

LYGIA FÁTIMA DA MATA CORREA

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO, CARACTERÍSTICAS  
BIOQUÍMICO-MORFOLÓGICAS DE ENVELHECIMENTO E  
PERFIL METABÓLICO DE CULTURAS CONTÍNUAS DE  
*Kluyveromyces lactis* SOB LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

LYGIA FÁTIMA DA MATA CORREA

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO, CARACTERÍSTICAS  
BIOQUÍMICO-MORFOLÓGICAS DE ENVELHECIMENTO E  
PERFIL METABÓLICO DE CULTURAS CONTÍNUAS DE  
*Kluyveromyces lactis* SOB LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO**

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

APROVADA: 31 de maio de 2011.

---

Prof<sup>a</sup>. Marlene Isabel Vargas Vitoria  
(Coorientadora)

---

Prof. Frederico José Vieira Passos

---

Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

---

Dr. Olindo Assis Martins Filho

---

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

*Dedico às quatro pilstras da minha vida:*  
*Deus,*  
*Família,*  
*Amigos,*  
*Comunidade.*

***“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”***  
***(Sócrates)***

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante toda minha trajetória pessoal, familiar, acadêmica, profissional e como cidadã, ao lidar com pessoas e instituições que foram fundamentais para essa construção. Consciente de todos os conhecimentos e experiências essenciais adquiridos, é necessário e primordial expressar meu eterno agradecimento:

A Deus, por ter me concedido inteligência, perseverança, força, determinação e fé em cada etapa deste trabalho. *“Tudo posso nAquele que me fortalece!” (Filipenses 4, 13)*

Aos meus pais, Dilermando e Maria Anunciação, pelo incentivo, apoio, exemplo, amor e compreensão nos momentos de ausência. A vocês, meu eterno amor e gratidão!

Aos meus irmãos, Antônio Henrique e Ana Flávia, pelo carinho e pela força.

A José Cícero (Gut), pelo imenso amor e carinho, cuidado e estímulo, paciência e compreensão, dedicação, presença e cumplicidade em todos os momentos.

Aos meus demais familiares, em especial à Tia Lia, pela dedicação, preocupação e orações imprescindíveis; e à Vovó Ana (*in memoriam*), que durante o percurso desta obra retornou à casa do Pai, deixando além da imensa saudade, o exemplo de doçura, alegria, generosidade, coragem, perseverança e fidelidade a Deus.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação, confiança e amizade desde a iniciação científica.

Às professoras Marlene Isabel Vargas Vilorio e Maria Cristina Dantas Vanetti, pela colaboração e sugestões oportunas.

Aos pesquisadores Andréa Teixeira de Carvalho e Olindo Assis Martins Filho (Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ Minas/BH), pela disponibilidade em ajudar e pela fundamental colaboração científica para a realização das análises de citometria de fluxo.

Ao pesquisador Silas G. Villas-Bôas (Universidade de Auckland/Nova Zelândia), pela prestatividade e primordial colaboração científica para a realização das análises de GC-MS.

Ao professor visitante Dr. Thomas C. R. Williams, pelo auxílio, apoio, atenção e paciência com as análises de LC-MS.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e aos professores Adriano Nunes (Departamento de Biologia Vegetal), Fabyano Fonseca (Departamento de Estatística) e Frederico Passos (Departamento de Tecnologia de Alimentos), pelos valorosos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Valdilene (Val), Júlio (Deodeo), Lívia (Dona Lívia), Talita (Talitinha), Raphael (Hermano), Caio (Zé do Caio), Robson (Zé do Robson), Marcelo (Goiano), Rafael (Rafa), Tatiana (Tati), Cristiane (Cris), Luna, ao professor Antônio Galvão e à Dra. Virgínia Chaves, pela eterna amizade, pela descontração em meio a tantas responsabilidades, pelo companheirismo e pelas contribuições para esta pesquisa.

Aos amigos dos Laboratórios de Genética de Microrganismos, Microbiologia Industrial, Associações Micorrízicas, Microbiologia Ambiental, Ecologia Microbiana, Microbiologia de Anaeróbios, Microbiologia de Alimentos, pela agradável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração e à Tiza (Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ Minas/BH), pela prestatividade e auxílio com as análises de citometria de fluxo.

Aos colegas dos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas - Proteínas, Proteômica, Enzimologia e Análises Bioquímicas (BIOAGRO/UFV) e ao professor Everaldo de Barros, pela colaboração com os métodos de separação de proteínas por eletroforese em gel de gradiente, concentração e quantificação de proteínas e nitrogênio.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM/UFV) - FINEP, FAPEMIG, CNPq, pela utilização da infraestrutura para obtenção das imagens por microscopia confocal.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol/UFV) - FINEP, FAPEMIG, CNPq, pela utilização do Q-TOF para as análises dos metabólitos por LC-MS.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, que contribuíram para a execução deste trabalho, pela disponibilidade, amizade e serviços prestados.

Às companheiras de república: Rejane, Aline, Izadora e Adriana, pela paciência, amizade e pela alegre convivência que nos torna quase uma família.

A todos os meus irmãos em Cristo, amigos e colegas, principalmente à Geni, Vó Zizica, Vô Zé e D. Imaculada, pela acolhida, pela preciosa amizade, pelo carinho e pelas poderosas orações.

Enfim, minha sincera gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram ou colaboraram para a realização deste trabalho. Sem vocês, nada disto seria possível. Portanto, a ausência de qualquer um (a) mudaria o rumo de toda a minha história!

## BIOGRAFIA

LYGIA FÁTIMA DA MATA CORREA, filha de Dilermando Correa Cunha e Maria Anunciação Mata Correa, nasceu em 11 de maio de 1982, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2000, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, em 28 de janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em 16 de março de 2007, com o título de *Magister Scientiae*.

Em março de 2007, iniciou o curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 31 de maio de 2011.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
<b>CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura.....</b>	<b>4</b>
Referências Bibliográficas.....	17
<b>CAPÍTULO 2: Caracterização fisiológica de <i>Kluyveromyces lactis</i> em cultura contínua sob limitação por nitrogênio.....</b>	<b>22</b>
1. Introdução.....	23
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Micro-organismo e condições de cultivo.....	25
2.2. Crescimento de <i>Kluyveromyces lactis</i> em diferentes fontes de nitrogênio, pH e concentração de células (biomassa).....	25
2.3. Cultivo em batelada.....	26
2.4. Cinética de crescimento.....	26
2.5. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) e constante de saturação ( $K_s$ ).....	26
2.6. Cultivo contínuo e limitação nutricional por nitrogênio.....	26
2.7. Relação entre absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) e massa celular seca.....	27
2.8. Determinação do tempo de geração ( $T_g$ ) e tempo de residência ( $\tau$ ).....	28
2.9. Análise de proteínas extracelulares.....	28
2.10. Análises estatísticas.....	29
3. Resultados.....	30
3.1. Estabelecimento de condições fisiológicas de limitação por nitrogênio em culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	30



3.2. Caracterização fisiológica de culturas contínuas de <i>Kluyveromyces lactis</i> sob limitação por nitrogênio.....	35
4. Discussão.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	44
6. Anexos.....	46
<b>CAPÍTULO 3: Características de envelhecimento em culturas contínuas de <i>Kluyveromyces lactis</i> sob limitação por nitrogênio.....</b>	<b>53</b>
1. Introdução.....	54
2. Material e Métodos.....	57
2.1. Viabilidade celular de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	57
2.2. Avaliação de características de envelhecimento em células de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	57
2.2.1. Cicatrizes celulares.....	58
2.2.2. Concentração de quitina.....	58
2.2.3. Detecção de espécies reativas de oxigênio .....	59
2.2.4. Apoptose por externalização de fosfatidilserina.....	60
2.2.5. Apoptose por condensação da cromatina e fragmentação do DNA.....	60
2.2.6. Técnica de TUNEL ( <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling</i> ).....	61
2.2.7. Eletroforese em campo pulsado ( <i>pulsed field</i> ).....	62
2.2.8. Determinação das dimensões celulares de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	63
2.3. Citometria de fluxo.....	63
2.4. Microscopia de fluorescência.....	64
2.5. Microscopia confocal.....	64
2.6. Detecção de alcoóis aromáticos em culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	64
2.7. Análise estatística.....	65

3. Resultados.....	66
3.1. Envelhecimento de <i>Kluyveromyces lactis</i> em culturas contínuas sob limitação por nitrogênio.....	66
3.1.1. Viabilidade celular de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	66
3.1.2. Cicatrizes celulares e concentração de quitina de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	69
3.1.3. Detecção de espécies reativas de oxigênio em culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	74
3.1.4. Apoptose por externalização de fosfatidilserina, condensação e fragmentação do DNA em células de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	78
3.1.5. Dimensões celulares de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	87
3.1.6. Produção de alcoóis aromáticos por culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	88
4. Discussão.....	90
5. Referências Bibliográficas.....	94
6. Anexos.....	98
<b>CAPÍTULO 4: Perfil metabólico extracelular de culturas contínuas de <i>Kluyveromyces lactis</i> sob limitação por nitrogênio.....</b>	<b>101</b>
1. Introdução.....	102
2. Material e Métodos.....	104
2.1. Análise de substrato e produtos do metabolismo de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	104
2.2. Análise de metabólitos extracelulares de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	105
2.2.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS).....	105
2.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).....	106
2.3. Análises de dados.....	106
3. Resultados e Discussão.....	108

3.1. Consumo de glicose e formação de produtos do metabolismo em culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	108
3.2. Perfil metabólico extracelular de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> por LC-MS.....	111
3.3. Perfil metabólico extracelular de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> por GC-MS.....	120
4. Referências Bibliográficas.....	126
5. Anexos.....	129
CONCLUSÕES GERAIS.....	133

## RESUMO

CORREA, Lygia Fátima da Mata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Cinética de crescimento, características bioquímico-morfológicas de envelhecimento e perfil metabólico de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis* sob limitação por nitrogênio.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Coorientadores: Marlene Isabel Vargas Viloria e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Para investigar o envelhecimento de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, sob limitação nutricional por nitrogênio, visando à identificação de sinais extracelulares que desencadeiam tal processo ou em resposta às condições limitantes do meio, culturas de *K. lactis* foram fisiologicamente caracterizadas sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio. As condições fisiológicas de crescimento e de limitação por nitrogênio para as culturas contínuas de *K. lactis* foram estabelecidas em meio YCB suplementado com sulfato de amônio ( $\mu_{\text{máx.}} = 0,40 \text{ h}^{-1}$  e  $K_s = 0,091 \text{ mM}$ ), tamponado com tampão fosfato (pH 5,5 - 6,0) e com fluxo de alimentação, que resultasse em velocidades de crescimento de 0,01 a  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , correspondendo à limitação por nitrogênio. Sob as menores velocidades de crescimento, as culturas de *K. lactis*, em regime permanente, apresentaram maior tempo de geração, tempo de residência, produção de biomassa e de proteínas extracelulares. Além disso, as populações de células das culturas de *K. lactis*, sob as menores velocidades de crescimento apresentaram menor viabilidade, maior porcentagem de cicatrizes, maior concentração de N-acetilglicosamina, maior acúmulo de ROS, maior porcentagem de apoptose por externalização da fosfatidilserina e fragmentação do DNA, maior dimensão celular, maior produção de triptofol, feniletanol e menor produção de etanol e glicerol, sugerindo que culturas contínuas de *K. lactis*, sob baixas velocidades de crescimento, sejam favoráveis para o estudo da fisiologia do processo de envelhecimento de leveduras. O perfil metabólico extracelular das culturas de *K. lactis* permitiu constatar 19 fragmentos de metabólitos diferentes, por LC-MS. Nas menores velocidades de crescimento, os fragmentos 299, 321, 349, 485, 507, 543, 583 e 756 foram menos abundantes, enquanto os fragmentos 432, 656 e 714 foram mais abundantes. O agrupamento hierárquico dos fragmentos permitiu constatar 7 grupos

constituídos por diferentes fragmentos ( $m/z$ ) e o agrupamento dos tratamentos possibilitou a obtenção de 3 grupos. Porém, não foi possível realizar a correlação dos fragmentos dos metabólitos detectados com o envelhecimento celular de *K. lactis* ou com a própria condição de limitação por nitrogênio, uma vez que a identificação desses metabólitos extracelulares não foi concluída. Por GC-MS, foram identificados 28 metabólitos extracelulares (aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos) secretados pelas culturas de *K. lactis*. Alguns metabólitos foram diferencialmente mais abundantes nas menores velocidades de crescimento, enquanto outros foram mais abundantes nas maiores velocidades de crescimento. Diferentes vias metabólicas foram relacionadas com a produção dos metabólitos extracelulares identificados, porém uma análise mais minuciosa deve ser feita no sentido de correlacioná-las com possíveis sinais extracelulares que possam desencadear o processo de envelhecimento ou que possam estar envolvidos com as condições limitantes do meio.

## ABSTRACT

CORREA, Lygia Fátima da Mata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2011. **Growth kinetics, biochemical-morphological characteristics of aging and metabolic profile of *Kluyveromyces lactis* continuous cultures under nitrogen limitation.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Advisers: Marlene Isabel Vargas Viloria and Maria Cristina Dantas Vanetti.

In order to investigate aging of *Kluyveromyces lactis* continuous cultures under nitrogen nutritional limitation, to the identification of extracellular signals that trigger this process or in response to limiting conditions of the medium, *K. lactis* cultures were physiologically characterized under different levels of nitrogen limitation. Physiological growth and nitrogen limitation conditions for *K. lactis* continuous cultures were established in YCB supplemented with ammonium sulfate ( $\mu_{\max} = 0.40 \text{ h}^{-1}$  and  $K_s = 0.091 \text{ mM}$ ) buffered with phosphate buffer (pH 5.5 - 6.0 ) and with flux which resulted in growth rates of 0.01 to  $0.2 \text{ h}^{-1}$ , corresponding to nitrogen limitation. Under the lowest growth rates, *K. lactis* cultures in steady state showed greater generation time, residence time, biomass and extracellular protein. In addition, populations of cells in *K. lactis* cultures under the lowest growth rates showed lower viability, higher bud scars percentage, higher N-acetylglucosamine concentration, greater ROS accumulation, higher percentage of apoptosis by phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation, larger cellular dimension, higher production of tryptophol, phenylethanol and lower production of ethanol and glycerol. These data suggest that *K. lactis* continuous cultures operated at low growth rates could be suitable for studying the physiology of aging in yeasts. The extracellular metabolic profiling of *K. lactis* cultures revealed 19 fragments of different metabolites. At lower growth rates, the fragments 299, 321, 349, 485, 507, 543, 583 and 756 were less abundant while the fragments 432, 656 and 714 were more abundant. The hierarchical clustering of the fragments comprised five groups consisting of different fragments (m/z) and the clustering of treatments allowed to obtaining three groups. However, it was not possible to make the fragments correlation of the metabolites detected with the *K. lactis* cellular aging or with the nitrogen limitation condition in itself, since the identification of these extracellular metabolites was not completed. For GC-MS

were identified 28 extracellular metabolites (amino acids, organic acids and fatty acids) secreted by *K. lactis* cultures. Some metabolites were differentially more abundant in lower growth rates while others were more abundant in higher growth rates. Different metabolic pathways were related to the production of extracellular metabolites identified, but a detailed analysis should be done to correlate them with possible extracellular signals that trigger the aging process or that may be involved with the limiting conditions of the medium.

## INTRODUÇÃO GERAL

Culturas de leveduras, em grande escala, são úteis para a produção de biomoléculas de interesse industrial, tais como vitaminas, peptídeos, proteínas, etanol e outros metabólitos. Entretanto, essas culturas perdem atividade metabólica e viabilidade, em períodos curtos de tempo. Além do interesse biotecnológico, as leveduras têm sido utilizadas como modelo de células eucarióticas para estudos do processo de envelhecimento. Algumas alterações morfológicas observadas nas células de leveduras ao longo do seu tempo de vida e que caracterizam o envelhecimento destas são: maiores dimensões celulares; maior número de cicatrizes e maior concentração de quitina na parede celular; acúmulo intracelular de ROS; produção de alcoóis aromáticos; superfície celular enrugada e presença de características morfológicas de apoptose.

Além disso, a levedura *Kluyveromyces lactis* tem se destacado como um modelo alternativo à *Saccharomyces cerevisiae*, para os estudos relacionados ao processo de envelhecimento, além de outros estudos fisiológicos e genéticos, por apresentar metabolismo predominantemente oxidativo, assemelhando-se mais aos eucariotos superiores.

O *status* nutricional do meio é um importante fator que está relacionado ao envelhecimento. Em leveduras, condições de limitação nutricional, por redução do conteúdo de fontes de carbono ou nitrogênio no meio, prolongam a meia vida das células e, em consequência, retardam o seu envelhecimento. Alguns estudos já demonstraram que a redução da concentração de glicose ou aminoácidos no meio de cultura aumenta a longevidade das células de leveduras. No entanto, estudos prévios realizados no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos demonstraram que culturas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas sob baixas velocidades de crescimento e sob limitação por sulfato de amônio, apresentam células com características de envelhecimento, incluindo a detecção de marcas de apoptose, sem indução a sua por substâncias, como ácido acético e peróxido de hidrogênio.

Muitos micro-organismos produzem sinais extracelulares associados à às condições do meio. Alcoóis aromáticos, tais como triptofol, feniletanol, tirosol e farnesol são alguns desses sinais extracelulares, cuja síntese é modulada



pela disponibilidade nutricional, além de apresentarem importante papel no processo de envelhecimento das células de leveduras. É possível que esses e outros sinais extracelulares, tais como peptídeos, proteínas ou outros metabólitos sejam produzidos por *K. lactis*, em resposta a condições limitantes do meio ou ao processo de envelhecimento celular. Assim, a caracterização do perfil metabólico de *K. lactis*, pode revelar metabólitos específicos de interesse biotecnológico e relacionados a estas respostas fisiológicas da levedura, quando em condições de limitação nutricional por nitrogênio ou para sinalizar o processo de envelhecimento.

Portanto, esse trabalho teve como finalidade investigar o envelhecimento de células de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas sob diferentes velocidades de crescimento e em função de condições de limitação nutricional por nitrogênio, visando à identificação de sinais extracelulares que desencadeiam tal processo ou em resposta às condições limitantes do meio. Para isso, foram realizados: o estabelecimento de condições de limitação nutricional por nitrogênio e a caracterização fisiológica de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio; a avaliação da presença de características de envelhecimento, tais como viabilidade celular, cicatrizes celulares e concentração de quitina, espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose por externalização da fosfatidilserina e por fragmentação do DNA, dimensões celulares e detecção de alcoóis aromáticos, em culturas contínuas de *K. lactis*, nas mesmas condições limitantes mencionadas; além da caracterização do perfil metabólico extracelular das mesmas culturas contínuas da referida levedura.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar o envelhecimento de culturas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas sob diferentes velocidades de crescimento e em função de condições de limitação por nitrogênio, visando à identificação de sinais extracelulares que desencadeiam tal processo ou em resposta às condições limitantes do meio.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros cinéticos de culturas de *K. lactis* em função de diferentes fontes de nitrogênio, pH e biomassa;
- Estabelecer as condições de limitação nutricional por nitrogênio e caracterizar fisiologicamente culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio;
- Analisar características de envelhecimento, tais como viabilidade celular, cicatrizes celulares e concentração de quitina, espécies reativas de oxigênio, apoptose por externalização da fosfatidilserina e por fragmentação do DNA, dimensões celulares e detecção de alcoóis aromáticos, em células de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio;
- Caracterizar o perfil metabólico extracelular de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio, e propor o (s) sinal (ais) que possam desencadear o processo de envelhecimento ou em resposta às condições limitantes do meio.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

Inicialmente, a levedura *Kluyveromyces lactis* foi denominada *Saccharomyces lactis*, mas em 1965 foi agrupada no gênero *Kluyveromyces*, sendo então renomeada *Kluyveromyces lactis*. Em 1984, a classificação dada à espécie foi *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, pertencente à família Saccharomycetaceae e subfamília Saccharomycetoideae. Atualmente, no entanto, o nome *Kluyveromyces lactis* é utilizado (BONEKAMP & OOSTEROM, 1994; WOLF, 1996). Trata-se de um ascomiceto unicelular, de forma esférica a oval, morfológicamente semelhante e evolutivamente muito próxima à levedura *Saccharomyces cerevisiae* (WÉSOLOWSKI *et al.*, 1996). Essa proximidade evolutiva permite a comparação de genes ortólogos entre as duas leveduras (SCHAFFRATH & BREUNING, 2000). O sequenciamento do genoma de *K. lactis* foi recentemente concluído e encontra-se disponível no banco de dados *Génolevures* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt>). Esse banco de dados permite o alinhamento dos genes de várias leveduras não-*Saccharomyces* com o genoma referência de *S. cerevisiae*.

