sablayrolles J.M, Barré P. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70, pp. 246-252
Kim, J.K, Tak, K.T, Moon, J.H. *Aquacultural Engineering* v.18, pp. 41-49 (1998)
Miller G.L. *Analytical Chemistry* v.31, pp. 420-428 (1959).
Cowan S, Vallier LG, Trick J.S, Carlson, M, Johnston M. *Yeast* v.13, pp. 127-137 (1997)
ter Schure, E.G., van Riel, N.A.W., Verrips, C.T., *FEMS Microbiology Review*, v.24, pp. 67-83 (2000)
Verduyn, C. PhD thesis, 1991.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by: PAT Company, BNB PADCT/CNPq and UFPE/LIKA. We would like to thank particularly to Sr. Miguel Annes de Alencar, owner of the Factory of Sugar in Gameleira – Pernambuco.

LIKA



MICROBIOLOGIA 2003



INFLUENCE OF NITROGEN SOURCE IN THE LACTASE PRODUCTION BY *Kluyveromyces marxianus* CBS6556

Martins, D.B.G.¹; Morais Jr., M.A.^{1,2}; Lima Filho, J.L.^{1,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco – PE - Brasil;

²Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco- PE - Brasil. ³Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco – PE - Brasil

bruneska@lika.ufpe.br

INTRODUCTION

Lactose is the sugar present in milk and dairy product, as well in cheese whey, the major waste produced in the cheese manufacturing (Gekas & Lopez-Leiva, 1985). Yeasts of the genus *Kluyveromyces* are of potential industrial use, and strains of *Kluyveromyces marxianus* have been considered the most adequate for bioconversion of lactose in whey mainly into biomass, for animal feed supplementation; and for β -galactosidase (lactase) production, enzyme used to reduce the lactose level in milk and derivatives for people with lactose intolerance (Berruga *et al.*, 1997). *Kluyveromyces marxianus* is one of the yeast capable to grow in lactose due to the presence of *LAC4* gene, which codifies the β -galactosidase (lactase), an enzyme that hydrolyzing this disaccharide into glucose and galactose (Sheetz & Dickson, 1981). This enzyme is important in food processing to reduce the lactose level in dairy products directed to people with lactose intolerance, besides for waste treatment to decrease the pollutant level of the cheese whey. The enzyme production is related to the growth medium, and the adjust of some parameters can improve the β -galactosidase expression. *K. marxianus* CBS 6556 strain has a high specific growth rate, short growth culture time, growth in high temperature (up to 45°C), wide range of pH and increased process productivity (Grootwassig *et al.*, 1980). This yeast has been used for the large scale production of single-cell protein (SCP) from whey in EUA (Bailey & Ollis, 1986). In this study, the biomass formation and the lactase production by *K. marxianus* CBS6556 was analyzed taking account the nature of the nitrogen source.

Table 01. Specific growth rate (h^{-1}), biomass formation (g/l) and lactase production (U/mg prot) by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 strain after 12 hours of cultivation at 30°C and 180rpm in lactose-minimal media containing glutamate, urea, ammonia phosphate or ammonia sulphate

Nitrogen sources	μ (h^{-1})	X_{MAX} (g/l)	Lactase (U/mg prot)
Glutamate	0.38	14.5	199,78
Urea	0.33	14.1	588,67
Ammonia phosphate	0.41	18.3	261,44
Ammonia sulphate	0.27	13.9	424,38

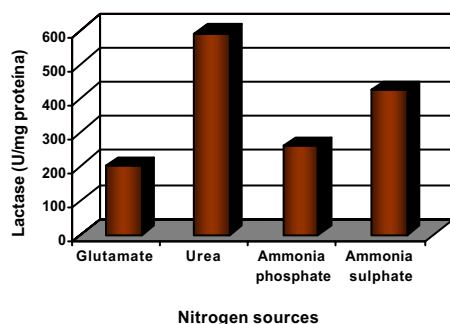


Figure 01. Lactase production (U/mg prot) by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 strain after 12 hours of growing in lactose-minimal media containing glutamate, urea, ammonia phosphate or ammonia sulphate as nitrogen source.

MATERIAL AND METHODS

Strains and growth conditions: *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 was used in this study, and its maintenance was on YPD agar slants which (2% dextrose, 0.5% yeast extract, 2% peptone, and 2% agar).

Growth medium: the mineral medium (in g/l): 1.0, KH_2PO_4 ; 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.1, $NaCl$; 0.1, $CaCl_2$; 0.001, L-histidine; 0.002, L-metionine; 0.002, L-tryptofano) was supplemented with 1 ml/l vitamin (in μ g/l: 2.0, Biotin; 400.0, Calcium pantothenate; 2.0, Folic acid; 2000.0, Inositol; 400.0, Niacin; 200.0, 7-aminobenzoic acid; 400.0, Piridoxine-HCl; 200.0, Riboflavin; 400.0, Thiamine hydrochloride) and 1 ml/l trace elements (in μ g/l: 500.0, H_3BO_3 ; 40.0, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 100.0, KI ; 200.0, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 400.0, $MnSO_4 \cdot H_2O$; 200.0, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$; 400.0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Ammonium sulphate, ammonium phosphate, urea and glutamate were used as nitrogen sources. Lactose was used as single sugar carbon source, to the final concentration of 10g/l, assuming it is an inducer of the β -galactosidase production in *K. marxianus*.

Culture conditions: one vial tube, containing 1 ml of culture at the final concentration of 10^6 cells/ml was inoculated in 50ml-Erlenmeyers flasks containing 10ml mineral medium and incubated for 12 hours at 30°C in rotatory shaker (180rpm). The pre-grown cells were re-inoculated in 250ml-Erlenmeyers flask containing 50ml of the same medium and after 8 hours of growth, the culture was used to inoculate 2000ml-Erlenmeyer flask containing 600ml of the same medium. This culture was accomplished during 12 hours by biomass measurement and enzyme determination.

Cell growth: it was determined spectrophotometrically at 600nm.

Enzyme activity assay: β -galactosidase activity was performed, using 7-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), as described by Miller (1972), modified as described below. A sample of 100 μ l was added to 900 μ l of Z buffer (40mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 60mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 1mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10mM KCl , 50mM 2-mercaptoethanol), and the reaction was incubated at 30°C for 10 minutes. After this period, 100 μ l of ONPG (8mg/ml in Z buffer) was added to the reaction, and it was stopped when the light yellow color/f was detected, by adding 500 μ l of $NaCO_3$. The absorbance was measured at 420nm. Lactase activity was expressed as units (nmol of o-nitrophenol liberated per minute under standard conditions).

Protein determination: the protein measurement was performed as described by Lowry, 1951.

RESULTS AND DISCUSSION

Specific growth rate: The specific growth rate of *K. marxianus* CBS6556 strain was higher when ammonia phosphate was used, followed by glutamate, with 0.41 and 0.38 h^{-1} , respectively (Table 1). When urea was used as nitrogen source specific growth rates was very low. These results are in agreement with the knowledge about *S. cerevisiae* nitrogen metabolism, which ammonia and glutamate can be used to achieve higher specific growth rate; and urea is considered a poor nitrogen source (Wiame *et al.*, 1985; Magazani & Kaiser, 2000). Otherwise, the specific growth rate of *K. marxianus* CBS6556 in ammonia sulphate was very different from that observed for ammonia phosphate, which suggest the ammonia-associated ionic compound can enhance the growth rate and the biomass production. For CBS6556 strain, this increase was around 34% and 24%, respectively.

β -galactosidase production: β -galactosidase production was analyzed in minimal media containing four nitrogen sources (Figure 1). The lactase production after 12 hours of cultivation was higher using urea as nitrogen source, 588.8 U/mg protein, which was 25% higher than the enzyme production observed in ammonia sulphate media (424.38 U/mg protein), a nitrogen source normally used in laboratorial media (Table 1). Urea was also able to induce the enzyme production in a stronger way in the middle of the exponential phase, with enzyme activity higher than 4000 U/mg protein (data not shown). Ammonia phosphate and glutamate, despite of the high specific growth rate, showed low β -galactosidase activity after 12 hours of growth. Fiedurek & Szczodrak (1994), described ammonia phosphate as the best nitrogen source for β -galactosidase activity after 72 hours of incubation at 34°C for another strain of *K. marxianus* For *Penicillium notatum*, no enzyme production was detected when urea was the nitrogen source (Fiedurek *et al.*, 1996). These results suggests an influence of the nitrogen source used in the media for β -galactosidase production, dependent of the specie and strain.

CONCLUSIONS

- Urea, an inexpensive nitrogen source, can be used for β -galactosidase production by *K. marxianus* CBS6556, such as ammonia sulphate, despite of the low growth rate observed in both compounds.
- Ammonia phosphate and glutamate showed better growth rate, but low enzyme production
- It could have some differences between the nitrogen metabolism of *S. cerevisiae* and *K. marxianus*, once urea can be used as good nitrogen source for biomass production.

REFERENCES

- BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical engineering fundamentals. McGraw-Hill International Editors, 2nd ed, 1986.
- BERRUGA, M.I.; JASPE, A. AND SAN JOSE, C. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol 40, p 119-123. (1997)
- CABALLERO, R.; OLIVIN, P.; CRUJEIRERRO, F.G.; GARCIA-GARIBAY, M. AND GOMEZ-PUJOL, L. Food Research International. v.28, n.1, p.37-41, 1995.
- FIEDUREK, J.; GROMADA, A.; JAMROZ, J. Journal of Basic Microbiology. v.36, p.2732, 1996.
- FIEDUREK, J. & SZCZODRAK, J. Acta Microbiologica Polonica v.43, p.5765, 1994.
- GROOTWASSING, J.W.D. & FLEMING, S.E. Enzyme and Microbial Technology v.2, p.4563, 1980.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Analytical Biochemistry V. 193, p.265-275, 1951.
- GEKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M. Process Biochemistry v.29, p.565-566, 1995.
- MAGAZANIK, B. & KAISER, C.A. Gene. v.290, p.1-18, 2000.
- MILLER, J.M. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.352
- SHEETZ, J.M. & DICKSON, R.C. Genetics. v.89, p.73-745, 1981.
- WIAME, J.M.; GRENSON, M.; ARSTIR, H.N. Advances in Microbial Physiology. v.26, p.1-87, 1985.

SUPPORTED BY: CAPES; FINEP; UFPE-LIKA; P&T

1003

MAM 249

INFLUENCIA DEL STRESS SALINO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* (542)
STAMFORD, T.C.M.¹; MARTINS, D.¹; FRANÇA, M.C.¹;
CAMPOS-TAKAKI, G.M.²

1.Doutorado em Ciências Biológicas, UFPE, Recife-PE;
2.Departamento de Química, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco Recife-PE
Brasil. E-mail: takaki@unicap.br

MAM 250

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE *GEOBACILLUS ISOLADOS* DE ÁREA CONTAMINADA POR PETRÓLEO
PAZ, M.C.F.^{1,2}; SANTIAGO, A.L.C.M.A.^{1,2}; CEBALLOS, B.S.O.¹; CAMPOS-TAKAKI, G.M.²

1.Universidade Federal de Pernambuco; 2.Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE; 3. Universidade Federal de Campina Grande; *E-mail: mabelfranca@yahoo.com.br

MAM 251

POLYPHOSPHATE ACCUMULATION IN GROWING CULTURES OF MUCORALEAN FUNGI
CAMPOS-TAKAKI, G. M.¹; OKADA, K.¹; FUKUSHIMA, K.²; NISHIMURA, K.²; MYAJI, M.²

1.Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 2.Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxins - Chiba University 1-8-1 Inohana, Chuo-Ku - Chiba 260, Japan.

MAM 252

CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO E DA MORFOFISIOLOGIA DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* UCP 596 EM DERIVADO DE PETRÓLEO (DIESEL)
LIMA E SILVA, T.A.¹; ALMEIDA, F.C.G.¹; CAMPOS-TAKAKI, G.M.^{1*}

1.Universidade Católica de Pernambuco, Recife- PE.
*E-mail: takaki@unicap.br

MAM 253

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *CANDIDA LIPOLYTICA* USING CORN OIL AS SUBSTRATE
RUFINO, R.D.¹; LUNA, J.M.¹; SARUBBO, L.A.^{1,2}

1.Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais; 2.Departamento de Química, Universidade Católica De Pernambuco, Rua Nunes Machado, N.42, Bl J, Térreo, Boa Vista Cep: 50050-590, Recife-Pernambuco, Brasil.
E-mail: leonie@unicap.br

MAM 254

SCREENING DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS DO GRUPO *GEOBACILLUS* PRODUTORAS DE OXIDASES
MEDEIROS, C.P.L.¹; RIBEIRO, D.R.P.¹; GAZINEU, M.H.P.¹; JORDÃO, R.C.C.^{1,2}; TAKAKI, G.M.C.¹; SALGUEIRO, A.A.^{1*}

1.Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP; Recife, PE, Brasil; 2.Universidade de Pernambuco - UPE; Recife, PE, Brasil. *E-mail: aas@unicap.br

MAM 255

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *CANDIDA LIPOLYTICA* USING EXPERIMENTAL DESIGN
ALBUQUERQUE, C.D.C.^{1*}; SARUBBO, L.A.¹; FILETI, A.M.F.²; CAMPOS-TAKAKI, G.M.¹

1. Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; 2. Campinas State University, Campinas, São Paulo, Brazil. *E-mail: cdaisy@unicap.br

MAM 256

EFEITOS DA SALINIDADE NO CRESCIMENTO RADIAL E GERMINAÇÃO DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* LENDNER

SANTIAGO, A.L.C.M.A.^{1,2*}; CAVALCANTI, M.A.Q.¹; CAMPOS-TAKAKI, G.M.²; PAZ, M.C.F.^{1,2}

1.Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; 2.Núcleo de Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
E-mail: andrelcabral@ig.com.br

MAM 257

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* CULTIVADAS EM PRESENÇA DE NAFTALENO

LIMA, M. A. B.¹; MARINHO, P. H.¹; MENDES, P. S.¹; TAKAKI, G.M.C.^{1,2,3}; SHIOSAKI, R.K.¹; NASCIMENTO, A.E.^{1,3}

1.Universidade Católica de Pernambuco- Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais; 2.Universidade Católica de Pernambuco- Departamento de Química; 3.Universidade Católica de Pernambuco- Departamento de Biologia.

MAM 258

MORFOFISIOLOGIA DE AMOSTRAS DE *RHIZOPUS ARRIZUS* UCP402 E UCP402X EM MEIO DE CULTURA CONTENDO PIRENO

SHIOSAKI, R. K.^{1,2}; SANTOS, F. L.²; OKADA, K.¹; SILVA NETO, J.B.¹; CAMPOS-TAKAKI, G.M.^{1*}

1.Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; 2.Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; 3.Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. *E-mail: takaki@unicap.br

MAM 259

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *RHIZOCTONIA SOLANI* POR ESPÉCIES DE ACTINOMICETOS QUITINOLÍTICOS

SOUZA, R.F.^{1*}; COELHO, R.R.R.¹; BRIOSSO, P.²; GOMES, R.C.¹; SOARES, R.M.A.¹

1.Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2.Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *E-mail: rsouza.rlk@terra.com.br

MAM 260

DIVERSITY OF MAGNETOTACTIC MULTICELLULAR AGGREGATES FROM LAGOA DE ARARUAMA, RJ

ABREU, F.A.¹; MARTINS, J.L.¹; KEIM, C.N.²; SILVA, K.T.¹; ROSADO, A.S.¹; FARINA, M.² & LINS, U.^{1*}

1.Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes; 2.Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ.
*E-mail: ulins@micro.ufrj.br

MAM 261

HEAVY METAL REMOVAL FROM INDUSTRIAL RESIDUE BY BIOSURFACTANTS

ANISZEWSKI, E.²; SANTOS, F.S.¹; ROSADO, A.S.¹; LEITE, S.G.F.²

1.Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes - UFRJ, RJ, Brasil; 2.Escola de Química - UFRJ, RJ, Brasil; 3.Instituto de Agronomia - UFRJ, RJ, Brasil



IMMOBILIZATION OF YEAST CELLS AND INVERTASE IN GLASS SURFACE USING GLUTARALDEHYDE AS BIOFUNCTIONAL AGENT.