Os estudos sobre *K. lactis* iniciaram, em 1950, com interesses puramente acadêmicos, como a regulação do metabolismo de carboidratos, em eucariotos unicelulares. Desde então, os interesses industriais e aplicados por esse organismo têm crescido de forma considerável (FUKUHARA, 2006). *K. lactis* apresenta grande potencial biotecnológico e tem sido estudada como um modelo de célula eucariótica em estudos fisiológicos e genéticos. A capacidade de *K. lactis* assimilar uma grande variedade de compostos carbônicos, dentre eles pentoses e dissacarídeos, faz desta levedura um interessante micro-organismo para estudos de biorremediação e na metabolização de substratos ou resíduos de baixo valor econômico. Por ser capaz de assimilar lactose como fonte de carbono e energia (SCHAFFRATH & BREUNING, 2000), *K. lactis* consegue crescer em soro de leite, um substrato de baixo valor econômico que é gerado em grandes volumes pela indústria de queijo. O soro de leite é obtido após a precipitação da caseína do leite, durante a fabricação de queijos. Representa cerca de 85 a 95% do volume do leite e retém cerca de 55% dos seus nutrientes, sendo estes lactose, proteínas solúveis, lipídeos, sais minerais e vitaminas (SISO, 1996). As proteínas contidas no soro de leite possuem valores nutricionais e funcionais significantes para a indústria alimentícia, podendo ser aproveitadas após a separação e a concentração por

ultrafiltração. Contudo, a lactose e sais minerais contidos no soro são frequentemente descartados no efluente, o que provoca graves problemas ambientais (SISO, 1996). Assim, o uso do soro de leite como meio de cultura microbiano desponta como proposta para o seu aproveitamento e a levedura *K. lactis* destaca-se como micro-organismo candidato para sua utilização (SCHAFFRATH & BREUNING, 2000). Por apresentar essa característica, *K. lactis* tem sido também utilizada na produção da enzima  $\beta$ -galactosidase para a hidrólise da lactose do leite e seus derivados (LOUVEL *et al.*, 1996), da mesma forma que vem se estabelecendo como hospedeira de um sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas (TOKUNAGA *et al.*, 1997; SALIOLA *et al.*, 1999; SCHAFFRATH & BREUNING, 2000).

Enquanto *S. cerevisiae* apresenta metabolismo oxirredutivo (fermentativo) predominante, em *K. lactis* o metabolismo oxidativo (respiratório) prevalece, assemelhando-se mais aos eucariotos superiores. Essa característica fisiológica qualifica *K. lactis* como um modelo alternativo à *S. cerevisiae*, para estudos relacionados ao processo de envelhecimento, além de outros estudos fisiológicos e genéticos (KURTZMAN & FELL, 1998; POLIAKOVÁ *et al.*, 2002).

Apesar de serem amplamente utilizadas em fermentações, em grande escala, as leveduras possuem um tempo de vida determinado. É relatado que entre duas a quatro semanas sejam necessárias a renovação das culturas nesses processos, uma vez que ocorre uma considerável redução da atividade metabólica e da viabilidade das células desses micro-organismos (WALKER, 1998).

Em linhas gerais, o processo de envelhecimento refere-se às alterações bioquímicas e fisiológicas, ocorridas nos organismos ao longo do seu tempo de vida, as quais afetam o metabolismo destes. Trata-se de um processo estritamente relacionado e dependente do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2002).

O ciclo celular de leveduras é similar ao de eucariotos superiores. Divide-se em: intérfase (fase G1, S, G2), caracterizada pelo aumento da massa celular e duplicação do DNA; e fase M (mitose), onde ocorre a segregação do material genético duplicado entre célula-mãe e célula-filha, seguida da citocinese. A fase G1, onde a célula irá crescer até atingir tamanho suficiente

para iniciar o ciclo celular, é o intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA. Na fase S ocorre a duplicação do DNA. A fase G2 é o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose celular. Tais fases são fundamentais para permitir que o sistema de controle do ciclo celular seja regulado por sinais provenientes do meio ambiente. Na fase M, quando a célula entra em mitose, há a divisão do seu material genético, DNA, entre célula-mãe e célula-filha. Uma diferença entre leveduras e outras células eucarióticas é que a membrana nuclear em leveduras permanece intacta. Depois que o DNA é dividido entre célula-mãe e célula-filha, ocorre a citocinese (STREIBLOVÁ, 1984; WALKER, 1998, ALBERTS *et al.*, 2002).

O sistema de controle do ciclo celular baseia-se em duas famílias de proteínas que são chaves para o seu funcionamento. A primeira é a família das quinases dependentes de ciclina (Cdk), as quais fosforilam resíduos de serinas e treoninas em proteínas selecionadas. A menos que essas proteíno-quinases estejam firmemente ligadas a ciclinas, elas não possuem nenhuma atividade quinase. A segunda é uma família de proteínas ativadoras especializadas, chamadas ciclinas, que se ligam às moléculas de Cdk, controlando sua capacidade de fosforilar proteínas-alvo. Existem quatro classes de ciclinas, cada uma definida pelo estágio do ciclo celular na qual ela se liga a Cdk. Três dessas classes são requeridas para leveduras: G1/S ciclinas, que se ligam a Cdk no final de G1 e promovem a replicação do DNA; S-ciclinas, que se ligam a Cdk durante a fase S e são requeridas para o início da replicação do DNA; M-ciclinas, que promovem os eventos da mitose. Para a maioria das células eucarióticas, uma quarta classe de ciclinas, as G1-ciclinas, auxiliam na fase G1. As ciclinas passam por um ciclo de síntese e degradação em cada ciclo celular. A formação, ativação e a separação dos complexos ciclina-Cdk são fundamentais para a coordenação do ciclo celular, regulando seus principais eventos: replicação do DNA, mitose e citocinese (ALBERTS *et al.*, 2002).

Em células de leveduras, uma única proteína Cdk (Cdc 28) se liga a todas as classes de ciclinas (Cln 1, Cln 2, Cln 3, Clb 1, Clb 2, Clb 3, Clb 4, Clb 5, Clb 6) e dirige todos os eventos do ciclo celular, ao trocar de ciclina em diferentes estágios do ciclo celular. Na fase G1, Cdc 28 associa-se a Cln 3 e posteriormente a Cln 2 e Cln 1, cujos complexos promovem o crescimento celular. Na fase S, Cdc 28 associa-se a Clb 5 e Clb 6, controlando a replicação

do DNA. A formação dos complexos Cdc 28 e Clb 1, Clb 2, Clb 3 e Clb 4 dirigem o processo de mitose - fase M, do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2002; DICKINSON & SCHWEIZER *et al.*, 2004).

Geralmente, as leveduras cuja divisão celular ocorre por brotamento, tais como as dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, produzem um número limitado de brotos por célula, na faixa de 15 a 25. Nesse sentido, os estudos relacionados ao processo de envelhecimento celular, em leveduras, têm sido investigados. Dois mecanismos fisiológicos distintos caracterizam o envelhecimento nesses micro-organismos: o envelhecimento replicativo e o envelhecimento cronológico (JAZWINSKI, 2002; JAZWINSKI, 2004; POWERS, 2006; KAEBERLEIN *et al.*, 2007). O envelhecimento replicativo refere-se ao número de células-filhas que uma célula-mãe consegue produzir, ao longo do seu tempo de vida, na fase exponencial de crescimento (JAZWINSKI, 2004). A cada divisão celular, a célula-mãe torna-se uma geração mais velha do que as células-filhas emergentes (STEINKRAUS *et al.*, 2008). MÜLLER e colaboradores (1980) concluíram que o número de divisões celulares, e não o tempo necessário para ser completado um único ciclo celular, é o que determina o *lifespan* de leveduras. Por outro lado, o envelhecimento cronológico refere-se ao tempo que uma população de células permanece viável, após atingir a fase estacionária (KAEBERLEIN *et al.*, 2007).

Algumas alterações morfológicas e bioquímicas relatadas em células de leveduras ao longo do seu tempo de vida e que caracterizam o envelhecimento das mesmas são: as células senescentes apresentam dimensões maiores do que as células mais jovens (JAZWINSKI, 2005); o número de cicatrizes, que são marcas deixadas na superfície celular a cada broto gerado, é maior e, em consequência disso, o conteúdo de quitina na parede celular é aumentado (KELLER *et al.*, 1971); maior é o tempo para se completar o ciclo celular; presença de superfície celular enrugada; acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio; produção de alcoóis aromáticos, e presença de

características morfológicas de apoptose (JAZWINSKI, 2002; ZHANG, 2002; WINTER, 2004; CHEN & FINK, 2006; SEVERIN *et al.*, 2008).

Apoptose é um tipo de morte celular que possui importante papel em diversos processos fisiológicos, em eucariotos superiores, tais como: na embriogênese e na organogênese, no colapso endometrial durante a menstruação, durante a metamorfose do girino para sapo, na reposição fisiológica de tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (ALBERTS *et al.*, 2002). Até quinze anos atrás, esse tipo de morte celular não havia sido reportado para organismos unicelulares, como leveduras. Entretanto, a descoberta de um fenótipo apoptótico em uma linhagem de *S. cerevisiae*, apresentando mutação no gene do ciclo celular CDC48, proporcionou o início das investigações científicas de tal processo em eucariotos unicelulares (MADEO *et al.*, 1997). Uma vez que muitos detalhes sobre o processo de apoptose e sua regulação em eucariotos multicelulares necessitam ser melhor elucidados e esclarecidos, se faz conveniente o estudo em um modelo mais simples de organismo. Dessa forma, leveduras têm sido investigadas como organismos promissores para esses estudos, fornecendo um entendimento melhor da fisiologia e genética do processo de apoptose, além da sua regulação no contexto de neoplasias, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas e do envelhecimento (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010). Durante os últimos anos, cientistas têm identificado reguladores de apoptose em humanos, plantas e fungos filamentosos, utilizando *S. cerevisiae* (MADEO *et al.*, 1997, 2002 e 2004). Em leveduras, a presença de características morfológicas de apoptose representa uma das últimas alterações celulares retratadas pelo envelhecimento das mesmas (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010).

A proteína caspase 1 de leveduras (Yca1) tem sido descrita por estar envolvida no processo de apoptose em leveduras (SHEMAROVA *et al.*, 2010). Trata-se de uma cisteíno-protease de 52 kDa que possui homologia estrutural com caspases de mamíferos, demonstrando atividade enzimática, pela clivagem de proteínas em leveduras, principalmente proteínas que apresentam resíduos de ácido aspártico (VACHOVÁ & PALKOVÁ, 2007; SHEMAROVA *et*



*al.*, 2010). Yca1 auxilia no processo de morte celular programada em culturas replicativa e cronologicamente envelhecidas, possuindo papel fisiológico na eliminação de células velhas em uma população de leveduras (MADEO *et al.*, 2002).

Vários sinais extracelulares e intracelulares desencadeiam a cascata proteolítica mediada por Yca1. Esses sinais são proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax, Dap3, Mec1; condições de estresse oxidativo, causadas por peróxido de hidrogênio ou ácido acético, que provocam a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) - ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, ocasionando danos às proteínas, lipídeos das membranas e ácidos nucleicos das células; choque térmico; envelhecimento replicativo ou cronológico da célula; dentre outros (MADEO *et al.*, 1999 e 2004; BÜTTNER *et al.*, 2006; MAZZONI & FALCONE, 2008). Tais fatores convergem, em uma via comum, para a formação de ROS, que ativam a caspase 1. Assim, as características morfológicas de apoptose que são geradas, em consequência da ativação de Yca1, são: externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (MADEO *et al.*, 1997; LUDOVICO *et al.*, 2001; LAUN *et al.*, 2001; HERKER, *et al.*, 2004).

O estado fisiológico de uma cultura microbiana é caracterizado pela composição intracelular de macromoléculas e pela velocidade de crescimento que o meio determina. Quando leveduras são cultivadas sob adequadas condições nutricionais, em batelada, elas aumentam inicialmente sua população a uma velocidade máxima característica daquelas condições. Porém, em determinado ponto, o crescimento populacional torna-se restrito por mudanças do meio, impostas pelo próprio crescimento microbiano (WALKER, 1998). Em função de tais mudanças no meio e na cultura, durante o cultivo do microrganismo, é estabelecida uma curva de crescimento com propriedades fisiológicas distintas nas fases: lag, exponencial ou log, de desaceleração, estacionária e de morte (GRIFFIN *et al.*, 1994). A fase lag consiste no período requerido para que as células se adaptem ao meio ao qual foram inoculadas. As células reorganizam a sua constituição molecular e seu metabolismo é adaptado às novas condições de crescimento, ocorrendo intensa atividade

metabólica. Na fase log, a população de células se multiplica exponencialmente com uma velocidade específica de crescimento máxima, cujo valor depende do micro-organismo e das condições de crescimento. Os sistemas metabólicos das células operam, portanto, com eficiência e taxas máximas. Se todos os requerimentos para esse crescimento são favoráveis, durante um intervalo de tempo, espera-se que o aumento na biomassa seja proporcional à concentração de células presentes no meio. Antecedendo a fase estacionária, a população de células passa por uma fase intermediária, chamada de desaceleração, onde a velocidade específica de crescimento varia entre o valor máximo e zero. Após certo tempo crescendo exponencialmente, sem limitação, um ou mais substratos podem alcançar concentrações baixas ou produtos metabólicos tóxicos produzidos pelas células podem atingir concentrações altas o suficiente para não permitir um crescimento pleno, reduzindo assim a velocidade específica de crescimento da célula até a paralisação do crescimento, quando a cultura entra na fase estacionária. Na fase estacionária, a população de células apresenta uma biomassa com valor relativamente constante e a velocidade específica de crescimento tende a zero. Grande parte da energia produzida pelas células é direcionada para a sua manutenção no ambiente adverso. Após prolongado período na fase estacionária, as células morrem e sofrem autólise, em consequência do esgotamento dos nutrientes disponíveis e/ou acúmulo de produtos tóxicos no meio, caracterizando assim a fase de morte, onde o número de células viáveis diminui consideravelmente (MOAT & FOSTER, 1995). Portanto, a condição do crescimento em batelada implica em variações no meio e na população com o tempo.

MONOD (1949) foi o primeiro a descrever a velocidade específica de crescimento como função da concentração de substrato, a partir da seguinte equação:  $\mu = \mu_{\text{máx.}} \cdot [S] / (K_s + [S])$ , onde  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento,  $[S]$  é a concentração do substrato limitante e  $K_s$  é a constante de afinidade da célula microbiana pelo substrato limitante (BAILEY & OLLIS, 1986). Este é ainda hoje um modelo que descreve o crescimento microbiano e tem aplicação prática para estudos referentes, dentre outros, aos processos de transporte e competição microbiana, em ecossistemas naturais e artificiais, além de estudos relacionados à disponibilidade de nutrientes no meio.

O sistema de cultivo contínuo opera na fase de desaceleração do crescimento de uma cultura cultivada em batelada, entre a velocidade de crescimento máxima da fase exponencial e a velocidade nula da fase estacionária, e mantém condições físico-químicas constantes, sendo útil em estudos sobre limitação nutricional e diferentes estados fisiológicos da célula. A fase de desaceleração é caracterizada por um estado fisiológico, onde já foi relatado: declínio da replicação do DNA genômico, indução de proteínas de estresse, aumento no estoque de carboidratos, indução e repressão de genes específicos relacionados à carência nutricional (RIOU *et al.*, 1997). Essa fase do crescimento coincide com aquela referente à resposta global diante de condições limitantes do meio e reflete a fisiologia em que a célula aciona a expressão de genes que codificam proteínas que permitem explorar melhor os recursos do meio e, conseqüentemente, exibir o máximo de rendimento de determinados produtos metabólicos (NEIDHART *et al.*, 1990; MOAT & FOSTER, 1995). Em cultivo contínuo, a população de células cresce em diferentes velocidades de crescimento, de acordo com o fluxo de alimentação do meio, uma vez que a velocidade específica de crescimento é numericamente igual à taxa de diluição da cultura, isto é,  $\mu = D = F/V$  (onde D corresponde à taxa de diluição; F ao fluxo de alimentação e V ao volume de trabalho no biorreator). A velocidade específica de crescimento pode ser em função de um ou mais fatores nutricionais que limitam o crescimento. Uma vez estabelecido o fluxo de alimentação, na cultura contínua, é necessário um número de gerações, que para *K. lactis* está na ordem de 8 a 10 gerações, para que o regime permanente seja estabelecido. Nas condições de regime permanente (*steady state*), tem-se um sistema em que os parâmetros da cultura são constantes, como concentração de substratos/produtos e massa celular. É esperado que as células apresentem o mesmo estado fisiológico, constituindo uma população tão homogênea quanto possível (ATKINSON, 1991; WALKER, 1999).

O *status* nutricional do meio é um importante fator que está relacionado ao envelhecimento. WINTER (2004) observou que *S. cerevisiae*, sob baixas taxas de crescimento e menor disponibilidade de nutrientes no meio, induz o metabolismo respiratório. O metabolismo respiratório provoca acúmulo de NAD<sup>+</sup> no interior celular, o que ativa a enzima Sir2 dependente de NAD<sup>+</sup>, que é

uma histona desacetilase (BARROS *et al.*, 2004). A remoção de grupos acetil das histonas por Sir2, desencadeia um maior número de regiões transcricionalmente inativas do DNA, sendo esse processo denominado silenciamento (GUARENTE, 2006). O processo de silenciamento proporciona uma maior estabilidade genômica, devido à menor formação de círculos de DNA ribossomal extracromossomal (ERCs), os quais interrompem o processo de replicação do DNA, impedindo o prosseguimento do ciclo celular. Assim, a longevidade é prolongada e, conseqüentemente, o processo de envelhecimento é retardado (Figura 1). Por outro lado, em altas taxas de crescimento e maior disponibilidade de nutrientes no meio, o metabolismo fermentativo é induzido por *S. cerevisiae*. Assim, há menor acúmulo de NAD<sup>+</sup> intracelularmente, o que reduz a atividade da enzima Sir2. Dessa forma, a estabilidade genômica é reduzida, devido à formação de ERCs, diminuindo, por sua vez, a longevidade e acelerando, portanto, o processo de envelhecimento nas células (Figura 2).

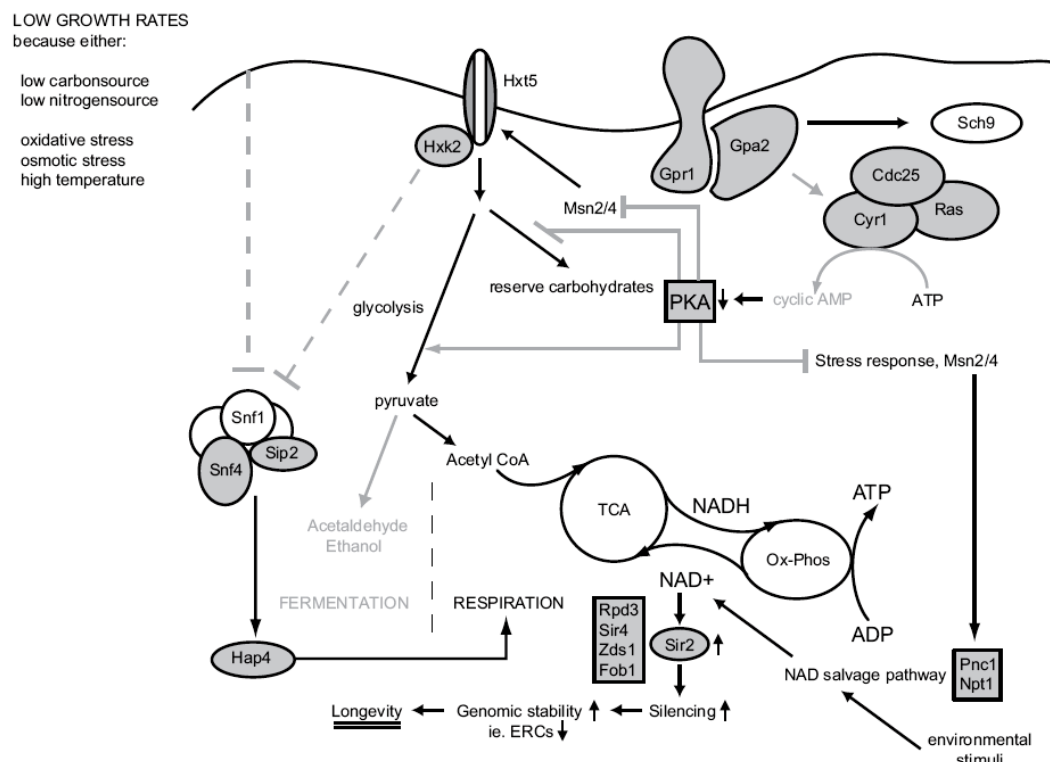


Figura 1: Via de longevidade de *Saccharomyces cerevisiae* sob baixas taxas de crescimento (WINTER, 2004).