Maia, M. M. D.^{1,3}; Maia, P. F. C. M. D.¹; Martins, D. B. G.¹; Lima-Filho, J. L.^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- UFPE; ²Dep. de Bioquímica- UFPE; ³Dep. de Biologia- UFRPE.

Commercial yeast cells and invertase were immobilization on glass surface using glutaraldehyde as bifunctional agent. Immobilization of enzyme to solid supports often improves stability and allows their reuse. The invertase was immobilized on glass beads with 425-600 microns of size and activated by amination with 3-aminopropyltriethoxysilane in acetone (3% v/v) overnight at 80°C. After abundant washing with acetone and distilled water the beads (0.5g) was treated with 2mL of different glutaraldehyde concentration (0% 1.5% 2.5% and 3.5% /v) in 0.2M potassium phosphate buffer pH 7.0 overnight at 4°C without agitation. The activated beads were washed with distilled water, suspended with 2mL of 3.2mg/mL of enzyme (355 U/mg/solid) in 0.1M sodium citrate buffer pH 5.0. After 12h at 4°C the support was recovered and washed with 0.5M NaCl. Invertase activity was assayed by incubation of immobilized enzyme preparation in 0.1M sodium citrate buffer pH 5.0 at 50°C containing different concentration of sucrose (400mg/mL, 600mg/mL,700mg/mL). After a period of time under mild shaking, samples were withdrawn and reducing sugars were determined by dinitrosalicylic acid (DNSA) method. Immobilized invertase activity (3.2mg/mL) using glutaraldehyde concentration 2.5% (v/v) at 50°C was found to be 0,437mg/mL/min, 0,675mg/mL/min in 40% and **0,0625mg/mL/min**, using 40% 60% and 70% of sucrose solution, respectively. Applied immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells (0.8mg/mL), the invertase activity was **0,0625mg/mL/min, 0,625mg/mL/min and 0,028 mg/mL/min, using 40% 60% and 70% of sucrose solution, respectively**, in the same conditions. These results were relatively low, probably due the higher concentration of sucrose and amount of silicon present in the glass preparation. Supported by: CNPq, UFPE and P T S/A



Single cell protein production by *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* using factorial planning

Nogueira, A.C.F.¹; Bittencourt, K.F.M.¹; Maia, M.M.D.^{1,3}; Martins, D.B.G.¹; Lima Filho, J.L.^{1,2}

¹LIKA, Universidade Federal de Pernambuco; ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco;

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Av. Moraes Rego, s/n CEP: 50.670-901 Recife – PE – Brasil. Fax +55 81 3271-8485

bruneska@lika.ufpe.br

INTRODUCTION

In the recent years, there has been an increasing trend towards more efficient utilization of agro-industrial residues, generated in large amount during the processing of raw material. The microorganisms had been employed to the bioconversion of these residues in value-added products, like enzymes, amino acids, ethanol and single cell protein (SCP). Bacteria, algae, yeast or filamentous fungi, can grown in agro-industrial residues for SCP production, and this biomass can be used as protein-rich food and food additives for human consumption. Yeast like *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*, that has GRAS (Generally Regard As Safe) status by the FDA (Food and Drug Administration) (Caballero et al,1997), are indicated for single cell production because they have rich composition of sulfur-containing amino acids and vitamins of B-Complex, beyond faster growth when compared with algae and less toxin production than bacteria (Anupama & Ravindra, 2000).

The *Saccharomyces cerevisiae* are the most popular yeast used in brewer and baker processes but the *Kluyveromyces marxianus* shows better physiological conditions, like higher specific growth rate, short culture time, growth in high temperature (up to 45°C), wide range of pH and ability to grown in a variety of carbon sources. In this work, we observed the differences between this two species of yeast for SCP production, considering the biomass formation and sugar consumption during their cultivation in experimental media containing sucrose, supplemented with different nitrogen sources. For this purpose, *K. marxianus* CBS6556 showed better production of biomass after 16 hours and 24 hours of incubation. Urea as much as ammonia can be assimilated by this strain, with no great disparity, when the aim is biomass production.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms: the strains from *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 and *Saccharomyces cerevisiae* Itaquara, an industrial type, were used in this study.

Growth conditions: for the initial growth, one criotube – containing 10⁶ cells/mL - was inoculated in complex media (1% yeast extract and 2% peptone) containing 2% sucrose at 30°C and 180 rpm rotary shaker. After 16 hours, the cells were harvested and inoculated at the initial concentration of 1,28x10⁶ cells/ml in Erlenmeyer flasks containing experimental media with sucrose (EMS). Urea and ammonium sulphate were used as nitrogen source, according to the factorial design described in the (Table 1).

Sugar determination: the sugar content was analyzed by DNSA method, as described by Miller (1959) with some modifications for sucrose hydrolysis step.

Cell growth measurement: the biomass formation was analyzed by counting in Neubauer chamber

Statistical analyzes: the 2⁴ factorial design generated 16 different combinations, described in the Table 2. These data were analyzed using Microsoft EXCEL 2002 and MINITAB programs.

Table 01. 2⁴ factorial design applied for *K. marxianus* and

Variables	Levels	
	-1	+1
Time (h)	16	24
Potassium phosphate (g/l)	0,50	1,00
Nitrogen source (g/l)	0,50	1,00
Yeast extract (g/l)	0,25	0,50

Table 02. The 16 combinations generated by the 2⁴ factorial design

Combinati	Time	Yeast extra	Nitrog source	Sodium Phosph
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	+1
3	-1	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1	+1
5	-1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1
8	-1	+1	+1	+1
9	+1	-1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1
12	+1	-1	+1	+1
13	+1	+1	-1	-1
14	+1	+1	-1	+1
15	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by: P&T Company, UFPE, BNB PADCTICNPq and UFPE/LIKA. We would like to thank particularly to Sr. Miguel Arraes de Alencar, owner of the Factory of Sugar in Gamaleira – Pernambuco.

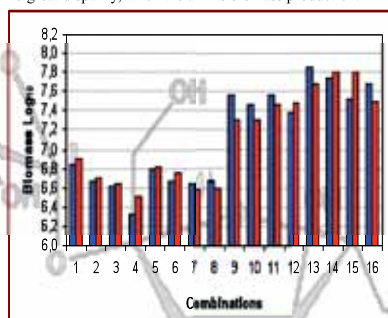


Figure 01. *S. cerevisiae* Itaquara growth in the 16 combinations of the 2⁴ factorial design, in Erlenmeyer flasks with experimental media containing 6% sucrose, supplemented with different nitrogen source (ammonium sulphate and urea).

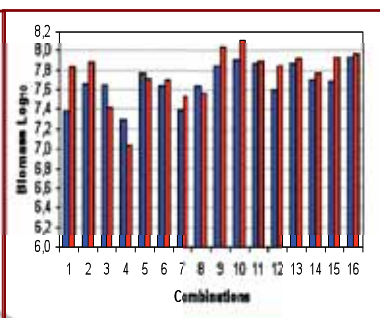


Figure 02. *K. marxianus* CBS6556 growth in the 16 combinations of the 2⁴ factorial design, in Erlenmeyer flasks with experimental media containing 6% sucrose, supplemented with different nitrogen source (ammonium sulphate and urea).

RESULTS AND DISCUSSION

This work demonstrate that incubation time is the most important variable in the 2⁴ factorial design for SCP production regard to the *S. cerevisiae* Itaquara, which the biomass formation increased 10-fold when the cells were grown during 24 hours when compared to its growth after 16 hours of cultivation (Figure 1). The performance of Itaquara was very similar in urea and ammonium sulphate, with no significant differences between the biomass productions.