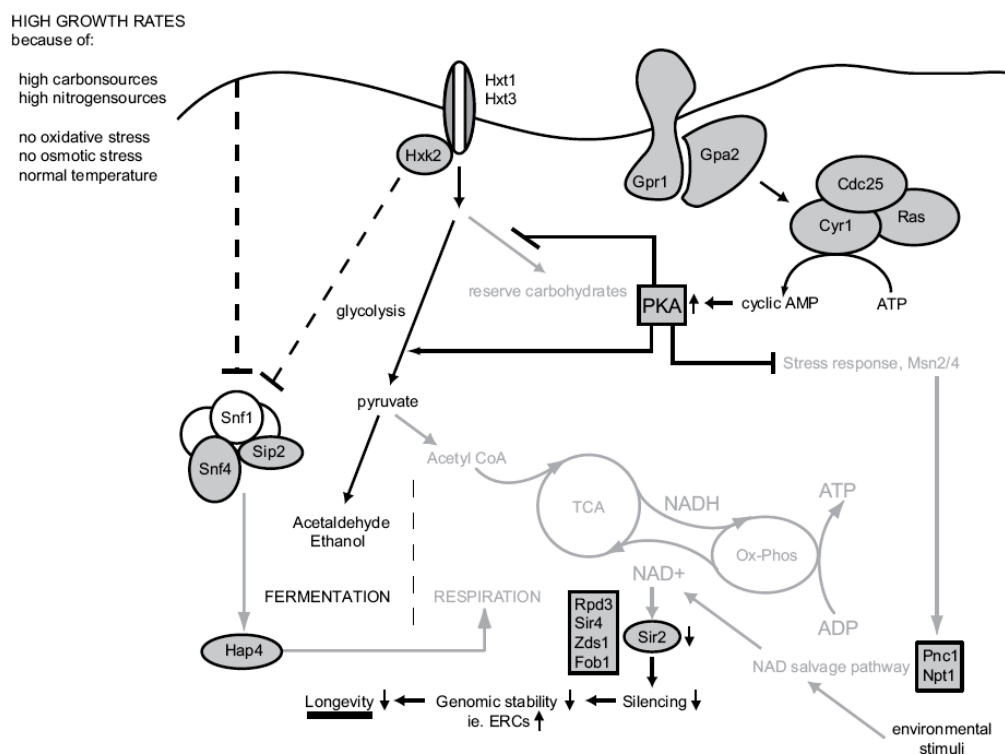


Figura 2: Via de longevidade de *Saccharomyces cerevisiae* sob altas taxas de crescimento (WINTER, 2004).

A restrição nutricional é uma condição experimental bem estabelecida que desacelera o processo de envelhecimento e prolonga o tempo de vida médio de uma ampla variedade de organismos. Alguns estudos em leveduras relatam que condições de restrição nutricional, por redução da concentração de fontes de carbono ou nitrogênio no meio, prolongam a meia vida das células e, em consequência, retardam o seu envelhecimento (JIANG *et al.*, 2000). A redução da concentração de glicose ou aminoácidos no meio de cultura aumenta a longevidade das células de leveduras (GUARENTE *et al.*, 2002; DILOVA *et al.*, 2007). Quando *S. cerevisiae* foi cultivada na presença de 0,5 % e 2,0 % de glicose, a longevidade das células foi maior em 0,5 % de glicose. Nessa condição, a atividade de Sir2 dependente de NAD<sup>+</sup> foi aumentada (LIN *et al.*, 2002; GUARENTE, 2005). A limitação por aminoácidos, glutamina ou asparagina, também aumentam a longevidade de culturas de *S. cerevisiae*, desacelerando o processo de envelhecimento cronológico e replicativo das células (JIANG *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2007). No entanto, a presença de poliaminas, especificamente espermidina, putrescina e espermina, no meio

suprime o fenótipo necrótico durante o envelhecimento, sendo que a limitação desses compostos acelera o processo de envelhecimento em células de *S. cerevisiae* (SCHIPPER *et al.*, 2000). Vale ressaltar que poliaminas estão relacionadas com os processos de proliferação e morte celular, sendo que amônia e aminoácidos são fontes de nitrogênio precursoras desses compostos aminados (TABOR *et al.*, 1984; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2008).

Por outro lado, estudos realizados por CORRÊA (2007) demonstraram que culturas de *K. lactis* conduzidas sob baixas velocidades de crescimento e sob limitação por sulfato de amônio apresentam células com algumas características de envelhecimento. Nessas condições, as culturas de *K. lactis* apresentaram um acúmulo de células com maior concentração de quitina na parede celular, maiores dimensões celulares e a presença de características morfológicas de apoptose, sem a sua indução por substâncias, como ácido acético ou peróxido de hidrogênio.

Muitos micro-organismos produzem sinais extracelulares que podem estar associados às condições do meio em que se encontram. Culturas de *S. cerevisiae* e *Candida albicans*, sob condições limitantes de nitrogênio, liberam alcoóis aromáticos, tais como triptofol, feniletanol, tirosol e farnesol, no meio (CHEN & FINK, 2006; GHOSH *et al.*, 2008). Esses compostos servem como importantes moléculas regulatórias, cuja síntese é modulada pela disponibilidade nutricional, apresentando importante papel no processo de envelhecimento das células das leveduras (SEVERIN *et al.*, 2008; SHIRTLIFF *et al.*, 2009). É possível que outros sinais extracelulares, tais como peptídeos, proteínas ou outros metabólitos sejam produzidos por leveduras, em resposta a condições limitantes do meio ou ao processo de envelhecimento celular.

As mudanças globais no metabolismo, sob diferentes condições fisiológicas, podem ser acompanhadas pela caracterização do perfil metabólico, a partir da identificação e quantificação dos metabólitos produzidos (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). Assim, torna-se importante investigar e relacionar a fisiologia da célula ao conjunto de metabólitos das leveduras, especialmente ao de *K. lactis*. O perfil metabólico extracelular de *S. cerevisiae*, em diferentes fases de crescimento mostrou que as maiores diferenças quanto aos metabólitos foram detectadas na transição da fase exponencial para a fase estacionária do crescimento, ou seja, na fase de desaceleração (ALLEN *et al.*,

2003). Assim, a caracterização do perfil metabólico de leveduras, além de contribuir para o entendimento da resposta global a uma condição fisiológica, pode revelar, também, metabólitos de interesse biotecnológico e relacionados a respostas fisiológicas das leveduras, quando em condições de limitação nutricional por nitrogênio ou mesmo metabólitos que possam sinalizar o processo de envelhecimento, por exemplo.

Diante dessas considerações, o interesse em investigar o envelhecimento de culturas de *Kluyveromyces lactis* em função de condições fisiológicas de limitação nutricional por nitrogênio, visando a identificação de sinais extracelulares que desencadeiam tal processo ou em resposta às condições limitantes do meio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, BRUCE; BRAY, DENNIS; JOHNSON, ALEXANDER; [et al.]. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Ed. Garland Science, 4<sup>th</sup> Ed., 2002.

ALLEN, J; DAVEY, H. M.; BROADHURST, D; HEALD, J. K.; ROWLAND, J. J.; OLIVER, S. G.; KELL, D. B. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 692-696, 2003.

ATKINSON, B; MAVITUNA, F. **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook**. New York: M Stockton Press, 2<sup>nd</sup> Ed., 1991.

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw Hill Book Company, 2<sup>nd</sup> Ed., 1986.

BARROS, M. H.; BANDY, B.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n. 48, p. 49883-49888, 2004.

BONEKAMP, F. J. & OOSTEROM, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1-3, 1994.

BÜTTNER, S.; EISENBERG, T.; HERKER, E.; GUTIERREZ, D. C.; KROEMER, G; MADEO, F. Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. **The Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 4, p. 521-525, 2006.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BUTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, p. 763-773, 2010.

CHATTOPADHYAY, M. K.; PARK, M. H; TABOR, H. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. **PNAS**, v.105, n. 18, p. 6554-6559, 2008.

CHEN, H. & FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes & Development**, v. 20, p. 1150-1161, 2006.

CORRÊA, L. F. M. **Cinética de crescimento e longevidade de culturas de *Kluyveromyces lactis* sob estresse por nitrogênio**. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 50p., 2007 (Dissertação de Mestrado).

DICKINSON, J. R. & SCHWEIZER, M. S. **The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. CRC Press LLC, NY, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004.

DILOVA, I.; EASLON, E.; LIN, S. J. Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 752-767, 2007.



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

GHOSH, S.; KEBARA, B. W.; ATKIN, A. L.; NICKERSON, K. W. Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7211-7218, 2008.

GOMES, P; MARQUES, B. S.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; LEÃO, C. Low auxotrophy-complementing amino acid concentrations reduce yeast chronological life span. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 383-391, 2007.

GRIFFIN, H. D. **Fungal Physiology**. Second Edition, USA: Wiley-Liss Inc, 458 p., 1994.

GUARENTE, L.; LIN, S.; KAEBERLEIN, M.; ANDALIS, A. A.; STURTZ, L.A.; DEFOSSEZ, P.; CULOTTA, V. C.; FINK, G. R. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. **Nature**, v. 418, p. 344-348, 2002.

GUARENTE, L. Calorie restriction and SIR2 genes – Towards a mechanism. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 923-928, 2005.

GUARENTE, L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism and aging. **Genes & Development**, v. 15, p. 301-307, 2006.

HERKER, E.; JUNGWIRTH, H; BÜTTNER, S.; FEHR, M.; LEHMANN, K. A.; MALDENER, C.; SIGRIST, S.; WISSING, S.; FRÖHLICH, K.; MADEO, F. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 4, p. 501-507, 2004.

JAZWINSKI, S. M. Growing old: metabolic control and yeast aging. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 769-792, 2002.

JAZWINSKI, S. M. Yeast replicative life span – the mitochondrial connection. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 119-125, 2004.

JAZWINSKI, S. M. Yeast longevity and aging – the mitochondrial connection. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 243-248, 2005.

JIANG, J. C.; JARUGA E.; REPNEVSKAYA, M. V.; JAZWINSKI, S. M. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. **FASEB Journal**, v. 14, p. 2135-2137, 2000.

KAEBERLEIN, M.; BURTNER, C. R.; KENNEDY, B. K. Recent developments in yeast aging. **PLoS Genetics**, v. 3, p. 660-665, 2007.

KELLER, F. A. & CABIB, E. Chitin and Yeast Budding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 1, p. 160-166, 1971.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts: a Taxonomic Study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 4<sup>th</sup> Ed., 1998.

LAUN, P.; PICHOVA, A.; MADEO, F.; FUCHS, J.; ELLINGER, A.; KOHLWEIN, S.; DAWES, I.; FRÖHLICH, K.; BREITENBACH, M. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1166-1173, 2001.

LIN, S. J.; KAEBERLEIN, M.; ANDALIS, A. A.; STURTZ, L. A.; DEFOSSEZ, P. A.; CULOTTA, V. C.; FINK, G. R.; GUARENTE, L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. **Nature**, v. 418, n. 8, p. 344-348, 2002.

LOUVEL, M.; BREUNIG, K. D.; FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* – a review. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 139-188, 1996.

LUDOVICO, P.; SOUSA, M. J.; SILVA, M. T.; LEÃO, C.; CÔRTE-REAL, M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**, v. 147, p.2409-2415, 2001.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 3, p. 729-734, 1997.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S.J; WOLF, D.H.; FRÖHLICH, K. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, n. 4, p. 757-767, 1999.

MADEO, F.; ENGELHARDT, S.; HERKER, E.; LEHMANN, N.; MALDENER, C.; PROKSCH, A.; WISSING, S.; FRÖHLICH, K. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. **Current Genetic**, v. 41, p. 208-216, 2002.

MADEO, F.; HERKER, E; WISSING, S; JUNGWIRTH, H; EISENBERG, T; FRÖHLICH, K. Apoptosis in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 655-660, 2004.

MAZZONI, C. & FALCONE, C. Caspase-dependent apoptosis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 1320-1327, 2008.

MOAT, A. G. & FOSTER, J. W. **Microbial Physiology**. New York: Wiley-Liss, 3<sup>rd</sup> Ed., 1995.

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

MÜLLER, I.; ZIMMERMANN, M.; BECKER, D; FLOMER, M. Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 12, p. 47-52, 1980.

NEIDHART, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell - A Molecular Approach**. Ed. Publishers Sundeland, 1990.

POLIAKOVÁ, D.; SOKOLIKOVÁ, B.; KOLAROV, J.; SABOVÁ, L. The antiapoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub> prevents the cytotoxic effect of Bax, but not Bax-induced formation of reactive oxygen species, in *Kluyveromyces lactis*. **Microbiology**, v. 148, p. 2789-2795, 2002.

POWERS, R. W.; KAEBERLEIN, M.; CALDWELL, S. D.; KENNEDY, B. K.; FIELDS, S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. **Genes & Development**, v. 20, p. 174-184, 2006.

RIOU, C.; NICAUD, J. M.; BARRE, P.; GAILLARDIN, C. Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **Yeast**, v. 13, n. 1, p. 903-915, 1997.

SALIOLA, M.; MAZZONI, C.; SOLIMANDO, N.; CRISAM, A.; FALCONEM, C.; JUNG, G.; FLEER, R. Use of the *KIADH4* promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. **Applied in Environmental Microbiology**, v. 65, p. 53-60, 1999.

SCHAFFRATH, R. & BREUNING, K. D. Genetics and molecular physiology of yeast *Kluyveromyces lactis* – a review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 173-190, 2000.

SCHIPPER, R. G.; PENNING, L. C.; VERHOFSTAD, A. A. J. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? **Seminars in Cancer Biology**, v.55, p. 450-468, 2000.

SEVERIN, F. F.; MEER, M. V.; SMIRNOVA, E. A.; KNORRE, D. A.; SKULACHEV, V. P. Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 1350-1353, 2008.

SHEMAROVA, I. V. Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 341-353, 2010.

SHIRTLIFF, M. E.; KROM, B. P.; MEIJERING, R. A. M.; PETERS, B. M.; ZHU, J.; SCHEPER, M. A.; HARRIS, M. L.; JABRA-RIZK, M. A. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2392-2401, 2009.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey – a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

STEINKRAUS, K. A.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B. K. Replicative aging in yeast: the means to the end. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 24, p. 29-54, 2008.

STREIBLOVÁ, E. **The Microbial Cell Cycle**. CRC Press, Boca Raton, FL, 127 p., 1984.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 749-790, 1984.

TOKUNAGA, M.; ISHIBASHI, M.; TATSUDA, D.; TOKUNAGA, H. Secretion of  $\alpha$ -amylase from *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 13, p. 699-706, 1997.

VACHOVÁ, L. & PALKOVÁ, Z. Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 12-21, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613-646, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MOXLEY, J. F.; AKESSON, M.; STEPHANOPOULOS, G.; NIELSEN, J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 669-677, 2005.

WALKER, G. M. **Yeasts physiology and biotechnology**. Ed. John Wiley & Sons Ltd. New York. 1998.

WALKER, G. M. Synchronization of yeast cell populations. **Methods in Cell Science**, v. 21, p. 87-93, 1999.

WÉSOŁOWSKI, M. L., BREUNIG, K. D., FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis*, in **Nonconventional Yeasts in Biotechnology – A Handbook**. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, 1996.

WINTER, V. J. Slow growth, stress response and aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.16, p. 121-137, 2004.

WOLF, K. **Nonconventional Yeasts in Biotechnology – A Handbook**. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, 1996.

ZHANG, Y. & HERMAN, B. Ageing and apoptosis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 245-260, 2002.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Kluyveromyces lactis* EM CULTURA CONTÍNUA SOB LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO**

## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras ativam vias metabólicas e de sinalização específicas em resposta a condições de limitação nutricional, visando sua adaptação, manutenção e sobrevivência no meio (WASHBURN *et al.*, 1993; WERNER-WASHBURN *et al.*, 1996; WINDERICKX *et al.*, 2003). Condições de limitação nutricional podem revelar proteínas e metabólitos com potencial aplicabilidade em processos e produtos biotecnológicos, além de auxiliar no estabelecimento de mecanismos de regulação do metabolismo de leveduras.

Diferentemente do metabolismo sob limitação por carbono, cujas vias de sinalização envolvidas na regulação do processo são bem compreendidas, o metabolismo sob limitação por nitrogênio, não é tão conhecido em leveduras, principalmente em relação à *Kluyveromyces lactis*, a levedura alternativa à *Saccharomyces cerevisiae* em estudos básicos ou aplicados (SCHAFFRATH & BREUNING, 2000; MAGASANIK & KAISER, 2002; MAGASANIK, 2005).

Em *S. cerevisiae*, existe um sensor extracelular de amônia, Mep2, e um sensor de aminoácidos SPS, complexo multimérico composto pelas proteínas Ssy1, Ptr3 e Ssy5 (FORSBERG & LJUNGDAHL, 2001). Enquanto o transporte de amônia é mediado por três permeases, produtos dos genes MEP1, MEP2 e MEP3 (MAGASANIK & KAISER, 2002), o transporte de aminoácidos através da membrana plasmática é ativo, dirigido por gradiente de prótons, via permeases específicas aos diferentes aminoácidos (REGENBERG *et al.*, 1999). Em *K. lactis*, genes ortólogos aos de *S. cerevisiae* podem ser identificados (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt>).

A regulação do metabolismo de nitrogênio, determinado pelos genes transcritos e as enzimas envolvidas no metabolismo, ocorre em resposta à concentração e à qualidade da fonte de nitrogênio disponível (DICKINSON & SCHWEIZER, 2004). Os mecanismos e as vias de sinalização que geram e transmitem a informação do *status* nutricional do meio para a maquinaria celular, em leveduras, têm sido investigados. As células percebem as condições do meio com relação à disponibilidade de nutrientes (*sensing*), transmitem essa informação para o núcleo (sinalização) e promovem a expressão de genes específicos, em resposta a essas condições (tradução). Algumas respostas fisiológicas de leveduras, incluindo os gêneros

*Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, em condições limitantes de nitrogênio, envolvem o controle do crescimento, síntese de rRNA, biogênese de ribossomos, síntese de proteínas ribossomais e ciclo celular (ZAMAN *et al.*, 2008).

Uma etapa importante no estudo da caracterização fisiológica de leveduras associada à limitação por nitrogênio é o estabelecimento do crescimento das mesmas em função da concentração da fonte de nitrogênio específica. O sistema de cultura contínua, com o fluxo de alimentação controlando a entrada do fator nutricional limitante, permite de forma simples, mas precisa, avaliar as respostas fisiológicas associadas à concentração do nutriente em questão. Para *K. lactis* pouco é conhecido sobre as fontes de nitrogênio preferenciais ou os parâmetros cinéticos, como velocidade específica de crescimento e constante de saturação que regem a utilização dessas fontes.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi analisar a cinética de crescimento de *Kluyveromyces lactis* em função de diversas fontes de nitrogênio, além de estabelecer e caracterizar fisiologicamente culturas de *K. lactis*, sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismo e condições de cultivo

A levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2359, uma linhagem selvagem da coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, proveniente do Laboratoire de Génétique et Physiologie - Institut de Génétique et Microbiologie (Université Paris-Sud – Orsay/France) foi objeto de estudo neste trabalho. A cultura foi estocada em meio YCB (*Yeast Carbon Base*, Laboratórios Difco®, Detroit, EUA), acrescido de 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio), contendo 50 % de glicerol, a - 80 °C. Antes de ser usada como inóculo, a cultura foi ativada em 50 mL de YCB + 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e incubada a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 horas.

### 2.2. Crescimento de *Kluyveromyces lactis* em diferentes fontes de nitrogênio, pH e concentração de células (biomassa)

Para estabelecer as fontes preferenciais de nitrogênio e a condição de limitação nutricional, as culturas de *K. lactis*, previamente ativadas, foram inoculadas em meio YCB acrescido das seguintes fontes de nitrogênio, separadamente: sulfato de amônio e aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano, valina). As concentrações das fontes de nitrogênio utilizadas variaram entre 0,02 a 30 mM.

Para verificar a melhor condição de crescimento, considerando diferentes valores de pH, *K. lactis* foi cultivada em meio YCB acrescido de 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e tamponado com os seguintes sistemas tampão: acetato (pH 4), citrato (pH 3 e 5), fosfato (pH 6 e 7), Tris-HCl (pH 8), borato (pH 9) e carbonato (pH 10).

Para estabelecer a condição de melhor densidade populacional inicial, as culturas de *K. lactis* foram cultivadas em meio YCB com 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, apresentando absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) inicial de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0, cujos valores de biomassa são 0,017; 0,034; 0,068, 0,17; 0,34; 0,68 e 1,7 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.



### 2.3. Cultivo em batelada

Culturas de *K. lactis* foram cultivadas em batelada em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo um volume final de 50 mL de meio de cultura (YCB + 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio), nas diferentes condições previamente mencionadas (item 2.2). As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de uma hora até 10 horas de cultivo e uma medida adicional foi retirada com 24 horas de cultivo. Tais amostras foram lidas em espectrofotômetro, em absorvância a 600 nm, a fim de acompanhar o crescimento populacional da levedura. As amostras foram diluídas quando a densidade óptica ultrapassou o valor de 0,6.

### 2.4. Cinética de crescimento

A cinética de crescimento foi avaliada em função das diferentes concentrações de fontes de nitrogênio, pH e biomassa. Os gráficos foram construídos, com os valores logarítmicos neperianos da A<sub>600</sub> na ordenada *versus* tempo, em horas, na abscissa. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada como o coeficiente angular do melhor ajuste da regressão linear dos dados da fase de crescimento exponencial das culturas.

### 2.5. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) e constante de saturação ( $K_s$ )

Os parâmetros cinéticos  $\mu_{\text{máx.}}$  e  $K_s$  foram determinados, utilizando o programa Sigma Plot versão 10.0 (Systat Software Inc., Califórnia/USA), ao nível de 95 % de confiança. Os dados obtidos da velocidade específica de crescimento de *K. lactis* para cada concentração de fonte de nitrogênio foram ajustados ao modelo cinético, descrito por MONOD (1949), conforme a equação:  $\mu = (\mu_{\text{máx.}} * S) / (S * K_s)$ , onde  $\mu$  corresponde à velocidade específica de crescimento;  $\mu_{\text{máx.}}$ , à velocidade específica máxima de crescimento; S, à concentração da fonte de nitrogênio e  $K_s$ , à constante de saturação.