Otherwise, the *K. marxianus* CBS 6556 showed differences in the growth with better results when urea is the nitrogen source. The incubation time is not the most important variable in the factorial design for biomass formation by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 (Figure 2). The biomass production in the medium containing *K. marxianus* CBS6556 was higher than observed in the *S. cerevisiae* Itaquara flasks, reaching to 10⁸ cells/ml of CBS6556 against to the maximum cells number of 7.2x10⁷ cells/ml after 24 hours of cultivation to Itaquara strain. The results reinforce the results published by Kim et al (1996), suggesting the potential of *Kluyveromyces* for SCP production growing in fructose. When the sugar consumption is analyzed, it was observed differences in the sugar assimilation in the 16 different combinations tested. The Total Reducing Sugar (TRS) consumption was between 28.2% and 54.38% after 24 hours of cultivation, for *S. cerevisiae* and *K. marxianus*, respectively. The sugar consumption is not associated to the biomass production. These results were quite similar to those obtained with yeast cultivation in residue, with better performance of CBS6556 (Martins et al, 2001). In the Figure 3, the analysis of biomass formation (Log₁₀[cells/ml]) by sugar consumption (%) presents the *Kluyveromyces* as good producer of SCP, mainly in the marked combinations flasks 10 and 9, both using urea as nitrogen source. The flask 2 of *K. marxianus* also shows good SCP production, despite of the lowest sugar utilizations (7.7%). Otherwise, the relation between biomass formation and sugar consumption for *S. cerevisiae* was not so productive as demonstrated by *K. marxianus*. The Itaquara strain showed the lowest results for SCP production that can be due to the repression mechanism of the *SUC2* gene, that codify an enzyme necessary for the cleavage of sucrose into glucose and fructose. The expression of this gene is repressed when the sugar concentration is high; and induced when the level of glucose in the medium is low (Ozcan et al, 1997). The flasks with the number 4, marked in the Figure 3 show low sugar utilization, although the higher concentration (1 g/l) of urea and ammonia in these flasks, after the first 16 hours of incubation. This behavior was not observed for *K. marxianus* CBS6556.

These results suggest some differences in the fungal metabolism between *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*; and demonstrate that *K. marxianus* CBS6556 can be used for production processes, with better revenue than *S. cerevisiae* Itaquara®.

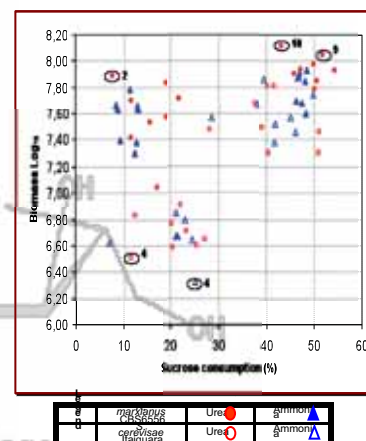


Figure 03. Analysis of the *S. cerevisiae* Itaquara and *K. marxianus* CBS6556 performance regard to the biomass formation and sucrose consumption after 16 hours and 24 hours incubations at 30°C, 180 rpm in rotary shaker. The figures marked () show the correspondent number of the combination, and are analyzed in the results and discussion.

REFERENCES

- Anupama & Ravindra, P. Biotechnology Advances, v.18, pp. 459-479, 2000.
Miller G.L. Analytical Chemistry, V.31, pp. 426-428 (1959).
Ozcan S.; Valtier, L.G.; Flick, J.S.; Carlson, M.; Johnston, M. Yeast, v.13, pp. 127-137 (1997).
Kim, J.K.; Tak, K.-T.; Moon, J.-H. Aquacultural engineering, v.18, pp. 41-49 (1998).
Martins, D.B.G.; de oliveira, L.A.; Nogueira, A.C.F.; Araújo, M.M.S.; Lima Filho, J.L. I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 2001.
Caballero, R.; Olguin, P.; Cruz-guerrero, F.G.; Garcia-Garibay, M. And Gomez-Ruiz, L. Food Research International, v.28, n.1, pp.37-41.(1995)

LIKA



SBBq 2003

Sucrose Hydrolysis by a Commercial Invertase Immobilized on Sugar Cane Bagasse

Maia, M.M.D.^{1,3}; Maia, P.F.C.M.D.¹; Lima, M.M.F.¹; Bezerra, P.S.¹; Rizvi, I.B.C.¹; Martins, D.B.G.¹; Lima Filho, J.L.^{1,2}

¹LIKA, Universidade Federal de Pernambuco; ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco;

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Av. Moraes Rego, s/n CEP: 50.670-901 Recife - PE - Brasil. Fax +55 81 3271-8485

zeluiz@lika.ufpe.br

INTRODUCTION

Immobilization of enzymes has great advantages, it is possible to use a single batch of enzymes repetitively and to stop the reaction by physical removal of the immobilized enzyme from the solution and easy analytic determination in complex mixtures and the use of small sample volumes (Erginer et al, 2000). The present work describes the possibility of using cane bagasse as a lignocellulosic support to immobilization of invertase using glutaraldehyde as fixing agent. Sugar cane bagasse is a natural economical lignocellulosic material obtained from milling on sugar cane and can be used as a good support to immobilizing microbial cells or enzyme. Kinetic study showed that the immobilized invertase (30 mg/mL) on sugar cane bagasse hydrolyzed 100% of sucrose (20% w/v) solution in 0.1 M sodium citrate pH 5.0 at 50°C after 12 hours of reaction.

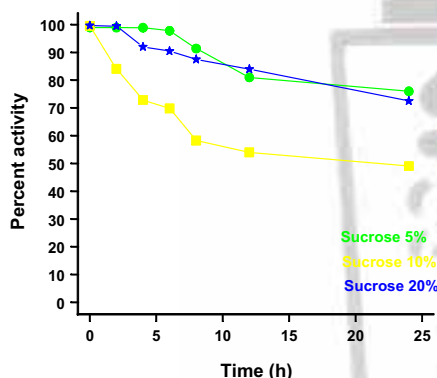


Figure 01. Effect of sucrose concentration on the immobilized invertase preparation. The immobilized invertase preparation (10mg/mL) was incubated at 50°C in 0.1M Sodium Citrate buffer, pH 5.0. Aliquots were removed and assayed for enzymatic activity.

RESULTS AND DISCUSSION

EFFECT OF CONCENTRATION OF SUCROSE IN THE ACTIVITY OF IMMOBILIZED INVERTASE

The effect of sucrose concentration on the immobilized invertase shown in Figure 01 and 02. The figure 01 shows the activity of 10 mg/mL of invertase immobilized on sugar cane bagasse using has substrate sucrose solutions in the concentrations of 5% (w/v), 10% (w/v) and 20% (w/v) at temperature of 50°C and pH 5.0. According to this value, the immobilized invertase hydrolyzed only 24%, 51% and 27% of sucrose solution at 5% (w/v), 10% (w/v) and 20% (w/v) respectively after 24h incubation. The figure 02 shows the hydrolysis of sucrose solutions (20% w/v, 40% w/v, 60% w/v and 80% w/v) using 30 mg/mL of immobilized invertase in sugar cane bagasse. The invertase activity was markedly increased in concentration of 30 mg/mL. This study showed that the highest activity was achieved when 20% sucrose solution was used as substrate, the enzyme hydrolyzed 100% sucrose until 12 hours incubation. The Souza et al, 1990 observed 100% of hydrolysis of sucrose solution (20% w/v) in 4 hours at 50°C.

MATERIAL AND METHODS

MATERIAL

Sugar cane bagasse and commercial grade sucrose were obtained from the local market, invertase (53 U/mg) and glutaraldehyde 25% were obtained Sigma (St. Louis, MO, USA). Other chemicals were from obtained from standard sources.

IMMOBILIZATION OF INVERTASE ON SUGAR CANE BAGASSE

Sugar cane bagasse was washed, dried and mixed with 2.5% of aqueous solution of glutaraldehyde for two hours followed by washing with distilled water and air dried. After this, the invertase (10 mg/mL and 30 mg/mL) dissolved in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5.0, was mixed, for two hours, with sugar cane bagasse treated with glutaraldehyde. The mixture was washed with saline 0.5 M followed by three washes with distilled water and used to hydrolysis of sucrose solution at different concentrations in 0.1 M of sodium citrate buffer pH 5.0 at 50°C during 24 h in batch system.

ANALYTICAL METHODS

Invertase activity was assayed at room temperature using samples of different concentrations sucrose solutions in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5.0. Reducing sugars were estimated use dinitrosalicylic acid reagent (Miller, 1959).

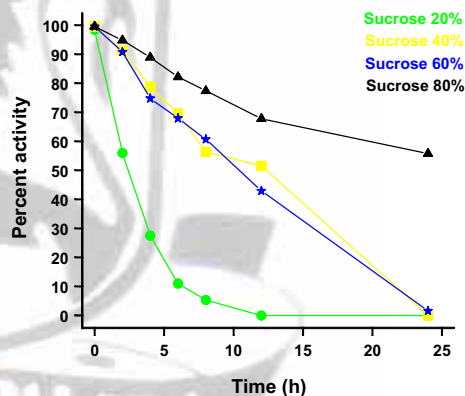


Figure 02. Effect of sucrose concentration on the immobilized invertase preparation. The immobilized invertase preparation (30mg/mL) was incubated at 50°C in 0.1M Sodium Citrate buffer, pH 5.0. Aliquots were removed and assayed for enzymatic activity.

REFERENCES

- Erginer, R.; Toppare, L.; Alkan, S.; Bakir, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. *Reactive & Functional Polymers* 45 (2000) 227-233.
- Miller, G.L. *Anal. Chem.* 1959, 31, 426-428.
- D'Souza SF. Surface immobilization of food relevant microbial cells through adhesion. *Food Biotechnol* 4: 373-82, 1990.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by: FACEPE, FINEP, UFRPE, BNB PADCT/CNPq and UFPE/LIKA. We would like to thank particularly to Sr. Miguel Arraes de Alencar, owner of the Factory of Sugar in Gameleira - Pernambuco, for gift us the sugar cane bagasse and molasses utilized in this work.

LIKA

Kluyveromyces marxianus CBS6556 Growth in Residues from a Sucrose-Rich Syrup Factory

Nogueira, A.C.F.¹; Bittencourt, K.F.M.¹; Maia, M.M.D.^{1,3}; Martins, D.B.G.¹;
Lima Filho, J.L.^{1,2}

¹LIKA, Universidade Federal de Pernambuco; ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco;

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Av. Moraes Rego, s/n CEP: 50.670-901 Recife – PE – Brasil. Fax +55 81 3271-8485

bruneska@lika.ufpe.br

INTRODUCTION

Scientific researches about single cell protein (SCP) production have been increased as an alternative for the environmental pollution caused by the discard of residues, a cheap source of carbon that can be used to the growth of microorganisms. This production have been employed mainly for animal food supplementation, and the food value and usefulness of SPC, from any source, is based on its composition of nutrients, vitamins, nitrogen, carbohydrates, fats, cell wall components, nucleic acids, protein concentration and amino acid profile. Production of SCP from yeasts are more interesting due to the low level of nucleic acid (9.7%), the concentration of B-complex group vitamins, high nitrogen rate, growth factors in their composition and for providing the well balanced amino acid quantities (Anupama & Ravindra, 2000). *Kluyveromyces marxianus* is a yeast that shows a great potential for industrial use. It is accepted as GRAS (generally regarded as safe) for the FDA (Food and Drug Administration) and has been used in the large scale production SPC from whey in France and EUA (Caballero et al., 1995; Bailey & Ollis, 1986). CBS 6556 strain has a high specific growth rate, short culture time, growth in high temperature (up to 45°C), wide range of pH and increased process productivity (see Table 01). Brazil is one of the most important producers of sugar cane in the world, and the sugar manufacturing results in some agro-industrial residues, like bagasse and molasse. The sucrose-rich syrup was produced in a sugar factory by additional steps of filtration with the purpose of obtain a clear and much pure product than the traditional procedures. Therefore, this process generates residues with high sugar concentration, responsible for high biological oxygen demand. The utilization of these residues for single cell protein production has been analyzed. The sugar cane industry generates many residues during the sugar cane manufacturing. The growth of *K. marxianus* have been studied by our group in different supplementation for the residue and for defined media, as an option for production and use of SCP in our region.

MATERIAL AND METHODS

Strains: *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 was used in this study due to its advantages when compared to *S. cerevisiae* (Table 01), and it maintenance was on criotubes at -70°C, as described by Sambrook et al, 1989.

Growth conditions: for the initial growth, one criotube - containing 10⁹ cells/mL - was inoculated in rich media with 2% sucrose at 30°C and 180rpm in rotary shaker. After 16 hours, the cells were harvested and inoculated at the initial concentration of 1,28 x 10⁹ cells/mL in 18 Erlenmeyer flasks, containing different compositions (Table 02). After 16 hours and 24 hours, samples were taken for quantification of cells and sugar consumption.

Cell growth: it was quantified using Neubauer chamber.

Sucrose determination: the samples were spin down and the supernatant was used for sucrose determination as described by Miller (1965), with minor modifications for sugar hydrolysis with 1N HCl heated at 100°C for 10 minutes and neutralized adding 1M NaOH, before the DNS procedure.

Physiological feature	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>
Maximum growth rate	0.53 h ⁻¹	0.89 h ⁻¹
Optimum temperature of growth	30°	40°
pH range	5.5 to 6.5	2.0 to 6.0
Carbon sources		
Lactose (whey)	-	+
Cellobiose	-	+
Xylose (hemicelulose)	-	+
Nitrogen sources	few	many
Affinity for sugars	low	high
Crabtree effect	+	-

Table 01. Physiological features of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*

Flask number	Yeast extract	Urea	Amonium Sulphate	Potassium Phosphate
1	0.25	0.5	-	0.5
2	0.25	-	0.5	0.5
3	0.25	0.5	-	1
4	0.25	-	0.5	1
5	0.25	1	-	1
6	0.25	-	1	1
7	0.25	1	-	0.5
8	0.25	-	1	0.5
9	0.5	1	-	1
10	0.5	-	1	1
11	0.5	1	-	0.5
12	0.5	-	1	0.5
13	0.5	0.5	-	0.5
14	0.5	-	0.5	0.5
15	0.5	0.5	-	1
16	0.5	-	0.5	1
17		YNB		
18		YPS		

Table 02. Supplementation (g/L) of the 18 flasks, containing 60g/L to sucrose, tested for the CBS6556 growth

REFERENCES

- ANUPAMA & RAVINDRA, P. *Biotechnology Advances*, v.18, p.459-479, 2000.
BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill International Editors, 2nd ed, 1986.
CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, F.G.; GARCIA-GARIBAY, M. AND GOMEZ-RUIZ, L. *Food Research International*, v.28, n.1, p.37-41 (1995)
GROOTWASSING, J.W.D. & FLEMING, S.E. *Enzyme and Microbial Technology*, v.2, p.45-53, 1980.
MILLER, G.L. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428.
MARTINS, D.B.G.; DE OLIVEIRA, J.A.; NOGUEIRA, A.C.F.; ARAÚJO, M.M.S.; LIMA FILHO, J.L. I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 2001.
SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, vols. 1, 2 and 3, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by: FACEPE, UFRPE, BNB PADCT/CNPq and UFPE/LIKA. We would like to thank particularly to Sr. Miguel Arraes de Alencar, owner of the Factory of Sugar in Gamelaire – Pernambuco, for kindly support and provide the sucrose-rich syrup utilized in this work.