### 2.6. Cultivo contínuo e limitação nutricional por nitrogênio

A partir da determinação dos parâmetros cinéticos de *K. lactis* e para garantir densidade populacional mensurável e uniforme, sob limitação nutricional por nitrogênio, experimentos em cultura contínua foram realizados,

em duplicata, em fermentadores (biorreatores) montados com frasco jaquetado Wheaton de 0,5 L. Cada biorreator foi conectado a dois recipientes, sendo um de entrada de meio YCB (acrescido de 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e tamponado com 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 5,5) e outro de saída da cultura. Os fermentadores continham um volume de trabalho de 250 mL. As culturas, mantidas a 30 °C, foram homogeneizadas e aeradas por agitação magnética. Os fluxos de alimentação das culturas conduzidas foram: 0,05; 0,10; 0,13; 0,21; 0,36 e 0,84 mL/min., correspondendo às velocidades específicas de crescimento de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>, respectivamente. As culturas contínuas foram operadas por oito gerações, para estabelecer o regime permanente (*steady-state*). Amostras foram coletadas, em triplicata, representativas de cada condição de *steady-state*, durante 24 horas, para as posteriores análises das características de envelhecimento e do perfil metabólico de *K. lactis*.

## 2.7. Relação entre absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) e massa celular seca

Culturas de *K. lactis* foram ativadas conforme descrito no item 2.1. Para obter uma  $A_{600}$  inicial de 0,1, 100 mL de YCB + 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio foram inoculados com as culturas de *K. lactis* ativadas. Essas culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 horas. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 5000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. A massa celular obtida foi ressuspensa em 6 mL de água destilada estéril. Foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL da suspensão para determinação da massa celular seca, a 105 °C, por 24 horas. Amostras de 1 mL da suspensão de células foram utilizadas para a realização das seguintes diluições, em triplicata, 10<sup>-2</sup>, 2 x 10<sup>-2</sup>, 3 x 10<sup>-2</sup>, 4 x 10<sup>-2</sup>, 5 x 10<sup>-2</sup> e 6 x 10<sup>-2</sup>. A regressão linear entre a absorvância ( $A_{600}$ ) e a massa celular seca (mg.mL<sup>-1</sup>) permitiu a determinação da massa celular seca, correspondente a uma unidade de absorvância a 600 nm. Uma unidade de  $A_{600}$  mostrou ser equivalente a 0,319 mg.mL<sup>-1</sup> de massa celular seca de *K. lactis*, conforme determinado pela equação: massa seca (mg.mL<sup>-1</sup>) = ( $A_{600}$  + 0,0038)/3,1449 (Anexo 3).

## 2.8. Determinação do tempo de geração (T<sub>g</sub>) e tempo de residência (τ)

O tempo de geração (T<sub>g</sub>), ou seja, o tempo requerido para a duplicação da população de células das culturas contínuas de *K. lactis*, foi calculado pela razão entre o valor logarítmico neperiano de 2 (LN 2 = 0,693) e a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ).

O tempo de residência ( $\tau$ ), ou seja, o tempo médio de permanência das células de *K. lactis* dentro dos biorreatores, foi determinado pela razão entre o volume de trabalho dos fermentadores (V) e o fluxo de alimentação das culturas (F).

## 2.9. Análise de proteínas extracelulares

As amostras das culturas contínuas de *K. lactis* foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Ao sobrenadante resultante foram adicionados os seguintes inibidores de proteases: pepstatina A (1  $\mu$ M), EDTA (10 mM), PMSF - *phenylmethanesulphonyl fluoride* (1 mM), iodoacetamida (10  $\mu$ M). Esse sobrenadante foi ultrafiltrado e concentrado no sistema AMICON®, utilizando membranas de 5.000 Da. Em seguida, as amostras foram dialisadas, por 150 vezes, em 50 mM de tampão acetato de sódio, utilizando membranas de diálise de 1.000 Da.

O rendimento de proteína extracelular por biomassa (Y<sub>P/X</sub>) foi calculado, segundo descrito por BAILEY & OLLIS (1986), como concentração de proteína ( $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) por massa celular (mg. mL<sup>-1</sup>).

A produtividade de proteína extracelular, (P/X).D, foi determinada pela razão da concentração de proteína produzida pela biomassa obtida das culturas contínuas, em regime permanente, em cada velocidade de crescimento, e o valor resultante multiplicado pela taxa de diluição (D) de cada cultura.

A concentração de proteínas totais das amostras obtidas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), usando BSA (*Bovine Serum Albumin*) para a obtenção de uma curva padrão de proteína nas concentrações de 2,5 a 15  $\mu$ g (Anexo 4).

As proteínas totais foram precipitadas com 100 % de acetona gelada, por 24 horas, a - 20 °C, seguida de centrifugação a 13.000 x g, por 10 minutos,

a 4 °C. O sedimento foi lavado por duas vezes com 1 mL de 80 % de acetona gelada, recuperado por centrifugação a 13.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de tampão de amostra (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 10 % de β-mercaptoetanol; 10 % de SDS; 10 % de glicerol e 2 % de azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas a 100 °C, por 5 minutos. A análise qualitativa do perfil das proteínas extracelulares das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando os gradientes de 5 a 15 % e de 10 a 20 %, segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Os padrões de massa molecular usados foram na faixa de 14,4 a 97,4 kDa (Promega®) e na faixa de 10 a 220 kDa (Invitrogen®). Dois procedimentos de coloração foram utilizados: coloração com *Coomassie Blue* Coloidal G-250 e coloração com Prata, em conformidade com o proposto por NEUHOFF *et al.* (1988).

## **2.10. Análises estatísticas**

Para constatar diferenças significativas entre os dados analisados, foram aplicados o Teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (programa Assistat versão 7.6 beta - DEAG/CTRN/UFCG, Paraíba/Brasil) e o Intervalo de Confiança ao nível de 95 % (programa Sigma Plot versão 10.0).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estabelecimento de condições fisiológicas de limitação por nitrogênio em culturas de *Kluyveromyces lactis*

Com o objetivo de definir as fontes preferenciais de nitrogênio e estabelecer a condição de limitação nutricional, o cultivo de *K. lactis* em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio mostrou que, em termos velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ), a levedura possui maior crescimento em presença de sulfato de amônio, glutamato, glutamina, asparagina ou aspartato. Os valores de  $\mu_{\text{máx.}}$  e da constante de saturação ( $K_s$ ) para essas fontes de nitrogênio foram, respectivamente: 0,40 h<sup>-1</sup> e 0,091 mM; 0,39 h<sup>-1</sup> e 0,160 mM; 0,37 h<sup>-1</sup> e 0,139 mM; 0,36 h<sup>-1</sup> e 0,192 mM; 0,36 h<sup>-1</sup> e 0,120 mM. Em contrapartida, metionina, histidina, triptofano ou cisteína não são boas fontes de nitrogênio para *K. lactis*, que apresentou menor crescimento em presença dessas, confirmado pelos baixos valores das velocidades específicas máximas de crescimento (0,11 a 0,03 h<sup>-1</sup>) (Tabela 1).

A partir da determinação dos valores de  $\mu_{\text{máx.}}$  para cada fonte de nitrogênio e pela análise do intervalo de confiança, ao nível de 95 % de confiança, foi verificado que não houve diferenças significativas entre as fontes de nitrogênio utilizadas de um mesmo grupo (I, II, III ou IV). No entanto, houve diferenças significativas entre as fontes de nitrogênio utilizadas de cada grupo (I, II, III e IV) (Anexo 2).

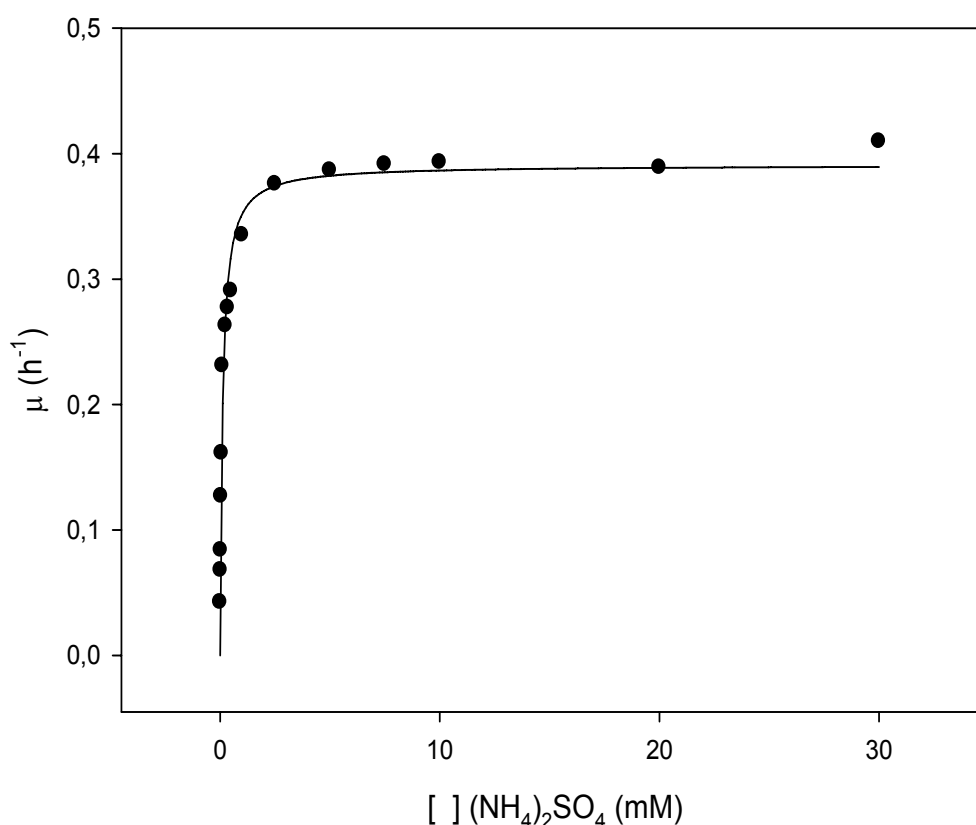
Considerando o maior crescimento de *K. lactis*, em presença de sulfato de amônio ([NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), além desta fonte não diferir das demais fontes preferenciais de nitrogênio (grupo I), esta foi utilizada na análise da cinética do crescimento de *K. lactis* em função da concentração de [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que variou de 0,02 a 30,0 mM (Figura 1). Cada ponto da Figura 1 representa o coeficiente angular da relação LN A<sub>600nm</sub> versus Tempo (h), para cada concentração de sulfato de amônio utilizada. No intervalo de concentração utilizada, a velocidade específica de crescimento de *K. lactis* aumentou em função da concentração de sulfato de amônio, apresentando uma cinética de saturação, conforme o modelo proposto por Monod, com uma correlação de 0,994.

As cinéticas de crescimento de *K. lactis* em função da concentração das demais fontes de nitrogênio utilizadas estão apresentadas no Anexo 1.

**Tabela 1:** Velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) e constantes de saturação ( $K_s$ ) de culturas de *K. lactis*, conduzidas em batelada, em diferentes fontes de nitrogênio.

Grupos	Fonte de Nitrogênio	$\mu_{\text{máx.}} (\text{h}^{-1})$	$K_s (\text{mM})$	$r^2$	F
I	Sulfato de Amônio	0,40	0,091	0,9936	902,08*
I	Glutamato	0,39	0,160	0,9989	653,13
I	Glutamina	0,37	0,139	0,9902	520,96
I	Asparagina	0,36	0,192	0,9868	542,95
I	Aspartato	0,36	0,120	0,9874	404,47
I	Alanina	0,33	0,379	0,9886	389,11
II	Arginina	0,27	0,141	0,9857	323,10*
II	Treonina	0,25	0,072	0,9845	321,42
II	Lisina	0,24	0,131	0,9863	264,98
II	Valina	0,24	0,082	0,9877	176,31
II	Tirosina	0,24	0,076	0,9962	158,68
II	Fenilalanina	0,23	0,091	0,9941	147,54
III	Serina	0,20	0,124	0,9987	138,20*
III	Isoleucina	0,19	0,048	0,9925	101,46
III	Leucina	0,19	0,200	0,9937	97,70
III	Prolina	0,17	0,214	0,9943	98,19
III	Glicina	0,15	0,094	0,9929	55,78
IV	Metionina	0,11	0,087	0,9970	50,97*
IV	Histidina	0,10	0,058	0,9894	35,75
IV	Triptofano	0,10	0,054	0,9931	25,57
IV	Cisteína $\leq 0,35\text{mM}$	0,08	0,012	0,9820	58,05
IV	Cisteína $> 0,35\text{mM}$	0,03	0,259	0,9837	30,05

\* Significativo ao nível de 95 % de confiança, pelo intervalo de confiança.



**Figura 1:** Cinética de crescimento de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio ( $[(NH_4)_2SO_4]$ ), conduzida em batelada, em meio YCB, ajustada conforme o modelo de Monod:  $\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot S / (K_s + S)$ .

Uma vez que em presença de sulfato de amônio, a assimilação dos íons amônio ( $NH_4^+$ ) e a liberação de prótons ( $H^+$ ) pela levedura, ocasionam a formação de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e consequente acidificação do meio, foi necessário definir o melhor sistema tampão que mantivesse o pH do meio, evitando a sua redução e não afetando o crescimento de *K. lactis*. Além disso, a melhor condição de crescimento de *K. lactis*, considerando diferentes valores de pH, foi averiguada.

A Tabela 2 revela as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) e as correspondentes biomassas (massas celulares), relativas aos valores da densidade óptica máxima ( $DO_{m\acute{a}x.}$ ), de *K. lactis*, em meio YCB acrescido de 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e de diferentes sistemas tampão, em diferentes valores de pH. Como mostrado, o tampão fosfato (pH 6 e 7) foi o que proporcionou o maior crescimento da levedura, considerando os maiores valores de  $\mu$  (0,39 e 0,41 h<sup>-1</sup>) e biomassa (3,67 e 3,77 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentados.



Em 24 horas de cultivo, o tampão fosfato foi o que conseguiu manter o pH do meio de *K. lactis*, por mais tempo (aproximadamente 18 horas), nas condições avaliadas.

**Tabela 2:** Velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) e correspondentes biomassas ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) de culturas de *K. lactis*, conduzidas em batelada, em meio YCB adicionado de diferentes sistemas tampão e pH. Os resultados representam as médias aritméticas  $\pm$  o desvio padrão de 3 repetições.

Tampão - pH	Biomassa ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
Sem tampão	$2,22 \pm 0,042^c$	$0,33 \pm 0,013^c$
Citrato - 3	$2,12 \pm 0,060^c$	$0,32 \pm 0,006^d$
Acetato - 4	$0,05 \pm 0,007^d$	$0,02 \pm 0,002^f$
Citrato - 5	$3,05 \pm 0,042^b$	$0,33 \pm 0,002^c$
Fosfato - 6	$3,67 \pm 0,155^a$	$0,39 \pm 0,001^b$
Fosfato - 7	$3,77 \pm 0,113^a$	$0,41 \pm 0,001^a$
Tris-HCl - 8	$2,23 \pm 0,091^c$	$0,24 \pm 0,015^e$
Borato - 9	$0,03 \pm 0,007^d$	$-0,01 \pm 0,001^g$
Carbonato - 10	$0,03 \pm 0,001^d$	$-0,02 \pm 0,003^g$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O efeito da concentração de massa celular na cinética de crescimento de culturas de *K. lactis* foi avaliado em meio YCB acrescido de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio, apresentando densidade óptica inicial de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 e 5,0, em absorvância a 600 nm. Como demonstrado na Tabela 3, as culturas de *K. lactis* com as densidades ópticas iniciais de 0,05, 0,1 e 0,2, possuíram as maiores velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ), cujos valores foram, respectivamente: 0,36, 0,36 e  $0,35 \text{ h}^{-1}$ .

Diante desses resultados, as condições fisiológicas de crescimento e de limitação por nitrogênio para culturas contínuas de *K. lactis* foram estabelecidas: em meio YCB suplementado com sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, tamponado com tampão fosfato (pH 5,5 - 6,0) e com fluxo de alimentação, que resultasse em velocidades de crescimento de 0,01 a  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , correspondendo a diferentes níveis de limitação por nitrogênio, de acordo com o modelo cinético previamente estabelecido.

**Tabela 3:** Velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) e correspondentes biomassas ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) de *K. lactis*, conduzidas em batelada, em meio YCB, apresentando diferentes densidades óptica iniciais, em absorvância a 600 nm. Os resultados representam as médias aritméticas  $\pm$  o desvio padrão de 3 repetições.

DO inicial	Biomassa ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
0,05	$2,09 \pm 0,056^f$	$0,36 \pm 0,001^a$
0,1	$2,21 \pm 0,021^e$	$0,36 \pm 0,003^a$
0,2	$2,29 \pm 0,042^e$	$0,35 \pm 0,006^b$
0,5	$2,48 \pm 0,042^d$	$0,30 \pm 0,004^c$
1	$2,69 \pm 0,063^c$	$0,21 \pm 0,007^d$
2	$2,91 \pm 0,021^b$	$0,17 \pm 0,005^e$
5	$4,49 \pm 0,049^a$	$0,10 \pm 0,003^f$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.2. Caracterização fisiológica de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis* sob limitação por nitrogênio

Estabelecidas as condições fisiológicas de limitação por nitrogênio e para manter essas condições, a partir da determinação da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) de  $0,40 \text{ h}^{-1}$ , para sulfato de amônio, culturas contínuas de *K. lactis* foram conduzidas, em meio YCB acrescido de sulfato de amônio, sob 6 velocidades de crescimento, com valores de: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,09 e  $0,2 \text{ h}^{-1}$ .

A Tabela 4 apresenta alguns parâmetros das culturas contínuas de *K. lactis*, em regime permanente, sob limitação por nitrogênio ( $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ ). Nestas condições, o aumento da velocidade de crescimento e, conseqüentemente, do fluxo de alimentação das culturas foi acompanhado pela redução do tempo de geração, redução do tempo de residência (tempo médio de permanência das células nos biorreatores) e diminuição da massa celular. O pH se manteve constante durante o crescimento nas 6 velocidades de crescimento analisadas.

**Tabela 4:** Parâmetros de culturas contínuas de *K. lactis* sob limitação por nitrogênio ( $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ ).

$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	Tempo de Geração (h)	$\tau^*$ (h)	DO		Biomassa (mg.mL <sup>-1</sup> )		pH	
I e II	I e II	I e II	I e II	I	II	I	II	I	II
0,01	0,05	70	100	4,1	4,2	1,30	1,34	5,5	5,4
0,02	0,10	35	50	3,4	3,6	1,08	1,15	5,5	5,3
0,03	0,13	23	33,33	2,8	2,9	0,89	0,92	5,4	5,5
0,05	0,21	14	20	2,4	2,7	0,76	0,86	5,5	5,6
0,09	0,38	8	11,11	2,1	2,2	0,67	0,70	5,4	5,6
0,2	0,84	3,5	5	1,3	1,2	0,41	0,38	5,5	5,4

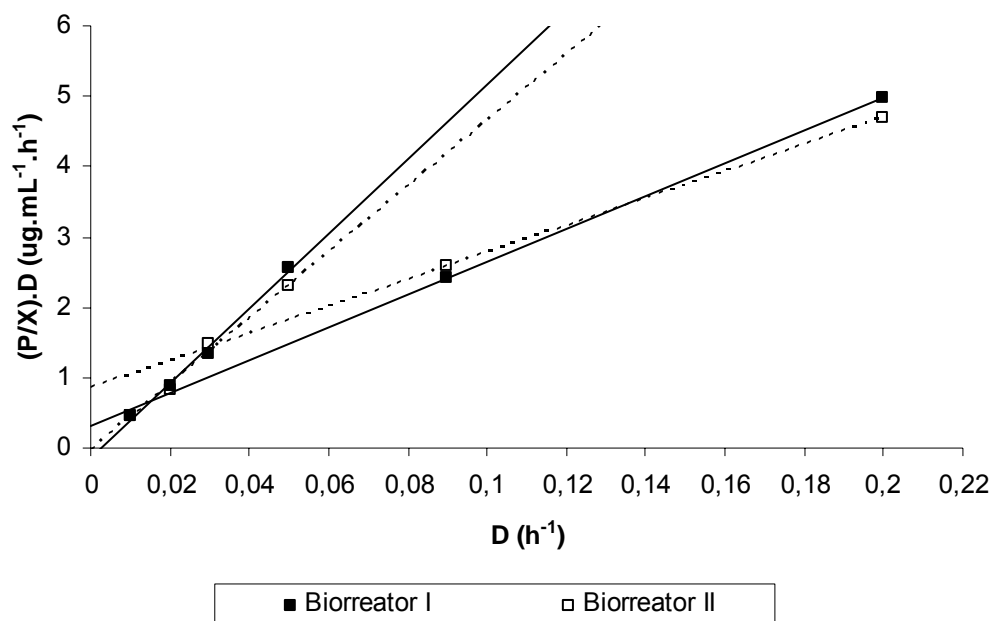
\* Tempo de residência em horas.

I = Biorreator 1; II = Biorreator 2

O rendimento de proteína extracelular por biomassa ( $Y_{P/X}$ ) calculado para cada cultura de *K. lactis*, sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio, mostrou maior rendimento de proteína extracelular para as culturas conduzidas sob menores velocidades de crescimento, como  $0,01 \text{ h}^{-1}$  ( $Y_{P/X} = 0,045 \text{ mg.mg}^{-1}$ ), quando comparado com as culturas conduzidas sob maiores velocidades de crescimento, como  $0,2 \text{ h}^{-1}$  ( $Y_{P/X} = 0,023 \text{ mg.mg}^{-1}$ ).

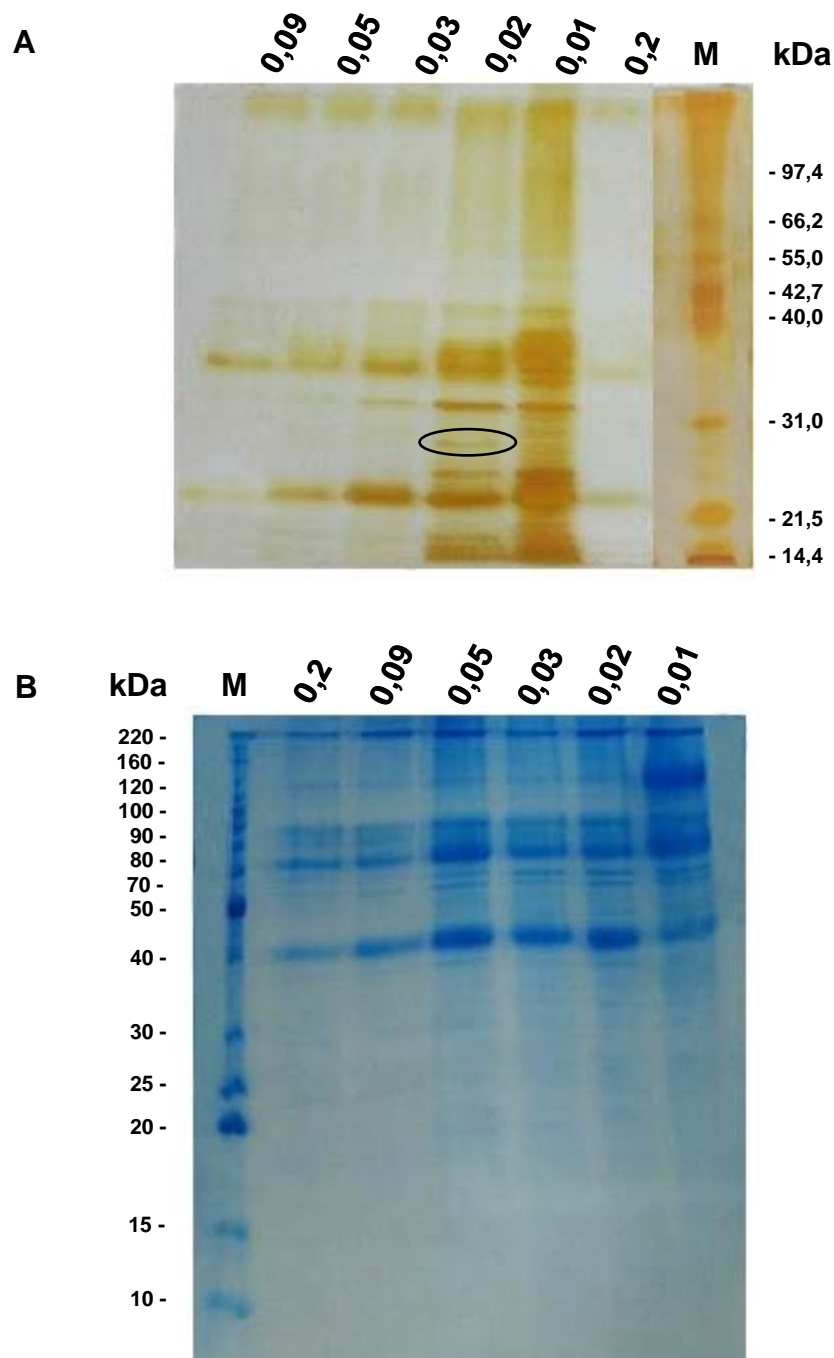
A concentração de proteínas extracelulares foi maior nas culturas conduzidas sob menores velocidades de crescimento ( $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$  [proteína] =  $\sim 60 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do que sob maiores velocidades de crescimento ( $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$  [proteína] =  $\sim 10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A concentração de proteínas extracelulares em culturas de *K. lactis*, conduzidas sem condições de limitação por nitrogênio (YCB +  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio), sob batelada e em fase exponencial de crescimento, foi de  $41,724 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A Figura 2 apresenta a produtividade de proteínas extracelulares,  $(P/X).D$ , de culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio. As culturas conduzidas sob as menores velocidades de crescimento ( $\mu = 0,01$  a  $0,05 \text{ h}^{-1}$ ) apresentaram a produtividade de proteínas associada ao crescimento, enquanto aquelas conduzidas sob as maiores velocidades de crescimento ( $\mu = 0,09$  e  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ) apresentaram a produtividade de proteínas não associada ao crescimento.



**Figura 2:** Produtividade de proteínas extracelulares das culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II.

O perfil das proteínas extracelulares representativo das culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, averiguado por eletroforese em gel de poliácridamida, utilizando os gradientes de 5 a 15 % e de 10 a 20 %, está apresentado na Figura 3A-B, respectivamente. As amostras mostraram um padrão de bandas distinto entre as diferentes velocidades de crescimento, tanto no gradiente de 5 a 15 % (coloração com Prata), como no gradiente de 10 a 20 % (coloração com *Coomassie Blue* Coloidal), nos biorreatores I e II. Um grande número de bandas é observado, nos géis, nas amostras correspondentes às menores velocidades de crescimento (0,01 e 0,02  $\text{h}^{-1}$ ). Por outro lado, algumas bandas mostraram presentes ou ausentes, em determinadas velocidades de crescimento, como por exemplo, a banda de ~30 kDa, aparentemente presente apenas na velocidade de 0,02  $\text{h}^{-1}$ .



**Figura 3:** Perfil protéico extracelular representativo de culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), em SDS-PAGE. **A-** Coloração com Prata, **M-** marcador de massa molecular Promega®. **B-** Coloração com *Coomassie Blue* Coloidal G-250, **M-** marcador de massa molecular Invitrogen®.

#### 4. DISCUSSÃO

Geralmente, amônia ou glutamina são consideradas fontes de nitrogênio preferenciais para *Saccharomyces cerevisiae*, mas algumas linhagens podem também utilizar glutamato ou asparagina (DICKINSON & SCHWEIZER, 2004). O mesmo parece ocorrer com a levedura *Kluyveromyces lactis*. Neste trabalho, *K. lactis* apresentou as maiores velocidades específicas máximas de crescimento em presença de sulfato de amônio, glutamato, glutamina, asparagina e aspartato. A assimilação de nitrogênio, em leveduras, pode ser feita pela aminação redutiva de 2-cetoglutarato, catalisada pela enzima glutamato desidrogenase; ou ainda pela síntese de glutamina, a partir de glutamato e amônia, catalisada pela enzima glutamina sintase e glutamato sintetase (MAGASANIK & KAISER, 2002; JIMÉNEZ-MARTÍ *et al.*, 2008). Assim, sugere-se que as fontes, sulfato de amônio, glutamato e glutamina, alimentam igualmente as vias de assimilação de nitrogênio, e mostram ser as fontes de nitrogênio preferenciais para *K. lactis*, além de asparagina e aspartato, cujas velocidades específicas máximas de crescimento foram também altas e sem diferença significativa, ao nível de 95 % de confiança. Por outro lado, metionina, histidina, triptofano e cisteína podem ser considerados fontes não-preferenciais de nitrogênio pela levedura, o que é confirmado pelos baixos valores das velocidades específicas máximas de crescimento, em presença desses aminoácidos.

A constante de saturação ( $K_s$ ) reflete a afinidade da célula pelo substrato e os valores descritos, para leveduras, estão na ordem de 0,11 mM para glicose (WALKER, 1998). Os valores de  $K_s$  para fontes de nitrogênio, em leveduras, não tem sido até então descritos. Espera-se, entretanto, que esses valores sejam dezenas de vezes menores para nitrogênio, embora WALKER (1998) faça referência à constante associada à afinidade de transportadores de íons amônio ( $K_t$ ) na ordem de 0,1 a 0,2 mM. No presente trabalho, o valor de  $K_s$  determinado para sulfato de amônio (0,091 mM), assim como para as outras fontes igualmente preferenciais de nitrogênio, foram na mesma ordem do  $K_t$  mencionado.

A cinética de crescimento de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio, permite sugerir que concentrações do substrato entre 0,02 a

5 mM correspondem à uma faixa de limitação nutricional por nitrogênio, o que pode ser comprovado pelo ajuste ao modelo cinético de Monod e pelo valor da correlação desse.

Em meio YCB, a assimilação de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, por leveduras, provoca a redução do pH do meio. Por isso, a manutenção do pH do meio com um sistema tampão foi necessária, de maneira que o crescimento da levedura não fosse afetado. O tampão fosfato (pH 6 e 7), foi o que possibilitou o maior crescimento, formação de biomassa e manutenção do pH do meio por mais tempo, por *K. lactis*, inclusive em comparação ao cultivo da levedura sem a presença de tampão, o que está em conformidade com o relatado por CORTEZ & ROBERTO (2006). Uma vez que sais de fosfato podem aumentar as taxas de crescimento, associado aos valores de pH ótimo de crescimento da levedura (pH 5,5 a 6,5), os resultados obtidos estão de acordo.

Para uma análise global do metabolismo, seja proteômica ou metabolômica, é necessário que a população microbiana alcance uma concentração de células suficiente para o nível de detecção dessas análises. No entanto, para evitar o efeito da concentração de massa celular na cinética de crescimento de *K. lactis* e garantir que o único fator limitante nas culturas contínuas fosse nitrogênio, mas não densidade populacional, culturas de *K. lactis* foram conduzidas com diferentes densidades ópticas iniciais, sendo aquelas de 0,05, 0,1 e 0,2 as que proporcionaram as maiores velocidades específicas de crescimento da levedura. Normalmente, maiores taxas de crescimento, para leveduras, são observadas para culturas apresentando densidades ópticas iniciais de 0,05 ou 0,1 (DICKINSON & SCHWEIZER, 2004).

Todos esses resultados permitiram estabelecer as condições fisiológicas de crescimento e de limitação por nitrogênio para culturas contínuas de *K. lactis* como sendo em meio YCB suplementado com sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, tamponado com tampão fosfato (pH 5,5 - 6,0) e com fluxo de alimentação, que resultasse em velocidades de crescimento de 0,01 a 0,2 h<sup>-1</sup>, correspondendo à limitação por nitrogênio de acordo com o modelo cinético previamente estabelecido.

Os parâmetros das culturas contínuas de *K. lactis*, em regime permanente, sob limitação por nitrogênio, procederam conforme esperado. As



culturas conduzidas sob as menores velocidades de crescimento, onde a limitação por nitrogênio é mais intensa, apresentaram maior tempo de geração, o que é corroborado pelos maiores valores de tempo de permanência das células nos biorreatores ( $\tau$ ). Em consequência, a biomassa atingida foi maior. O pH ótimo para produção de biomassa em *K. lactis* CBS 683, em cultivo contínuo, é de 6,0 (BLONDEAU *et al.*, 1994). Por outro lado, o pH do cultivo de *K. lactis* CBS 2359 manteve-se constante ( $\sim 5,5$ ) e a biomassa, entre as diferentes velocidades de crescimento avaliadas, variou de 0,4 a 1,3 mg.mL<sup>-1</sup>. O valor máximo, descrito para *K. lactis* JA6, é de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de biomassa, em cultivo em batelada, em meio mínimo com 2 % de fonte de carbono e suplementado com aminoácidos, pH 6,0 (MERICO *et al.*, 2004).

A secreção de proteínas extracelulares por *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento, cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio foi maior nas menores velocidades de crescimento. Os dados sugerem um aumento na ativação da maquinaria de síntese e secreção de proteínas extracelulares pela levedura, sob baixas velocidades de crescimento, onde a limitação nutricional por nitrogênio é maior. Em geral, as leveduras sintetizam e secretam um número maior de proteínas, em condições de estresse, como resposta fisiológica ao meio em que se encontram (RIOU *et al.*, 1997; WINDERICKX, *et al.*, 2003). Em condições limitantes de nitrogênio, culturas de *K. lactis* conduzidas sob as velocidades de crescimento de 0,03 e 0,09 h<sup>-1</sup>, em cultivo contínuo, secretaram para o meio extracelular proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, transporte de peptídeos, enzimas de restrição, transferases, quinases, hidrolases, descarboxilases e oxidases (SANTOS, 2008). Estudos relacionados à identificação das proteínas extracelulares detectadas, principalmente aquelas presentes em apenas determinadas velocidades de crescimento, por eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional, cromatografia líquida bidimensional e espectrometria de massas, devem ser realizados com o intuito de complementar este trabalho, na tentativa de relacionar a síntese dessas proteínas com a própria condição de limitação nutricional ou a outros processos fisiológicos, como o envelhecimento celular da levedura, nessas condições, por exemplo.

No presente estudo, a limitação por nitrogênio e não outro tipo de limitação nutricional ou condição de estresse (pH, temperatura) é garantida pelas próprias condições pré-estabelecidas e já discutidas. Além disso, o cultivo contínuo da levedura, em meio YCB acrescido de sulfato de amônio duas vezes concentrado e tamponado com tampão fosfato (pH = 5,5), revelou um aumento da biomassa de *K. lactis* de aproximadamente 1,8 vezes (dados não mostrados), o que confirma a condição de limitação por nitrogênio.

Diante do exposto, o conhecimento sobre as respostas fisiológicas de culturas de leveduras sob condições de limitação nutricional é de fundamental interesse, uma vez que ainda não são bem esclarecidos os mecanismos, papéis e a importância de várias adaptações metabólicas ocorridas em leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, nessas condições. O sistema de cultura contínua pode ser útil para a análise dessas respostas fisiológicas relacionadas à limitação nutricional, em diferentes estados fisiológicos, permitindo a caracterização de culturas de leveduras.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw Hill Book Company, 2<sup>nd</sup> Ed., 1986.

BLONDEAU, K.; BOZE, H.; JUNG, G.; MOULIN, G.; GALZY, P. Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. **Yeast**, v. 10, p. 1297-1303, 1994.

BRADFORD, M. M. An rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Effect of phosphate buffer concentration on the batch xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p.321-325, 2006.

DICKINSON, J. R. & SCHWEIZER, M. S. **The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. CRC Press LLC, NY, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004.

FORSBERG, H.; LJUNGDAHL, P.O. Genetic and Biochemical Analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. **Molecular and Celular Biology**, v. 21, p. 814-826, 2001.

JIMÉNEZ-MARTÍ E.; DEL OLMO, M. L. Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 245-56, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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

MAGASANIK, B. The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. **PNAS**, v. 102, n. 46, p.16537-16538, 2005.

MERICO, A.; CAPITANIO, D.; VIGENTINI, I.; RANZI, B.M.; COMPAGNO, C. How physiological and cultural conditions influence heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p. 139-146, 2004.

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

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

REGENBERG, B.; DURING-OLSEN, L.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; HOLMMBERG, S. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 36, p.317-328, 1999.

SANTOS, A. V. **Proteoma extracelular de *Kluyveromyces lactis* em cultura contínua sob limitação de nitrogênio**. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 110p., 2008 (Tese de Doutorado).

SCHAFFRATH, R. & BREUNING, K. D. Genetics and molecular physiology of yeast *Kluyveromyces lactis* – a review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 173-190, 2000.

WALKER, G. M. **Yeasts physiology and biotechnology**. Ed. Jonh Wiley & Sons Ltd. New York. 1998.

WASHBURNE, M.; BRAUN, E.; JOHNSTON, G.C.; SINGER, R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 57, p. 383-401, 1993.

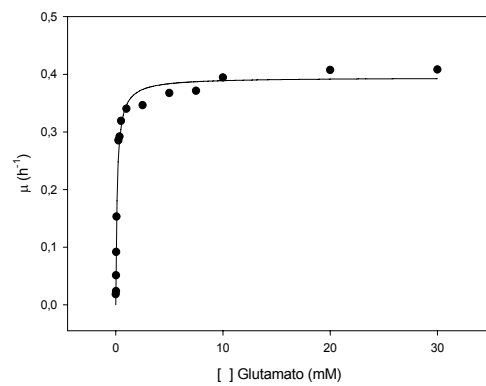
WERNER-WASHBURNE, M.; BRAUN, E.L.; CRAWFORD, M.E.; PECK, V.M. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 19, p. 1159-1166, 1996.

WINDERICKX, J.; HOLSBEEKS, I.; LAGATIE, O.; GIOTS, F.; THEVELEIN, J.; WINDE, H. From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. **Topics in Current Genetics**, v.1, p. 305-386, 2003.

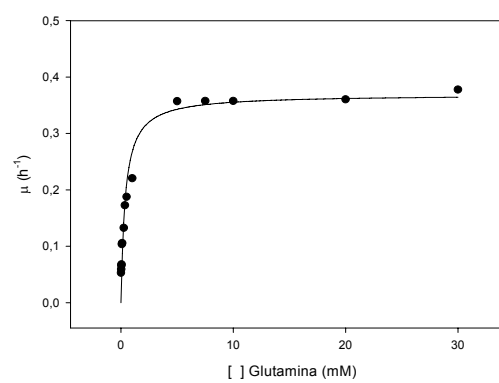
ZAMAN, S.; LIPPMAN, S. I.; ZHAO, X.; BROACH, J. R. How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p.27-81, 2008.

## **6. ANEXOS**

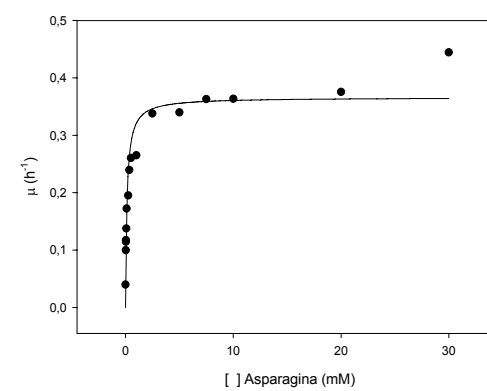
Glutamato



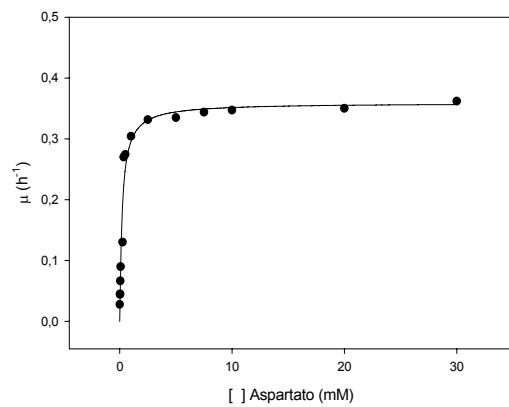
Glutamina



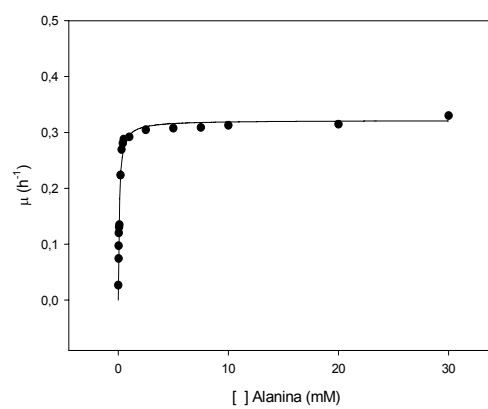
Asparagina



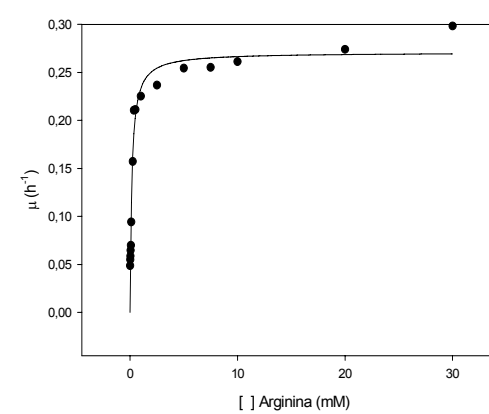
Aspartato

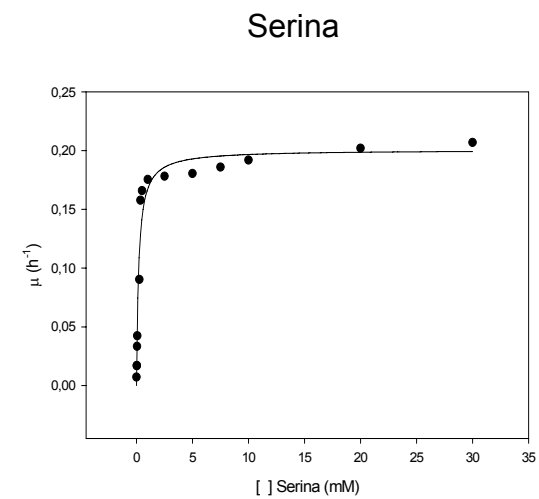
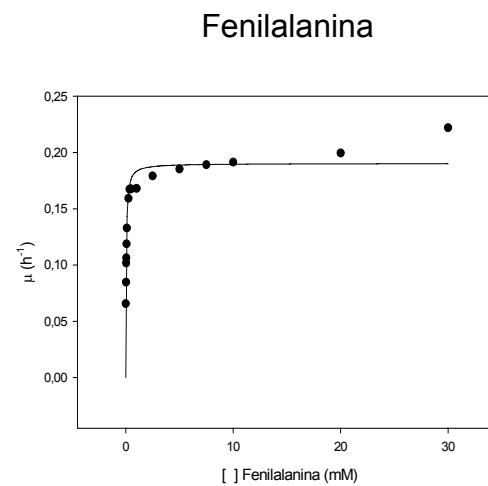
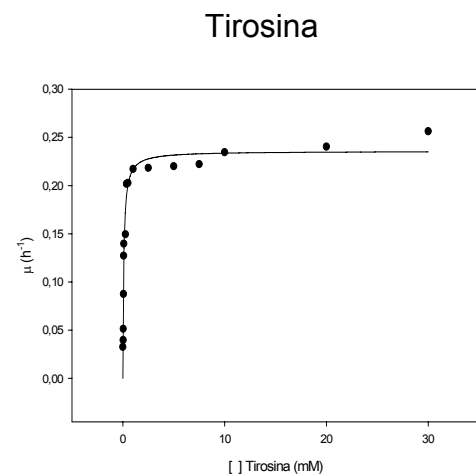
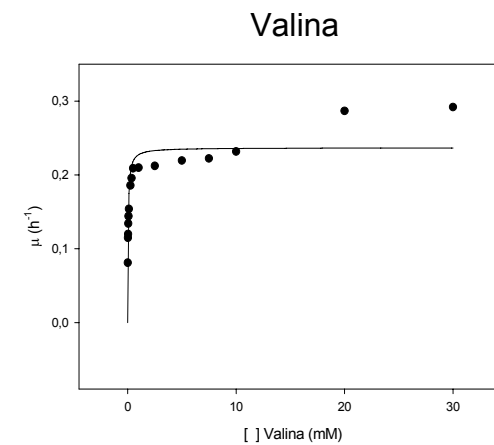
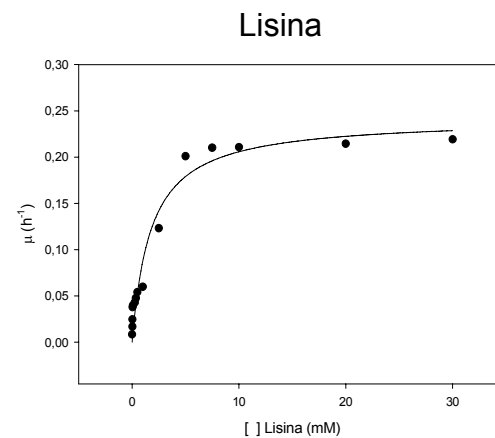
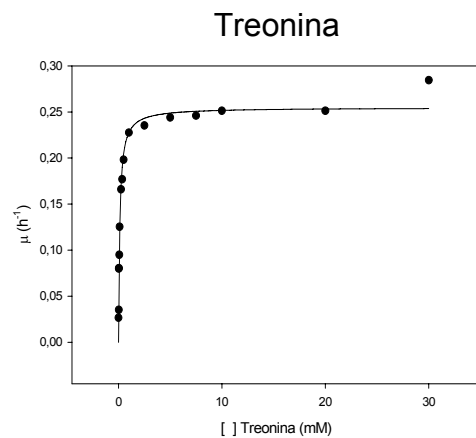