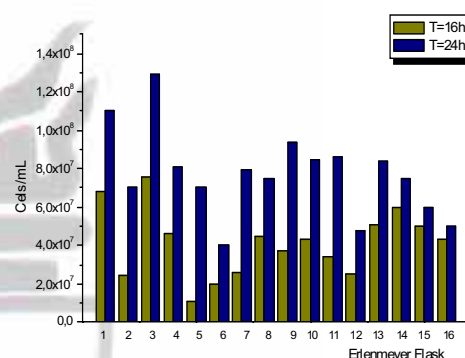


Figure 01. *K. marxianus* CBS6556 growth in 18 different media supplementations, after 16 and 24 hours of incubation at 28°C and 180rpm in rotary shaker

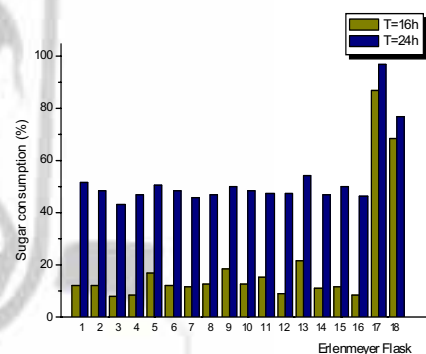


Figure 02. *K. marxianus* CBS6556 sucrose consumption during the growth in the 18 flasks.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of this work demonstrate that the CBS6556 can be used as a microorganism for SCP production growing in sucrose as carbon source. The growth in defined media containing 60g/L of sucrose, similar to the residues formulation, showed a good performance, but not so good as observed previously, using the own residue as carbon source, with a stronger supplementation in each flask. The growth in the laboratorial media was around 4x10⁸ cells/mL (data not shown), that is not too far from the growth obtained in the flasks 01 and 03 (Figure 01), which supplementation is rich in urea as nitrogen source, and lower rate of yeast extract – vitamins and growth factors source -. Despite of this behavior, the CBS6556 was able to metabolize 70% of the sucrose in the flask containing YPS – a rich media containing 2% of sucrose, and 90% from the YNBS flask, that contains a better supplementation than the other 16 flasks (Figure 02). This data can indicate that the residue has no toxic compounds for the cell growth. The lowest growth observed in the residue culture raised to 3x10⁸ cells/mL, and the stronger was above 1,4x10⁹ cells/mL; and the residual sugar was between 20% and 60% in most of the flasks (Martins et al, 2001) . The improvement of the biomass production can be done by different combinations of the fermentative parameters, already in testing phase in our laboratory.

LIKA

SBBq 2002

Kluyveromyces marxianus CBS6556 Growth Using “Coalho” and Ricotta Cheese Whey as Substrate for SCP Production

Mafra, M.F.; Martins, D.B.G.; Moraes Jr., M.A.; Lima Filho, J.L.

Universidade Federal de Pernambuco – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Setor de Biologia Molecular

bruneska@lika.ufpe.br

INTRODUCTION

Cheese whey is a polluting by-product of the dairy industry, and most of this residue is taken out *in natura*, which lead a high BOD demand due to the high concentration of lactose, about 5%. For each one kilogram of cheese, nine kilograms of whey is generated. Yeasts of the genus *Kluyveromyces* are of potential industrial use, and strains of *Kluyveromyces marxianus* have been considered the most adequate for bioconversion of lactose in whey mainly into biomass, for animal feed supplementation; and for β -galactosidase (lactase) production, enzyme used to reduce the lactose level in milk and derivatives for people with lactose intolerance (Berruga et al., 1997). *K. marxianus* CBS 6556 has a high specific growth rate, short culture time, growth in high temperature (up to 45°C), wide range of pH and increased process productivity (Grootwassig et al, 1980). This yeast has been used for the large scale production of single-cell protein (SCP) from whey in France and EUA (Bailey & Ollis, 1986). SCP is the manufacture of cell mass using microorganisms by culturing on abundantly available agricultural or industrial wastes. The food value and usefulness of SCP from any source is based on its composition of nutrients, vitamins, nitrogen, carbohydrates, fats, cell wall components, nucleic acids, protein concentration and amino acid profile. Production of SCP from yeasts are more viable due to the low level of nucleic acid (9.7%), the concentration of B-complex group vitamins, and for providing the well balanced amino acid composition. Specially for *K. marxianus* (*K. fragilis*), the growth in whey provided high crude protein, low ash content and the product was also rich in sulfur-containing amino acids (Anupama & Ravindra, 2000). The use of cheese whey for yeast growth, in our region, represents an important alternative for the biotreatment of the residue generated, avoiding the water and soil pollution. Our group studies the *K. marxianus* behavior in whey as substrate of growth, and defined medium for metabolic analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

Medium	Umg protein	Lactose Consumption (%)
CW 100%	15156,14	32,09
RW 100%	697,50	32,08
YNBL	4221,65	13,80
YPL	8902,21	94,56

Table 01. CBS6556 growth in different media after 16h.

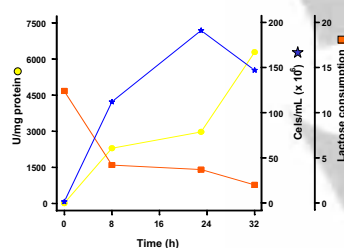


Figure 01. CBS6556 growth in YNBL containing 2% lactose

MATERIAL AND METHODS

Strains and growth conditions: *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 was used in this study, and its maintenance was on YPD agar slants which (2% dextrose, 0.5% yeast extract; 2% peptone; and 2% agar).

Growth medium: for the initial growth, a single colony was inoculated in YPD for 16 hours, at 30°C and 180rpm in rotary shaker. After 16 hours, the cells were harvested and inoculated at the initial concentration of 10⁶ cells/mL in four different media – YPL (rich media), YNBL (0,67% YNB and 2% Lactose), CW (“coalho” cheese whey) and the RW (ricotta cheese whey). The cheese whey were kindly supported by Cachoeirinha Cooperative, in Pernambuco. The cells grown in the conditions above, and at the indicated intervals, samples were taken aseptically for the determination of yeast counts, lactase activity, and sugar consumption.

Cell growth: it was quantified using Neubauer chamber.

Enzyme activity assay: the assay for determination of β -galactosidase enzyme activity was according to Ausubel, 1989; using ONPG (o-nitrophenyl-B-D-galactopyranoside) 8mg/ml as chromogenic substrate. Lactase activity was expressed as units (nmol of o-nitrophenol liberated per minute under standard conditions).

Lactose concentration: it was measured by the dinitrosalicylic acid reagent, for reducing sugar according to Miller, 1959; with minor modifications for lactose hydrolyses. The samples supernatant were treated with 1M HCL heated at 100°C for 10 minutes and neutralized with 1M NaOH before the DNS procedure.

Protein determination: the protein measurement was performed using Folin phenol reagent, as described in Lowry et al., 1965.

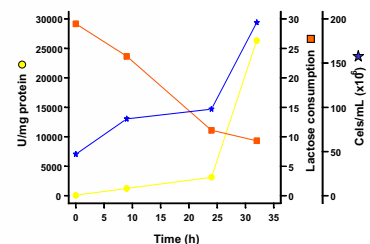


Figure02. CBS6556 growth in 50% “coalho”cheese whey

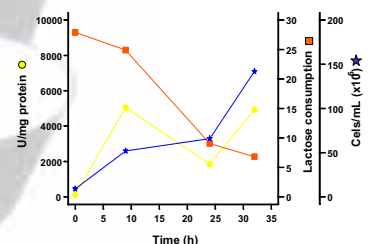


Figure 03. CBS6556 growth in 50% ricotta cheese whey

REFERENCES

- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D. AND SMITH, J.A. Current protocols in molecular biology, vols. 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 1989.
ANUPAMA & RAVINDRA, P. Biotechnology Advances, v.18, p.459-479, 2000.
BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical engineering fundamentals. McGraw-Hill International Editors, 2nd ed, 1986.
BERRUGA, M.I.; JASPE, A. AND SAN JOSE, C. International Biodeterioration & biodegradation. Vol.40, p.119-123, (1997).
CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, F.G.; GARCIA-GARIBAY, M. AND GOMEZ-RUIZ, L. Food Research International, v.28, n.1, p.37-41, (1995).
GROOTWASSING, J.W.D. & FLEMING, S.E. Enzyme and Microbial Technology, v.2, p.45-53, 1980.
LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Analytical Biochemistry V. 163, p. 265-275, 1961.
SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. Molecular cloning, a laboratory manual, vols. 1, 2 and 3, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989.
MILLER, G.L. Analytical Chemist. V.31, p.428-428.

FINANTIAL SUPPORT: FACEPE; CAPES; UFPE-LIKA

LIKA

SBBq 2002

ÁREA: BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION USING *Kluyveromyces marxianus* AND *Saccharomyces cerevisiae* GROWN IN RESIDUES FROM SUCROSE-RICH SYRUP FACTORY.

Martins, D.B.G¹; de Oliveira, L.A. ¹; Nogueira, A.C.F. ¹; Araújo, M. M. de S. ¹; Lima Filho, J.L.^{1,2}.

¹LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – Recife-PE Brasil; ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego, s/n 50670-901 Recife PE Brasil fax +55 2718485 e-mail: zeluiz@lika.ufpe.br.

Abstract

Advances in industrial biotechnology offer potential opportunities for development of new processes and economic utilization of agro-industrial residues. The sucrose-rich syrup or “syrup honey” is the last one product of a clear sugar cane production generated by two filtration steps, which results in more residues with high sugar concentration responsible for high biological oxygen demand. The single cell protein production has been an alternative to reduce the environmental pollutant from these residues. For this purpose, the yeasts are available they contain high nitrogen rate, a variety of vitamins, amino acids well balanced, growth factors in their composition, and they are normally considered safe for health. In this work, the growth of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, the most popular yeast used in brewer and baker processes, is compared to the growth of a *Kluyveromyces marxianus* strain, which is recognized to be more advantageous in fermentative process regard to the first one. Our results show that the *K. marxianus* strain has a better growth in these residues than the *S. cerevisiae* strain; and is able to convert more than 80% of the sugar contained, with apparently no catabolic repression caused by high sugar concentration. This analysis suggests that the *Kluyveromyces marxianus* can be used as protein source for SCP production using “syrup honey” filtration residue as growth medium.

Key words: SCP; *Kluyveromyces*; *Saccharomyces*; biomass

Introduction

Brazil is one of the world's largest producer of sugar cane, with 5 millions of hec planted in 1997, with production of 65 tons/hect. In 1999/2000, the total production was around 300 millions of sugar cane and 381 millions of sacks of sugar [1], [2]. This process generates many wastes like “bagasse” or chaff 40-50%, filter mud 0.9%, molasses 2.7% and alcohol sludge 0.3% [3]. Sugarcane bagasse, is the major by-product of the sugar cane industry, and it contains about 50% cellulose, 25% hemicellulose and 25% lignin [4]. It's usually burned to supply energy,

ANEXO I

COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO CIENTÍFICO

----- Original Message -----

From: <processbiochemistry@blueyonder.co.uk>

To: <bruneska@lika.ufpe.br>

Sent: Saturday, January 17, 2004 3:43 PM

Subject: Confirmation new paper No. bruneska.AT.lika.ufpe.br/20040117/1 submitted to PRBI

> This is an automated email

> 17-Jan-2004

>

> Dear Mrs Bruneska,

>

>

> Thank you for submitting the paper entitled:

>

> 'Partitioning of α -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems'

>

> to Process Biochemistry

>

> The e-submission number for your paper is

> PRBI_bruneska.AT.lika.ufpe.br_20040117/1

>

> Your paper will be evaluated as quickly as possible;

> and we will be in touch again in due course.

>

> Please note: The PDF file you have submitted is sufficient for review purposes only.

> If your paper is accepted for publication you will be asked to upload the

> file

> in an editable file format.

> Elsevier's preferred file formats are MS Word, Word Perfect or LaTeX.

>

> Professor C.M. Brown,

> Editor-in-Chief Process Biochemistry,

> International Centre for Brewing and Distilling,

> Heriot-Watt University,

> Riccarton,

> Edinburgh EH14 4AS, UK

> Tel: +44 131 539 9031,

> Fax: +44 131 539 9031,

> Email: processbiochemistry@blueyonder.co.uk

>

>

ANEXO II

REGRAS DAS REVISTAS INDEXADAS

BIOTECHNOLOGY LETTERS

GUIDELINES

GUIDANCE NOTES FOR THE PREPARATION OF PAPERS BEING SUBMITTED FOR PUBLICATION IN *BIOTECHNOLOGY LETTERS*

We urge you to read these Notes very carefully. We need your paper to have the minimum number of errors so that it can be published immediately. The Editors cannot undertake extensive rewriting of poorly presented papers as their priority is for the rapid publication of high quality papers.

You will need to produce a perfect copy of your paper that is ready for printing from your electronic submission. No editing can be done on the final manuscript. Detailed *Instructions to Authors* are available on the website:

<http://www.springeronline.com/journal/10529>

If your first language is not English, we would urge you to seek help from someone who is fluent in English. The use of professional paper writing agencies is strongly encouraged where authors may have major problems in writing their work clearly or concisely. It will also help if you consult a recent issue of the Journal to see our preferred style of writing and presentation of information. This is now available online at :

<http://www.springeronline.com/journal/10529>

General points

Overall length The maximum length of a published paper in the Journal is usually six (6) *printed* pages. Papers having over 12 *typed* pages of text are usually considered too long. Tables, Figures and the Reference List all count towards the final length of your paper. Please ensure that **all** pages are numbered. All material must be in double-spaced typing; this included Tables and Figure legends.

Supplementary Information Lengthy information that is not essential for the understanding of the paper can be given as Supplementary Tables and Figures. These are printed on-line but will not be printed in the Journal. Authors should consider using these for information such as DNA and protein sequences, identification of new microbial isolates, ancillary data about protocols or minor results. These will not be counted as part of the length of the final paper.

Section of the Journal Please specify on the title page the section to which your paper should be allocated.

Title This must be accurate and informative; please avoid phrases such as “The effect of”, “Studies on.....,” etc. Specify clearly any organism or cell system you have used. We do not publish papers that have a sequence number.

Key words: up to 6 words suitable for indexing should be given. N.B. Use *words* not abbreviations.

Before the Abstract, please leave 4 cm space for insertion of dates of receipt and acceptance of your paper.

Abstract This must be both informative and concise. Avoid phrases such as “This paper describes” or “These experiments are evaluated here...”. Also do not use words such as “high”, “low”, “rapid”, “slow”, “increased” etc. but give the key quantitative results; what may be a “high” activity to you may be a moderate one to someone else. **Such words have no scientific value.** All non-

standard abbreviations must be defined. Do not include references unless essential and then the reference must be given in full. The overall length should not exceed 100 words.

Introduction Please keep this as short as possible (usually no more than 300-350 words); do not give a mini-review of the literature; give key references to recent, relevant publications; historical references are rarely useful. Space is precious - keep it for your results.

Methods Give concise information concerning the key protocols only. Avoid describing routine or trivial matters such as how the micro-organisms are maintained, how and when the cultures were sampled. The latter information is easily understood from the tables or figures. Suppliers of chemicals and manufacturers of equipment should only be given if these are not generally available or are in some way unusual or are crucial for success. Suppliers such as Sigma, Aldrich etc. are given without addresses. There is no need to give references to standard procedures, e.g. Lowry or Bradford methods etc. We encourage authors to place as much relevant information in the footnotes and legends of their tables and figures to increase understanding of these illustrations.

Results Results, given in tables and figures, do not need to be described again at length in the text. This is a very common fault and leads to Results sections often being far too long. Focus the reader's attention on your key results. The *Results* and *Discussion* sections may be combined. An ideal Results section might simply say: "The results are given in Tables 1 and 2 and further details are shown in Figures 1 and 2."

Discussion Put your key results into the context of current information but do not repeat a description of the results. Also avoid unwarranted or unsupported speculations. Keep your discussion short and focused on explaining the significance of your results.

Tables These should be given, together with their title, on a separate sheet for each table at the end of text after the References. Their lay-out should be suitable for printing as either single column (7.5 cm) or double column (16 cm) width. Avoid vertical rulings (lines) and keep horizontal rulings to a minimum. Please ensure 100% relative values are also given as absolute values in a footnote.

Do not quote values beyond the inherent accuracy (or inaccuracy) of the methods. Again, this is a very common fault. State clearly how many times each complete experiment was done and how many times each individual determination was done. Understanding the likely reproducibility of your measurements is of crucial concern. Data given in Tables and Figures should be understandable without recourse to the text: you can add key information regarding experimental procedures in footnotes and omit such details from the Methods section. It is essential that all non-standard abbreviations used in the Table are re-defined.