Alanina

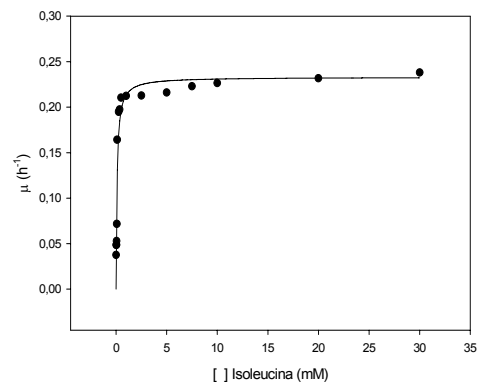


Arginina

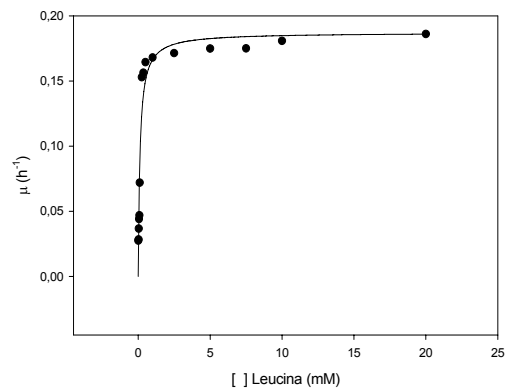




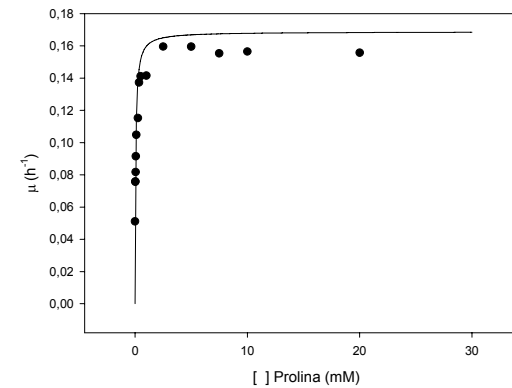
Isoleucina



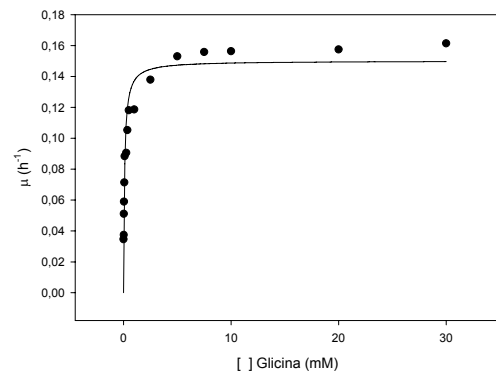
Leucina



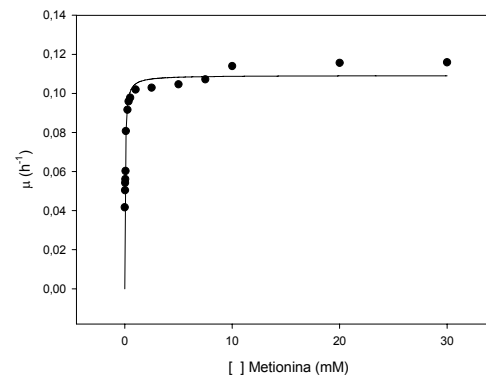
Prolina



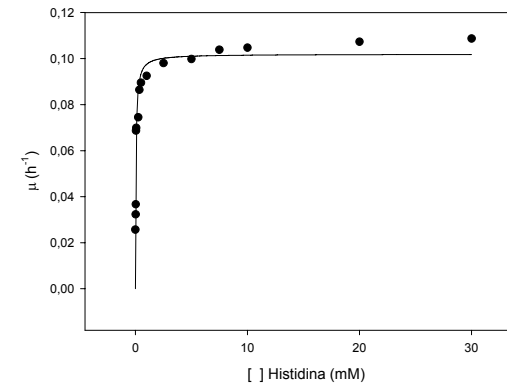
Glicina



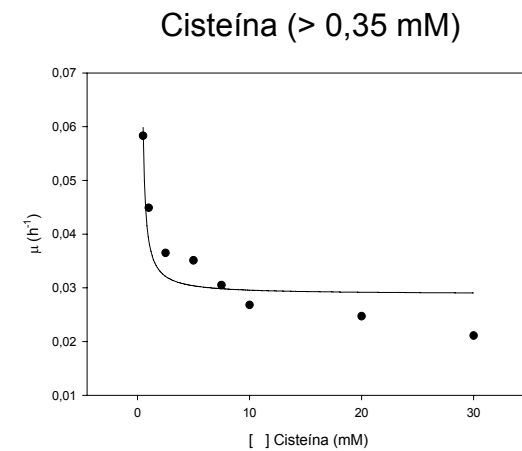
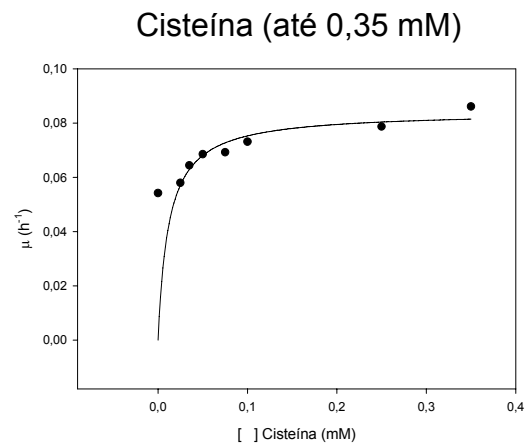
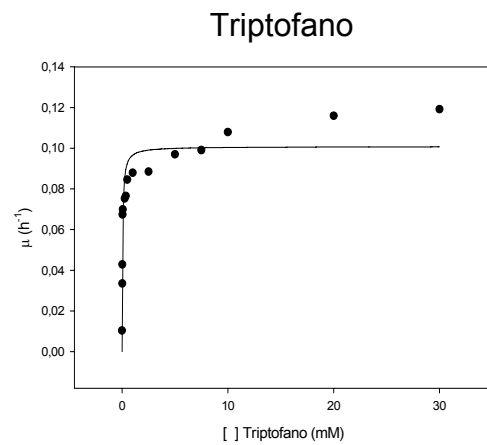
Metionina



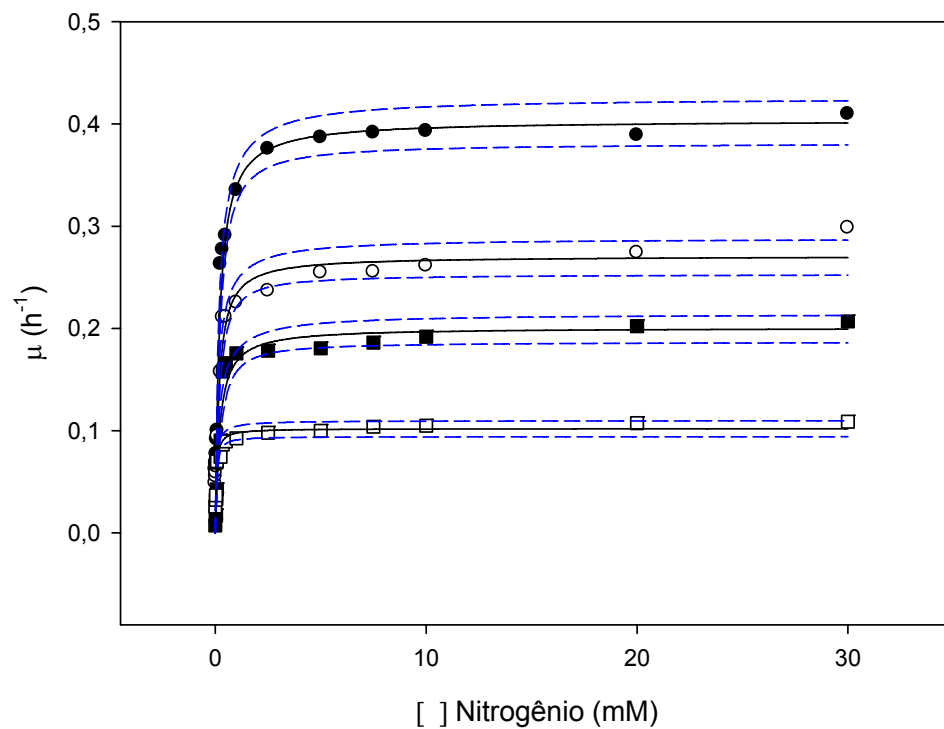
Histidina



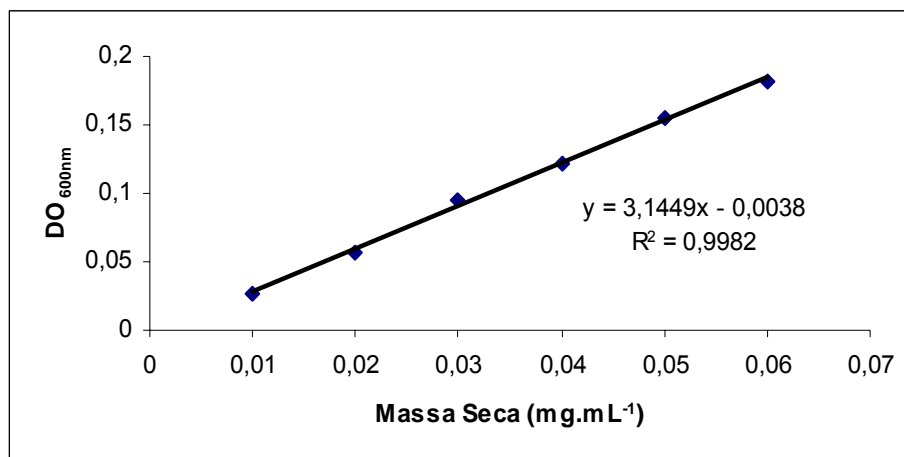




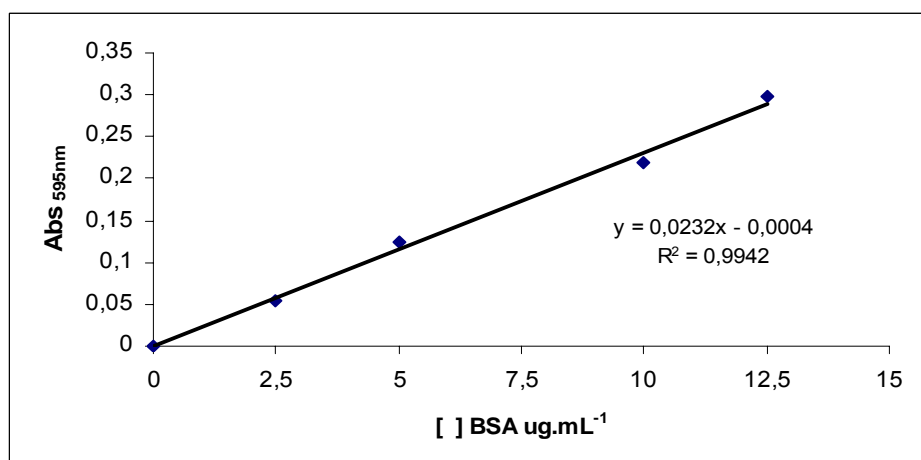
**Anexo 1:** Cinéticas de crescimento de *K. lactis* em função da concentração de diferentes fontes de nitrogênio, em meio YCB, ajustadas conforme o modelo de Monod:  $\mu = \mu_{\text{máx.}} \cdot S / (K_s + S)$ .



**Anexo 2:** Análise do intervalo de confiança, ao nível de 95 % de confiança, de culturas de *K. lactis* em diferentes fontes de nitrogênio, representantes dos grupos I, II, III e IV. (●) Sulfato de amônio, (○) Arginina, (■) Serina, (□) Histidina. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança a 95 %.



**Anexo 3:** Curva padrão de massa celular seca (mg.mL<sup>-1</sup>) de *K. lactis*, em meio YCB acrescido de 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio.



**Anexo 4:** Curva padrão de proteína total (µg.mL<sup>-1</sup>) realizada com BSA (soro albumina bovina).

### **CAPÍTULO 3**

#### **CARACTERÍSTICAS DE ENVELHECIMENTO EM CULTURAS CONTÍNUAS DE *Kluyveromyces lactis* SOB LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO**

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento refere-se às alterações bioquímicas e fisiológicas, ocorridas nos organismos ao longo do seu tempo de vida, as quais afetam a atividade metabólica e a viabilidade destes (HARMAN, 1981). O interesse em conhecer os mecanismos do envelhecimento celular em eucariotos superiores (multicelulares) tem motivado o estudo do processo em eucariotos inferiores, como as leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Isso devido a algumas características fundamentais apresentadas pelas leveduras, destacando: o rápido crescimento celular e, portanto, o menor tempo para ser completado o ciclo celular, além da fácil manipulação fisiológica e genética desses micro-organismos (DICKINSON & SCHWEIZER, 2004).

Enquanto em *S. cerevisiae* prevalece o metabolismo oxirredutivo (fermentativo), em *Kluyveromyces lactis* o metabolismo é predominantemente oxidativo (respiratório), assemelhando-se mais aos eucariotos superiores. Assim, *K. lactis* tem se destacado como um modelo alternativo à *S. cerevisiae*, para os estudos relacionados ao processo de envelhecimento, além de outros estudos fisiológicos e genéticos (POLIAKOVÁ *et al.*, 2002).

Algumas alterações morfológicas e bioquímicas já foram observadas em células de leveduras ao longo do seu tempo de vida, o que permite identificar o seu envelhecimento. Assim, as células senescentes apresentam dimensões maiores do que as células mais jovens (JAZWINSKI, 2005). O número de cicatrizes, que são marcas deixadas na parede celular a cada célula-filha gerada, é maior. Em consequência disso, o conteúdo de quitina é aumentado (KELLER *et al.*, 1971). À medida que as células envelhecem, maior é o tempo para se completar o ciclo celular. Outras características relatadas em células velhas são: alteração da forma celular, presença de superfície celular enrugada, aumento do tamanho do vacúolo, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelularmente e produção de alcoóis aromáticos (JAZWINSKI, 2002; ZHANG, 2002; WINTER, 2004; CHEN & FINK, 2006; SEVERIN *et al.*, 2008). Além dessas, características morfológicas de apoptose, um tipo de morte celular programada, que até quinze anos atrás não havia sido relatado para organismos unicelulares, e que em leveduras representam uma

das últimas alterações celulares retratadas pelo envelhecimento das mesmas, têm sido descritas (MADEO *et al.*, 1997 e 2004; CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010).

Condições de restrição nutricional prolongam a meia vida das células e, em consequência, retardam o seu envelhecimento (JIANG *et al.*, 2000). Alguns estudos já demonstraram que a redução da concentração de glicose ou aminoácidos no meio de cultura aumenta a longevidade das células de leveduras (GUARENTE *et al.*, 2002; DILOVA *et al.*, 2007). GUARENTE (2005) reportou que condições de restrição calórica, por fonte de carbono, aumentaram a longevidade de culturas de *S. cerevisiae*. As células apresentaram longevidade maior na presença de 0,5 % do que em 2,0 % de glicose. GOMES e colaboradores (2007) demonstraram que a limitação, por fonte de nitrogênio, especificamente aminoácidos, também aumentou a longevidade de culturas de *S. cerevisiae*, desacelerando o processo de envelhecimento das células. Tem sido relatado que a remoção de glutamato ou asparagina e a remoção de aminoácidos não-essenciais do meio aumentam o tempo de vida (*lifespan*), em linhagens de *S. cerevisiae* (JIANG *et al.*, 2000). Por outro lado, a presença de outro composto aminado no meio, a espermidina, suprime o fenótipo necrótico, em células de *S. cerevisiae*, durante o envelhecimento das mesmas, enquanto a limitação dessa poliamina no meio acelera o processo de envelhecimento (SCHIPPER *et al.*, 2000).

Ao contrário da restrição calórica, a limitação por nitrogênio pode acelerar o envelhecimento de leveduras, uma vez que foi constatada a redução de 70 % na taxa de crescimento de culturas de *K. lactis* em presença de concentração de sulfato de amônio 10 vezes menor que 38 mM e células com características de envelhecimento (CORRÊA, 2007). Além disso, estudos prévios realizados por CORRÊA (2007) demonstraram que culturas contínuas de *K. lactis* conduzidas sob baixas velocidades de crescimento e sob limitação por nitrogênio, na forma de sulfato de amônio, também apresentaram células com características de envelhecimento, como maior concentração de quitina na parede celular, maiores dimensões celulares e presença de condensação e fragmentação de DNA, indicando a possível ocorrência de apoptose.

Considerando as poucas informações sobre o envelhecimento de leveduras, em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento e sob limitação por sulfato de amônio, como única fonte de nitrogênio, foi proposto neste trabalho avaliar a presença de características de envelhecimento, tais como viabilidade celular, cicatrizes celulares e concentração de quitina, espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose por externalização da fosfatidilserina e por fragmentação do DNA, dimensões celulares e detecção de alcoóis aromáticos, em culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas sob diferentes velocidades de crescimento e em diferentes condições fisiológicas de limitação nutricional por nitrogênio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Conforme estabelecido previamente no Capítulo 2, culturas contínuas de *K. lactis* foram conduzidas em diferentes velocidades de crescimento (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>), sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio, impostos pela variação dos fluxos de alimentação das culturas. O sobrenadante das culturas coletado, em triplicata, e representativo de cada condição de regime permanente (*steady-state*) foi utilizado para as posteriores análises do envelhecimento de *K. lactis*. Como controle, foi utilizada uma cultura de *K. lactis*, conduzida sem condições de limitação por nitrogênio (YCB + 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio), sob batelada, e em fase exponencial de crescimento.

### 2.1. Viabilidade celular de culturas de *Kluyveromyces lactis*

A viabilidade celular de amostras das culturas de *K. lactis* conduzidas foi avaliada por citometria de fluxo. Após centrifugação a 10.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C, o sedimento de massa celular obtido foi lavado por duas vezes com 0,9 % de solução salina e ressuspendido em 1 mL da mesma solução. Uma suspensão de 10<sup>6</sup> células foi colocada em tubos de poliestireno. No momento da leitura dos dados em citômetro de fluxo foi adicionado 1 µL de 0,4 % de azul de Tripán à suspensão de células.