Indicate the approximate position of the Table by a note in the margin of the text.

Figures Make sure these will reproduce satisfactorily: lines, symbols and lettering must be clear, of equal blackness and are thick enough to be easily read when reproduced at a single column width (7.5 cm). Please do not use color when the figure can be easily printed in black and white. Please give adequate footnotes so that figures can be understood without recourse to the text. Please ensure 100% relative values of data are also given in absolute values in the legend.

Each figure should be given on a separate sheet with their number clearly stated. The captions should be grouped together and placed on another separate sheet that follows the Tables but precedes the Figures. If a figure requires to be printed in color, please advise the Editor why this is justified.

Please indicate the approximate position for the figure with a note given in the margin of the text.

Photographs These must be high-contrast and be in black and white that will show the key details when printed. Colour photographs may be printed without charge if, in the opinion of the Editor, colour will enhance the illustration. Do not copy print-outs from recorders or computers attached to instruments - these are rarely of publishable quality. Do not scan-in material as it is impossible for such material to be processed later. Avoid making black and white copies from coloured photographs - these do not have sufficient contrast. For photomicrographs, scale bars must be added on the print itself and the size of the bar then given in the legend.

Gene sequences These are no longer published by the Journal and should be lodged in an appropriate database. The accession number of the sequence should be quoted in the manuscript. If parts of these sequences are relevant to the paper, then they may be given as Supplementary Data – see above.

References No more than 15 are usually necessary; if more, then you are probably over-reviewing the past literature and please consider if the number can be decreased. Please use the correct style - see Notes to Authors. **Please ensure the references in the text match the ones given in the list.**

General Points (common errors all too frequently made).

Reproducibility of results The number of times a complete experiment has been carried out, together with the number of samples analysed on each occasion, should be indicated either in the Methods or in the Tables or Figures. The range of values should be indicated by $\pm$ in a table, or by an error-bar in a figure.

Accuracy All values should be quoted within the experimental accuracy of the protocol being used, taking into account the type of analysis and instrumentation being used. Please avoid the use of non-significant zeros in numerical values (e.g. write 10 g glucose NOT 10.0 g glucose, or even 10.00 g glucose, etc.).

Please avoid using 'reduce' when you mean 'decrease' or 'lower' particularly in the context where there may be (bio)chemical reductions.

Units: please always leave a space between the number and the unit; e.g. 100 mM **not** 100mM.

Do not use a fold-decrease (e.g. a 5-fold decrease) as the meaning of this is never clear. Use % decrease instead.

Avoid 'ppm' and where possible '%' but give as mg/l (mg l^{-1}) or g/l (g l^{-1}) etc. SI units and permitted alternatives are to be used. Use correct abbreviations for standard units: h not hr, g not gr etc. If you use %, always state if this is v/v, w/v, v/w or w/w. Abbreviations are never made plural. Do not use normalities for solutions; molarities (M) should be given instead. Please note that the journal prefers the use of M (and mM etc.) rather than mol l^{-1} or mmol l^{-1} .

Avoid redundant words or phrases such as 'a blue colour', 'at a temperature of 30°C', 'at a wavelength of 340 nm', 'at a concentration of 2 g/l etc.' (Blue is a colour and does not need stating!) Also phrases such as 'It was observed that...' or 'It can be seen from Table 2 that...' are also redundant and may, without exception, be deleted or decreased to 'Table 2 shows that...'.

Concentrations are given as 10 g ethanol/l not 10 g/l ethanol; 5 mg kanamycin/ml etc. Mixtures of solvents are given as chloroform/methanol (2:1, v/v) or methanol/water/acetic acid (60:35:5, by vol.).

For presentation of cell growth, please give as dry weight values for microbes, plant and animal cell cultures. Values as wet weights are not acceptable. Optical densities (or turbidities) must be converted to the corresponding cell dry wt values. Please do not say “exponential (or logarithmic) growth” unless you have clear data to support that such rates were achieved. Most frequently, arithmetic growth rates are attained in most cell growth systems in spite of many statements to the contrary.

Please use non-standard abbreviations sparingly: these confuse more often than not and are unlikely to save more than 1 or 2 lines of space in the whole paper. Only use if they are replacing lengthy phrases or chemical names.

Please, please check your paper very carefully. We print directly from the copy you have supplied. Editors miss mistakes like everyone else, so please check your paper carefully. PROOFS ARE NOT SUPPLIED TO AUTHORS. We want to produce a perfect paper for you and for you to be completely satisfied with the way it has been published.

FINALLY: PLEASE USE THE ACCOMPANYING AUTHORS' CHECKLIST TO ENSURE THAT YOU HAVE FOLLOWED ALL OUR INSTRUCTIONS.

January 2009

Biotechnology Letters

Executive Editor: C. Ratledge

ISSN: 0141-5492 (print version)

ISSN: 1573-6776 (electronic version)

Journal no. 10529

Springer Netherlands

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

GUIDELINES

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY GUIDELINES TO AUTHORS

SCOPE OF THE JOURNAL

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short Communication: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

Mini-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

SUBMISSION OF A MANUSCRIPT

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

PUBLICATION OF A MANUSCRIPT

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication. Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

PREPARATION OF A MANUSCRIPT

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*

- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results
- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 50 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For **mini-reviews**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission. Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and *mini-reviews* consist of 20 printed pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too. Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper. Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

Resumo is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the *Resumo* for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work. Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text. The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list. Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing “personal communication” or “unpublished data” are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are “accepted for publication” or “in press” are acceptable. However, references of papers that are “submitted” or “in preparation” are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).

PROCESS BIOCHEMISTRY

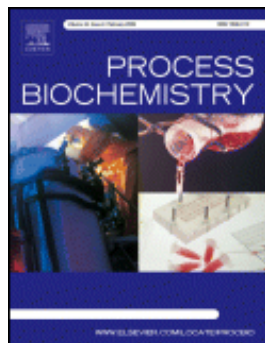
GUIDELINES



<http://www.elsevier.com>

[Browse Journals](#) > [Process Biochemistry home](#) > Guide For Authors

Process Biochemistry



ISSN: 1359-5113

Imprint: ELSEVIER

Actions

-  [Submit Article](#)
-  [Order Journal](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Recommend to Friend](#)
-  [Bookmark this Page](#)

Statistics

Impact Factor: 2.336

Issues per year: 12

Additional Information

- [Related Publications](#)
- [Editorial Board](#)
- [Contact the Publisher](#)
-  [Login to Editorial System](#)
-  [Publishing Ethics Resource Kit \(PERK\)](#)

Readers

- [Order Journal](#)
-  [Access Full-Text](#)
-  [Free Sample Issue](#)

-  [Volume/Issue Alert](#)
- [Free Tables of contents and abstracts](#)

Authors

- [Authors Home](#)
-  [Submit an Article](#)
-  [Track Your Accepted Articles](#)
- [Guide for Authors](#)
- [Artwork instructions](#)
- [Authors Rights](#)
- [Funding Bodies Compliance](#)

Librarians

- [Librarians Home](#)
- [Ordering Information and Dispatch Dates](#)
- [Abstracting/Indexing](#)

Editors

- [Editors Home](#)
-  [Article Tracking for Editors](#)
- [Ethics Questions \(PERK\)](#)

Reviewers

- [Reviewers Home](#)

Advertisers/Sponsors

- [Reprints Information](#)

Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics

covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

Format and type of manuscripts

Process Biochemistry Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. For experimental design results, as they are scientifically non exploitable, 3D figures are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrammes. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

[4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.

[5] Curtin CD. Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.

[6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. *Jpn. Patent*. JP 05260-966. 92.03.24.

[7] Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.

[8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing : For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit  <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions 

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal homepage at <http://www.elsevier.com/locate/prbi>. The journal homepage also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature. For more information, visit <http://www.elsevier.com/trackarticle>. **Process Biochemistry has no page charges**

This is a spacer...

[↑ Top of Page](#)