### 2.2. Avaliação de características de envelhecimento em células de culturas de *Kluyveromyces lactis*

A presença de características de envelhecimento nas células das culturas de *K. lactis* foi avaliada pelas seguintes técnicas: coloração por Alexa Flúor 488, isolamento da parede celular e determinação espectrofotométrica de N-acetilglicosamina, coloração por dihidrorodamina, coloração por Anexina V, coloração por DAPI, técnica de TUNEL, eletroforese em campo pulsado, determinação das dimensões celulares.



### 2.2.1. Cicatrizes celulares

A presença de cicatrizes dos brotos na parede celular das células de *K. lactis* foi averiguada pela coloração com Alexa Flúor 488-*labelled wheat-germ agglutinin* (lectina de *Triticum vulgaris*), descrita por KUREC *et al.* (2009).

As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas. Após centrifugação a 10.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C, o sedimento de massa celular obtido foi lavado por duas vezes com 0,9 % de solução salina e ressuspendido em 1 mL da mesma solução. A uma suspensão de 10<sup>6</sup> células foi adicionado 0,5 µL de Alexa Flúor 488-*labelled wheat-germ agglutinin* (1 mg.mL<sup>-1</sup>). Após incubação, sob leve agitação, por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 0,9 % de solução salina. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 300 µL de 0,9 % de solução salina, em tubos de poliestireno, e a leitura dos dados foi realizada em citômetro de fluxo.

Lâminas microscópicas, previamente tratadas com poli-lisina, foram preparadas, utilizando 10 µL da suspensão de células marcadas com Alexa Flúor 488-*wheat-germ agglutinin* (WGA-AF 488 conjugate), e observadas em microscópio confocal.

### 2.2.2. Concentração de quitina

A concentração de quitina na parede celular das células de *K. lactis* foi avaliada pelo isolamento da parede celular e a determinação espectrofotométrica de N-acetilglicosamina, de acordo com KUMAR & HANSEN (1972), POPOLO *et al.* (1997) e BULIK *et al.* (2003). As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas.

Para o isolamento da parede celular, 1 mL da suspensão de células (10<sup>6</sup> células) foi lavada duas vezes com 1 mL de água destilada. As células foram ressuspendidas em 1 mL de KOH a 6 % e incubadas, por 90 minutos, a 80 °C. Após término do período de incubação, a parede celular das células foi

coletada por centrifugação a 10.000 x *g*, por 10 minutos, e lavada duas vezes com 1 mL de PBS.

Para determinar o conteúdo de quitina na parede celular, a suspensão de parede celular previamente obtida foi tratada com 50 µL de liticase (30 mg. mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl, pH 7,4), por 24 horas, a 37 °C. O conteúdo de quitina em termos de N-acetilglicosamina nos hidrolisados foi determinado utilizando o reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído). A um volume de 0,2 mL da suspensão de parede celular hidrolisada foi adicionado 0,1 mL de tampão borato (pH 9,1). A mistura foi aquecida, a 100 °C, por 10 minutos. Em seguida, essa mistura foi resfriada em banho de gelo (2-4 °C), por 5 minutos, e adicionada de 0,25 mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído a 4 % (diluído em clorofórmio) e 0,45 mL de ácido fórmico. Os tubos contendo essa mistura foram homogeneizados por 1 minuto e, então, incubados, a 37 °C, por 20 minutos. Ao término desse tempo, a mistura foi resfriada em banho de gelo (2-4 °C), por 10 minutos e centrifugada, por 5 minutos, a 3000 x *g*. A absorvância do sobrenadante obtido foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. Dessa forma, N-acetilglicosamina foi quantificada, convertendo-se a absorvância a 545 nm em µg/mg de células de N-acetilglicosamina, por meio de uma curva padrão, utilizando solução aquosa contendo 0-200 µg de N-acetilglicosamina por mililitro (ANEXO 1).

### **2.2.3. Detecção de espécies reativas de oxigênio**

A detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células de *K. lactis* foi realizada pela coloração com Dihidrorodamina 123 (DHR), descrita por MADEO *et al.* (1999) e KITAGAKI *et al.* (2007).

As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas. Após centrifugação a 10.000 x *g*, por 10 minutos, a 4 °C, o sedimento de massa celular obtido foi lavado por duas vezes com 0,9 % de solução salina e ressuspensionado em 1 mL da mesma solução. A uma suspensão de 10<sup>6</sup> células foi adicionado 0,5 µL de Dihidrorodamina 123 (10 µg.mL<sup>-1</sup>). Após incubação, por 2 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 0,9 % de solução salina e ressuspensionadas em 300 µL de

0,9 % de solução salina, em tubos de poliestireno, para a leitura dos dados em citômetro de fluxo.

Lâminas microscópicas, previamente tratadas com poli-lisina, foram preparadas, utilizando 10 µL da suspensão de células marcadas com Dihidrorodamina 123, e observadas em microscópio confocal.

#### **2.2.4. Apoptose por externalização de fosfatidilserina**

A externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática das células de *K. lactis* foi detectada pela coloração com Anexina V (APOAF - *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*, Sigma Aldrich®), descrita por MADEO *et al.* (1997).

As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas. Após centrifugação a 10.000 x *g*, por 10 minutos, a 4 °C, o sedimento de massa celular obtido foi lavado por duas vezes com 0,9 % de solução salina e ressuspendido em 1 mL da mesma solução. A uma suspensão de 10<sup>6</sup> células foram adicionados 300 µL de tampão de ligação do Kit, diluído dez vezes em água mili Q, em tubos de poliestireno. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de Anexina V-FITC e 5 µL de iodeto de propídeo. Rapidamente, foi feita homogeneização em vórtex. A partir dessa etapa, os tubos foram incubados, à temperatura ambiente, por 10 minutos, ao abrigo da luz. Após o término do período de incubação, a leitura dos dados foi realizada em citômetro de fluxo.

Lâminas microscópicas, previamente tratadas com poli-lisina, foram preparadas, utilizando 10 µL da suspensão de células marcadas com Anexina-FITC, e observadas em microscópio confocal.

#### **2.2.5. Apoptose por condensação da cromatina e fragmentação do DNA**

A observação da condensação da cromatina e da fragmentação do DNA das células de *K. lactis* foi realizada pela coloração com DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol), descrita por MADEO *et al.* (1997).

As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas. Após centrifugação a 10.000 x *g*, por 10 minutos, a 4 °C, o sedimento de massa celular obtido foi lavado por duas vezes com 0,9 % de solução salina e ressuspendido em 1 mL da mesma solução. Uma suspensão

de  $10^6$  células foi misturada com 3 volumes de etanol 70 %. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 20  $\mu\text{L}$  de solução de DAPI ( $0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ).

Lâminas microscópicas, previamente tratadas com poli-lisina, foram montadas, utilizando 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de células marcadas com DAPI, e observadas em microscópio de fluorescência.

#### **2.2.6. Técnica de TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*)**

A fragmentação do DNA das células de *K. lactis* foi realizada pela técnica de TUNEL, descrita por MADEO *et al.* (1997) e RIBEIRO *et al.* (2006). Foi utilizado o Kit de detecção de apoptose APOBRDU (Invitrogen®).

As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas. Após centrifugação a  $10.000 \times g$ , por 10 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , o sedimento de massa celular obtido foi lavado por duas vezes com 0,9 % de solução salina e ressuspendido em 1 mL da mesma solução. Para a fixação das células, uma suspensão de  $10^6$  células foi adicionada de 3,7 % de paraformaldeído em PBS (pH 7,4), seguida de incubação, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) e, posteriormente, as paredes celulares foram digeridas com 20  $\mu\text{L}$  de liticase ( $1 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$ ), por 1 hora, a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,4). Para a permeabilização das células, as mesmas foram incubadas em solução de permeabilização (0,1 % de Triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio dissolvido em PBS, pH 7,4), por 2 minutos, em gelo. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,4) e ressuspensas em 1 mL de *Wash Buffer*. Posteriormente, as células foram centrifugadas a  $3000 \times g$ , por 5 minutos, ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de *DNA Labeling Solution* (10  $\mu\text{L}$  de *TdT Reaction Buffer*, 0,75  $\mu\text{L}$  de *TdT Enzyme*, 8  $\mu\text{L}$  de Br-dUTP e 32,25  $\mu\text{L}$  de água destilada) e incubadas por 1 hora, a  $37^\circ\text{C}$ . A cada 15 minutos, as células foram homogeneizadas. Após o período de incubação, foi adicionado 1 mL de *Rinse Buffer*. Em seguida, as células foram centrifugadas a  $3000 \times g$ , durante 5 minutos, ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de *Antibody Solution* (5  $\mu\text{L}$  de

FITC~antiBrdU mAb e 95  $\mu$ L de *Rinse Buffer* e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após término do período de incubação, foram adicionados 150  $\mu$ L de Iodeto de Propídeo/RNase A *Solution* (frasco âmbar) e as células foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após o término do período de incubação, a leitura dos dados foi realizada em citômetro de fluxo.

Lâminas microscópicas, previamente tratadas com poli-lisina, foram montadas, utilizando 10  $\mu$ L da suspensão de células marcadas com antiBrdU-FITC, e observadas em microscópio confocal.

#### **2.2.7. Eletroforese em campo pulsado (*pulsed field*)**

A fragmentação do DNA de células apoptóticas de *K. lactis* foi realizada por eletroforese em campo pulsado, descrita por SOR & FUKUHARA (1989), O'SULLIVAN *et al.* (1998) e KITAGAKI *et al.* (2007), com modificações.

Uma suspensão de  $10^6$  células das culturas de *K. lactis* conduzidas nos cultivos contínuos e da cultura controle foram lavadas duas vezes em 0,05 M de EDTA (pH 8,0), ressuspensas em 3 mL de 250 mM de acetato de lítio e incubadas, sob agitação, por 4 horas, a 30 °C. Em seguida, as células foram novamente lavadas duas vezes em EDTA. Para a preparação dos blocos (*plugs*), a agarose foi preparada a uma concentração de 1,4 % em 0,125 M de EDTA (pH 8,0), fundida e colocada em banho-maria, a 42 °C, até o uso. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 250  $\mu$ L da suspensão de células e 250  $\mu$ L da agarose “Low Gelling” Tipo VII (Sigma®) fundida, e alíquotas de 100  $\mu$ L foram colocadas na cuba molde. O molde foi incubado a 4 °C, por 20 minutos e, em seguida, os blocos foram retirados e colocados em tampão NDS (18,6 g de EDTA em 80 mL de água destilada, 10 mL de N-laurilsarcosinato a 10 %, 1 mL de Tris-HCL a 1 M, pH 9,5, e 1,0 mg/mL de proteinase K, no momento do uso), sendo incubados a 50 °C, durante a noite (*overnight*). Após o período de incubação, os blocos foram lavados três vezes em 0,05 M de EDTA (pH 8,0), durante 15 minutos, à temperatura ambiente, e estocados em 0,05 M de EDTA, (pH 8,0), a 4 °C. Para a preparação do gel para a corrida, 1 g de agarose *Pulsed Field Certified* (BIO-RAD®) foi fundido em 100 mL de tampão TBE 0,5 X (5X: 54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de

EDTA a 0,5 M, pH 8,0, e 1000 mL de água mili Q). A agarose fundida foi esfriada, durante 10 minutos, e vertida na cuba molde. Os blocos de agarose foram cuidadosamente colocados nas canaletas formadas após a retirada do pente, sendo devidamente identificados. As canaletas foram vedadas com agarose, para evitar a saída dos blocos. A corrida do gel foi realizada no equipamento CHEF-DR<sup>®</sup> III System BIO-RAD, com os seguintes parâmetros: bloco 1 (voltagem de 3 V/cm, ângulo de 120 ° e pulsos de 300 a 500 segundos por 50 horas, temperatura de 10 °C), bloco 2 (voltagem de 4,5 V/cm, ângulo de 120 ° e pulsos de 80 a 120 segundos por 22 horas, temperatura de 10 °C), num total de 72 horas. Ao final da corrida, o gel foi mergulhado numa solução de água destilada com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, por 30 minutos, e descorado com água destilada, por 15 minutos. O gel foi observado e fotografado em Eagle Eye II.

#### **2.2.8. Determinação das dimensões celulares de *Kluyveromyces lactis***

Para estimar o tamanho das células de *K. lactis* em função do envelhecimento das culturas, foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics Inc., Maryland/USA). As amostras coletadas dos cultivos contínuos e da cultura controle foram analisadas com 25 medições para cada amostra.

#### **2.3. Citometria de fluxo**

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração e na Plataforma de Citometria de Fluxo do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ Minas/BH. A leitura dos dados foi feita no citômetro de fluxo (FACScan<sup>®</sup>, Becton Dickinson, USA), equipado com a fonte de laser - argônio (488 nm) e os seguintes canais de detecção de fluorescência: FL1 (fluorescência do Tipo 1 - verde), FL2 (fluorescência do Tipo 2 - laranja) e FL3 (fluorescência do Tipo 3 - vermelha). Foram coletados 20.000 eventos para cada amostra, em triplicata. O programa FlowJo versão 7.6.1 (TreeStar Inc., Ashland, USA) foi usado para realizar a análise dos dados.

Nos gráficos de distribuição pontual obtidos foi avaliado o tamanho celular (FSC) *versus* a granulosidade (SSC), onde foi selecionada a população

de interesse: leveduras. Após a seleção da população de interesse, a mesma foi avaliada por análise da intensidade de fluorescência por meio de gráficos de intensidade FL3 (azul de Tripán), FL1 (Alexa Flúor 488 e Dihidrorodamina 123), FL1 (Anexina-FITC) *versus* FL3 (PI) e FL1 (antiBrdU-FITC) *versus* FL3 (PI).

#### **2.4. Microscopia de fluorescência**

As lâminas montadas foram observadas em microscópio Olympus® BX 50 V-LH 100HG com fonte de fluorescência BH2-RFL-T3, utilizando uma faixa de comprimento de onda de excitação de 450-520 nm e aumento de 400 vezes. As imagens foram capturadas com câmera digital modeQ Color 3 (Q20868) e processadas com os programas Qimaging e Qcapture Pro 6.0.Z, no Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO/UFV).

#### **2.5. Microscopia confocal**

As lâminas montadas foram observadas em microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser, modelo LSM 510 META (Carl Zeiss®, Germany), equipado com as fontes de laser - argônio (488 nm) e hélio (633 nm), e utilizando aumento de 100 vezes. As imagens foram capturadas com câmera digital AxioCam HRm e processadas com o programa LSM Image Examiner, no Núcleo de Microscopia e Microanálise (CCB/UFV).

#### **2.6. Detecção de alcoóis aromáticos em culturas de *Kluyveromyces lactis***

A produção de alcoóis aromáticos (triptofol, feniletanol e tirosol) pelas culturas contínuas e pela cultura controle de *K. lactis* foi acompanhada pela medida da concentração dos compostos no sobrenadante das culturas. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo Dionex, modelo Ultimate 3000, com detector ultravioleta (260 nm), utilizando uma coluna de fase reversa C18 (tamanho da partícula = 5 µm e dimensões de 150 X 4,6 mm). O eluente foi acetonitrila, em gradiente de 10 a 15 %, para eluição do tirosol, e de 30 a 35 %, para eluição do feniletanol e triptofol, com fluxo de 0,9 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção de cada amostra, em triplicata, foi de 20 µL. As concentrações dos alcoóis aromáticos foram medidas, mediante a comparação delas com as dos padrões externos preparados nas concentrações de 0 a 200 µM (ANEXO 2).

### **2.7. Análise estatística**

Para constatar diferenças significativas entre os dados analisados, foi aplicado o Teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (programa Assistat versão 7.6 beta - DEAG/CTRN/UFCG, Paraíba/Brasil).



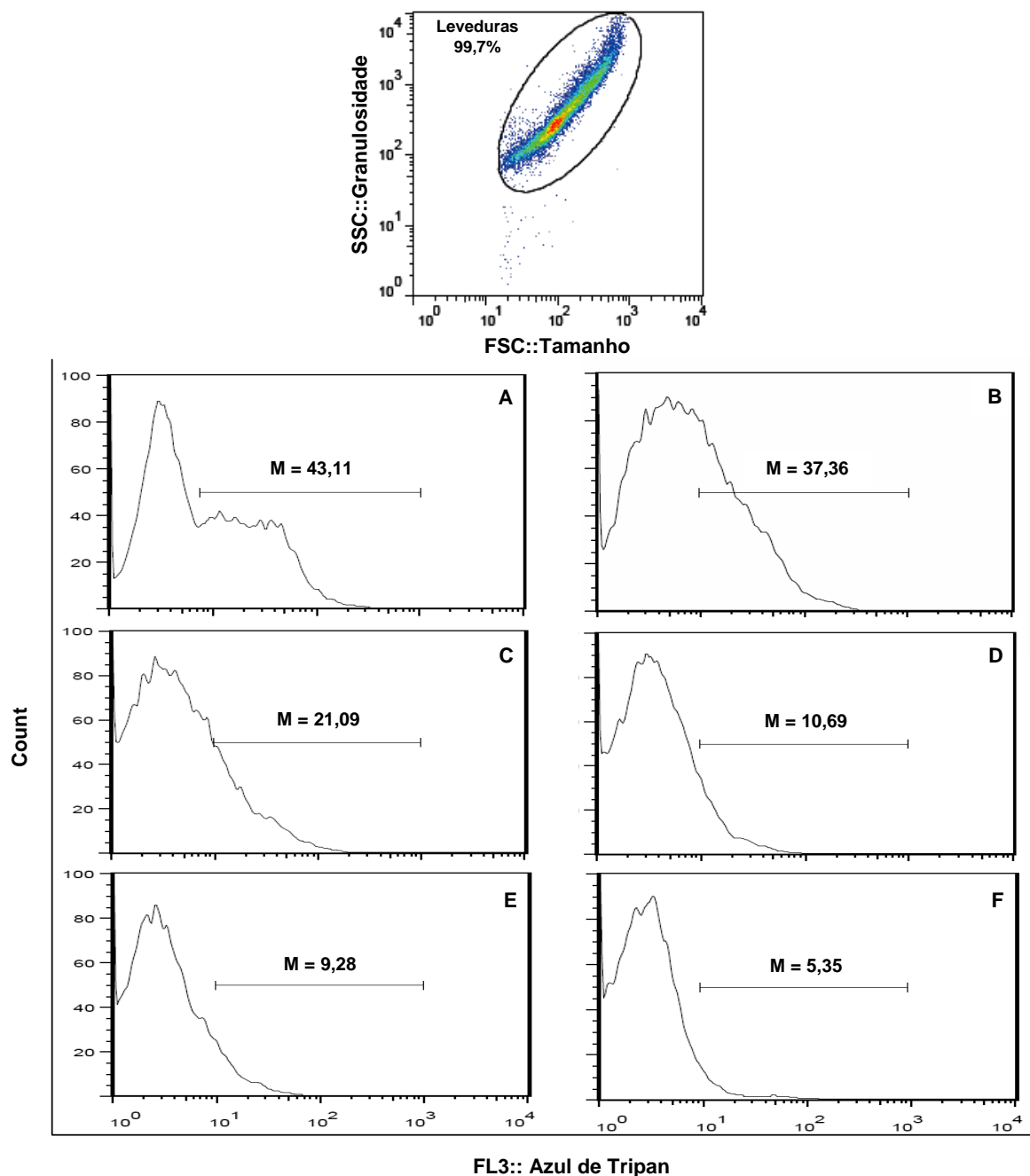
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Envelhecimento de *Kluyveromyces lactis* em culturas contínuas sob limitação por nitrogênio

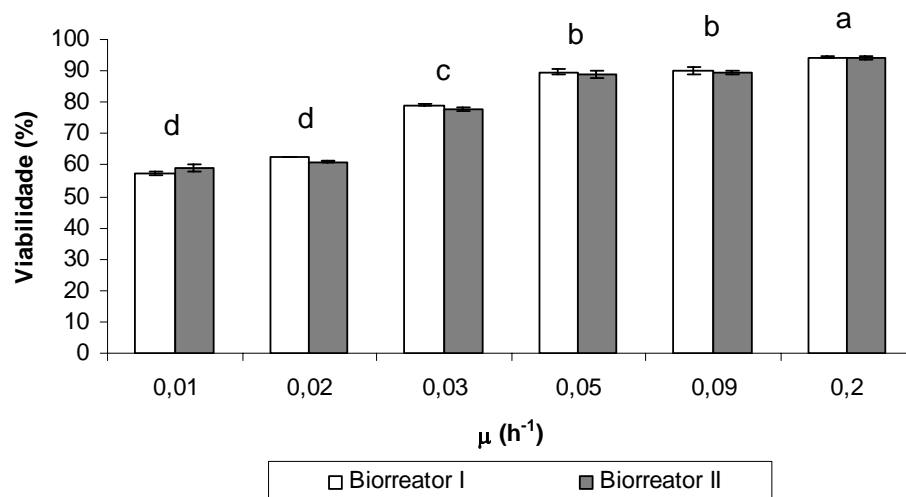
O envelhecimento de *K. lactis* em culturas contínuas sob limitação por nitrogênio e da cultura controle foi verificado pelas análises de: viabilidade celular, cicatrizes celulares e concentração de quitina, espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose por externalização da fosfatidilserina e por fragmentação do DNA, dimensões celulares e detecção de alcoóis aromáticos nas culturas da levedura.

##### 3.1.1. Viabilidade celular de culturas de *Kluyveromyces lactis*

A viabilidade celular de *K. lactis* conduzida sob cada velocidade de crescimento e da cultura controle foi determinada. A Figura 1A-F representa a análise realizada para a determinação da viabilidade, nessas condições, por citometria de fluxo, utilizando o corante vital azul de Tripan. O perfil da população e a porcentagem de leveduras que foram coradas com azul de Tripan (células não-viáveis) estão representadas. A Figura 2 apresenta as porcentagens de viabilidade para cada velocidade de crescimento, nos biorreatores I e II. Nas condições mais intensas de limitação por nitrogênio, isto é, nas menores velocidades de crescimento ( $\mu = 0,01$  e  $0,02 \text{ h}^{-1}$ ) foi observada uma redução de aproximadamente 35 % na viabilidade das células de *K. lactis*, quando comparada com as condições de limitação por nitrogênio menos severas, ou seja, nas velocidades de crescimento de  $0,09$  e  $0,2 \text{ h}^{-1}$ . A viabilidade celular de *K. lactis*, conduzida sem limitação por nitrogênio ( $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$ ) foi de 98,03 %, equivalente à porcentagem de viabilidade de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, na maior velocidade de crescimento ( $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ).



**Figura 1:** Perfil celular representativo da população de *K. lactis* (leveduras), conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Porcentagem de células coradas com azul de Tripan (M). **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 2:** Porcentagem de viabilidade celular de populações de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



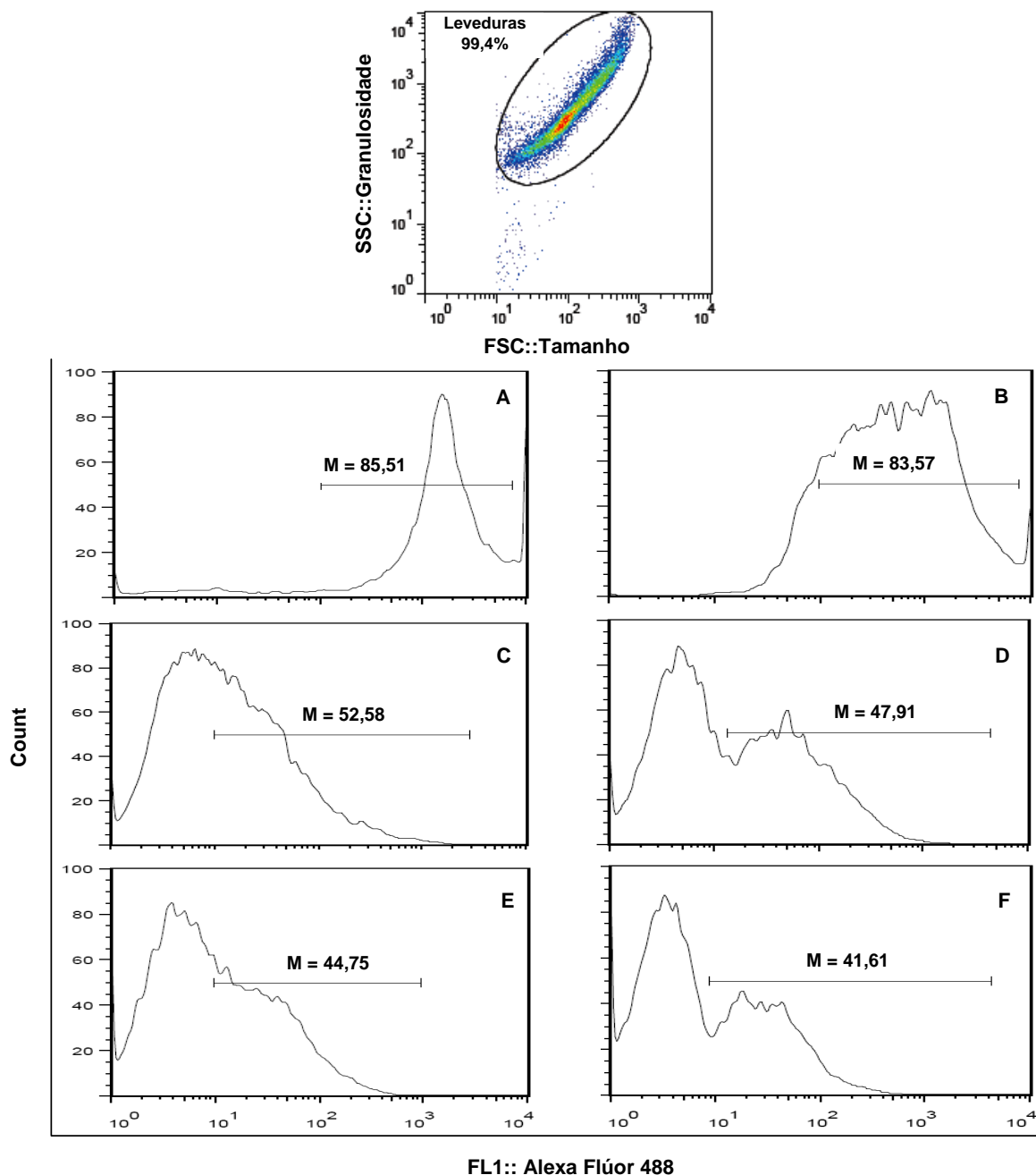
### 3.1.2. Cicatrizes celulares e concentração de quitina de culturas de *Kluyveromyces lactis*

A presença de cicatrizes celulares e a concentração de quitina na parede celular de culturas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, e da cultura controle foram analisadas. A Figura 3A-F apresenta a análise realizada para a determinação de cicatrizes celulares, por citometria de fluxo, utilizando o fluorocromo Alexa Flúor 488. O perfil da população e a porcentagem de leveduras que foram marcadas com Alexa Flúor 488 (células com presença de cicatrizes) estão representados. A Figura 4 mostra as porcentagens de cicatrizes celulares para cada velocidade de crescimento, nos biorreatores I e II. A Figura 5A-F demonstra a marcação (emissão de fluorescência verde) das cicatrizes na parede celular de *K. lactis*, nas mesmas condições.

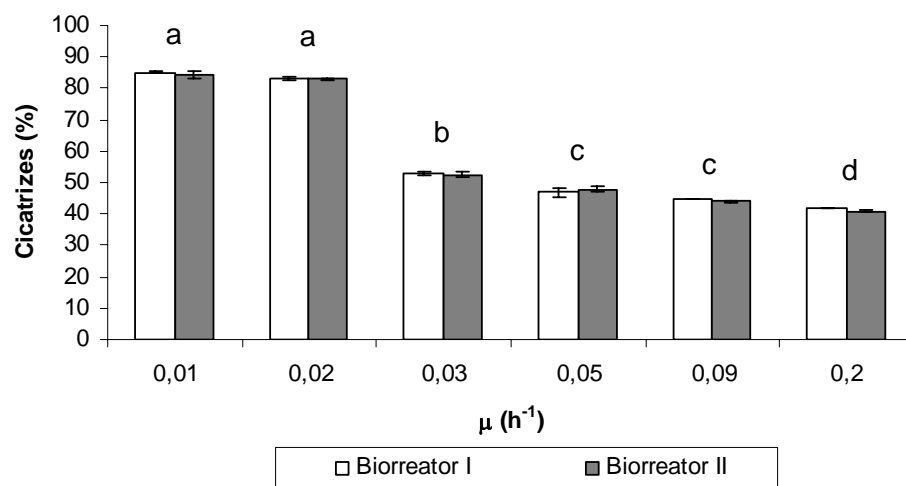
Foi constatado que sob as menores velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup>, a porcentagem de cicatrizes detectadas (~86 e ~84 %) foi maior do que na população de células sob as maiores velocidades de crescimento de 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>, cujas porcentagens foram ~45 e ~42 %, respectivamente. Sem condições de limitação por nitrogênio, a porcentagem de cicatrizes de *K. lactis* foi de 13,09 %.

A porcentagem de cicatrizes detectadas pode ser confirmada pela quantificação do conteúdo de quitina na parede celular de *K. lactis*, pela determinação espectrofotométrica de N-acetilglicosamina, uma vez que quitina é um polímero de N-acetilglicosamina. N-acetilglicosamina sob calor e solução alcalina é convertida em compostos heterocíclicos que reagem com *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DMAB), produzindo uma coloração rosa (KUMAR & HANSEN, 1972). A intensidade dessa cor é proporcional à concentração de N-acetilglicosamina e pode ser determinada por espectrofotometria, por se tratar de um método colorimétrico. A Figura 6 mostra a concentração de N-acetilglicosamina na parede celular de *K. lactis* nas diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio. Foi observado que as culturas conduzidas em velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup> também apresentaram maior concentração de N-acetilglicosamina (~33 e ~28 µg.mg<sup>-1</sup> de células) comparada com as culturas conduzidas nas velocidades de

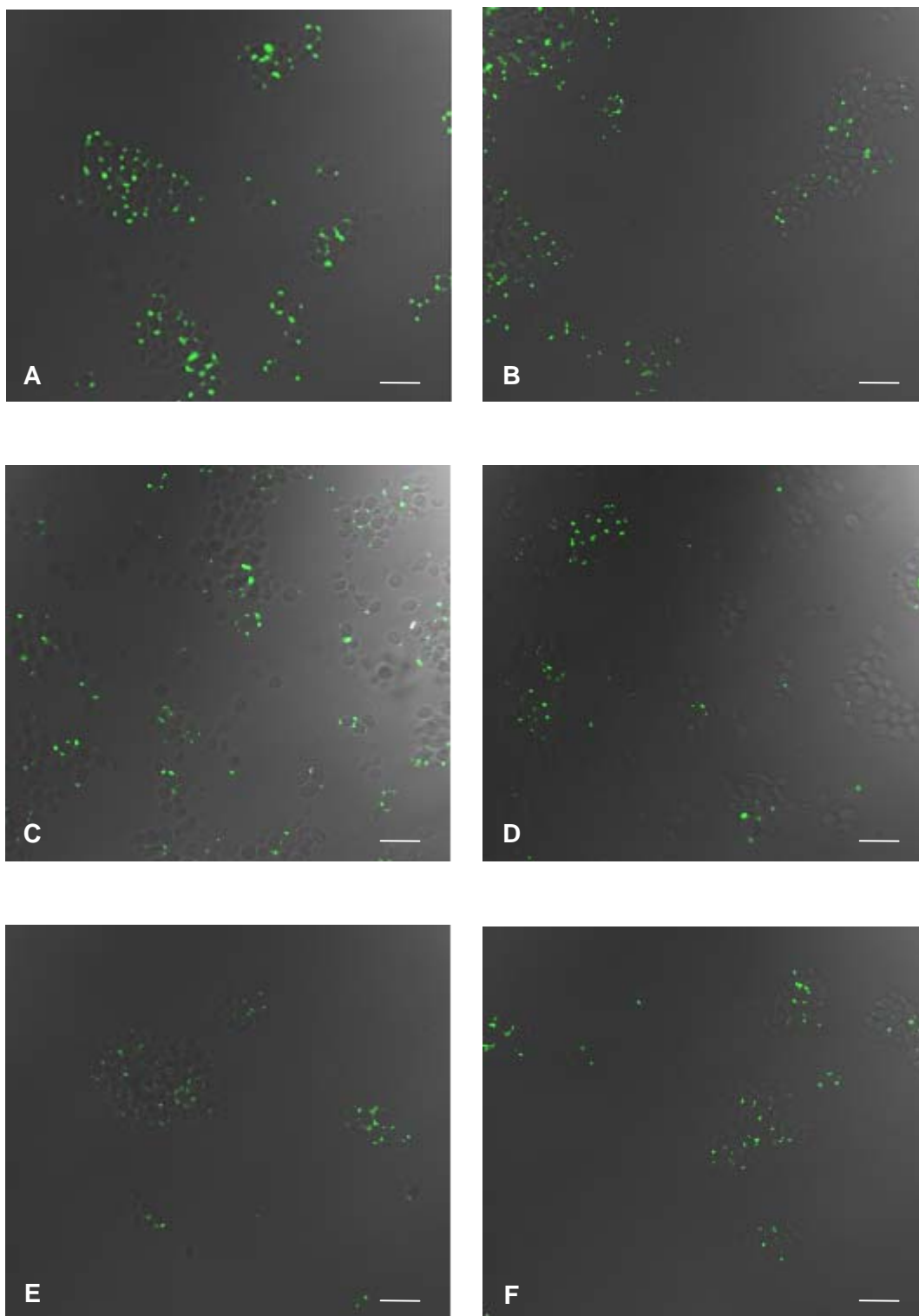
crescimento de 0,09 e 0,2h<sup>-1</sup> (~9 e ~5,5 µg.mg<sup>-1</sup> de células) e em culturas conduzidas sem limitação por nitrogênio (~9,5 µg.mg<sup>-1</sup> de células).



**Figura 3:** Perfil celular representativo da população de *K. lactis* (leveduras), conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Porcentagem de células marcadas com Alexa Flúor 488 (M). **(A)**  $\mu = 0,01$  h<sup>-1</sup>, **(B)**  $\mu = 0,02$  h<sup>-1</sup>, **(C)**  $\mu = 0,03$  h<sup>-1</sup>, **(D)**  $\mu = 0,05$  h<sup>-1</sup>, **(E)**  $\mu = 0,09$  h<sup>-1</sup>, **(F)**  $\mu = 0,2$  h<sup>-1</sup>.

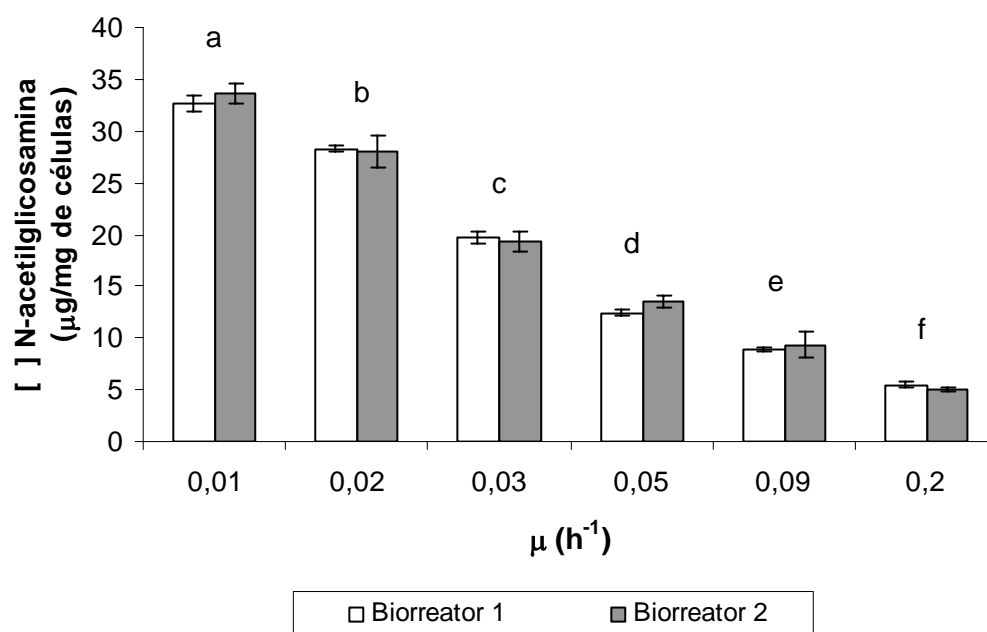


**Figura 4:** Porcentagem de cicatrizes celulares de populações de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 5:** Marcação com Alexa Flúor 488 de cicatrizes na parede celular de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ . Barras =  $5 \text{ }\mu\text{m}$ .



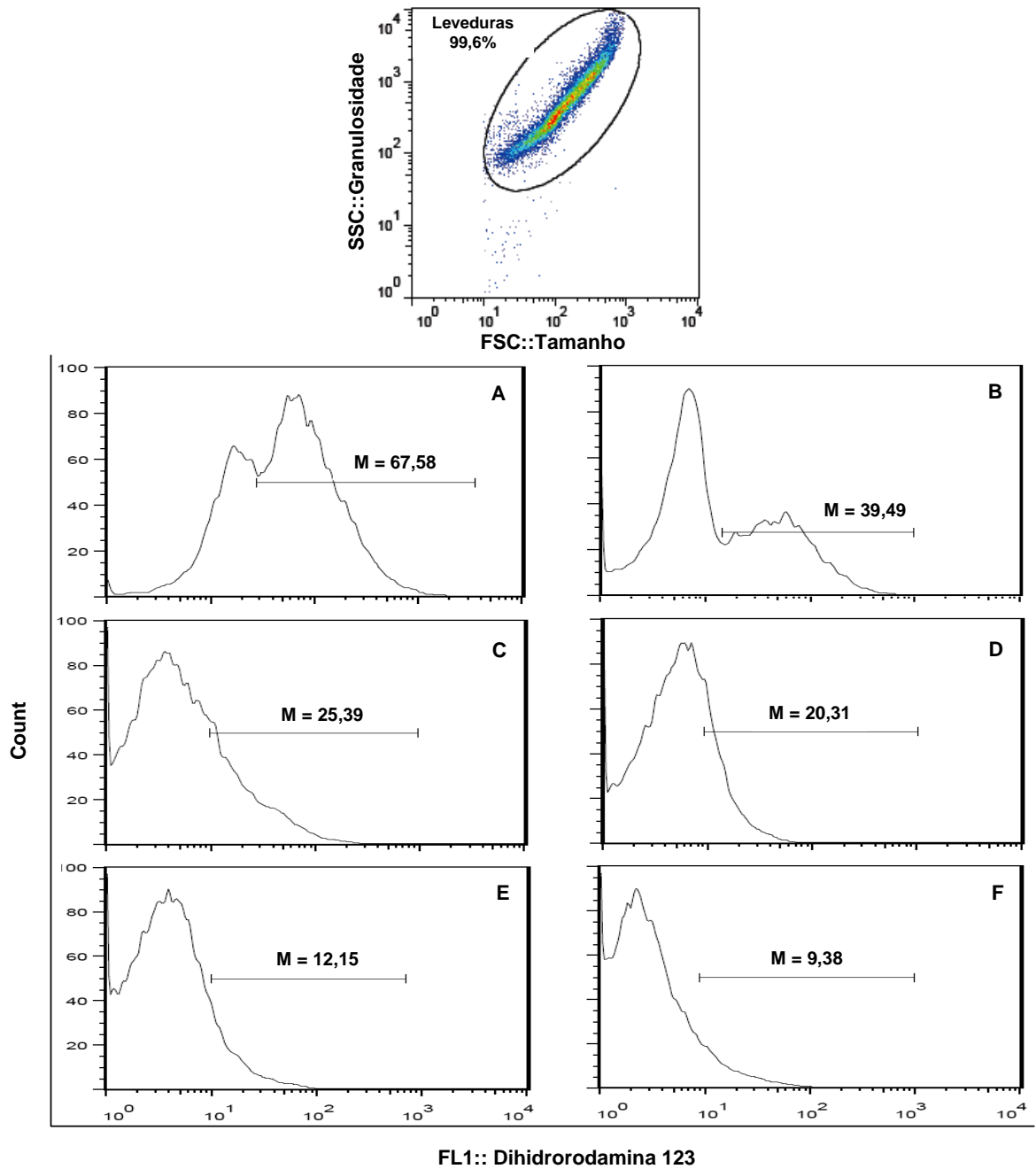


**Figura 6:** Concentração de N-acetilglicosamina ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de células) na parede celular de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

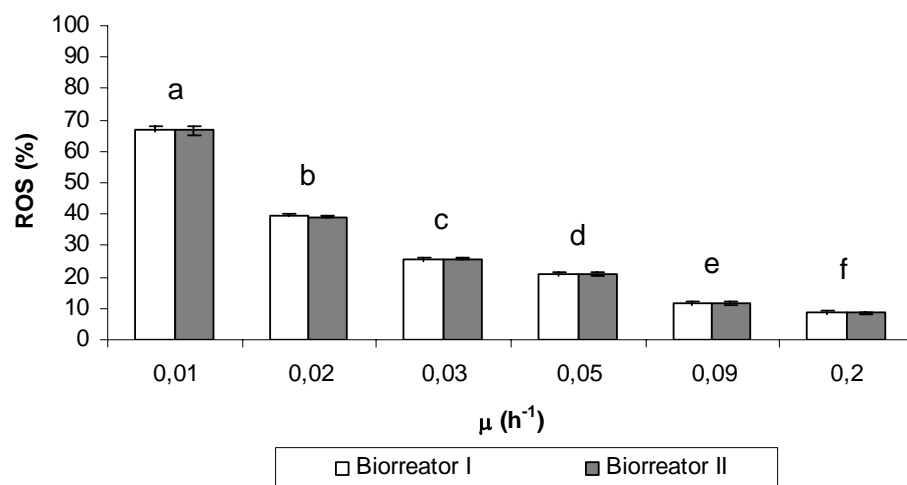
### 3.1.3. Detecção de espécies reativas de oxigênio em culturas de *Kluyveromyces lactis*

Espécies reativas de oxigênio (ROS) foram detectadas nas células de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, e da cultura controle, em diferentes proporções. A Figura 7A-F representa a análise realizada, por citometria de fluxo, utilizando o fluorocromo Dihidrorodamina 123. O perfil da população e a porcentagem de leveduras que foram marcadas com Dihidrorodamina 123 (células com presença de ROS) estão apresentadas. A Figura 8 mostra as porcentagens de ROS para cada velocidade de crescimento, nos biorreatores I e II. A Figura 9A-F demonstra a marcação (emissão de fluorescência verde) de ROS intracelulares em *K. lactis*, nas mesmas condições fisiológicas mencionadas.

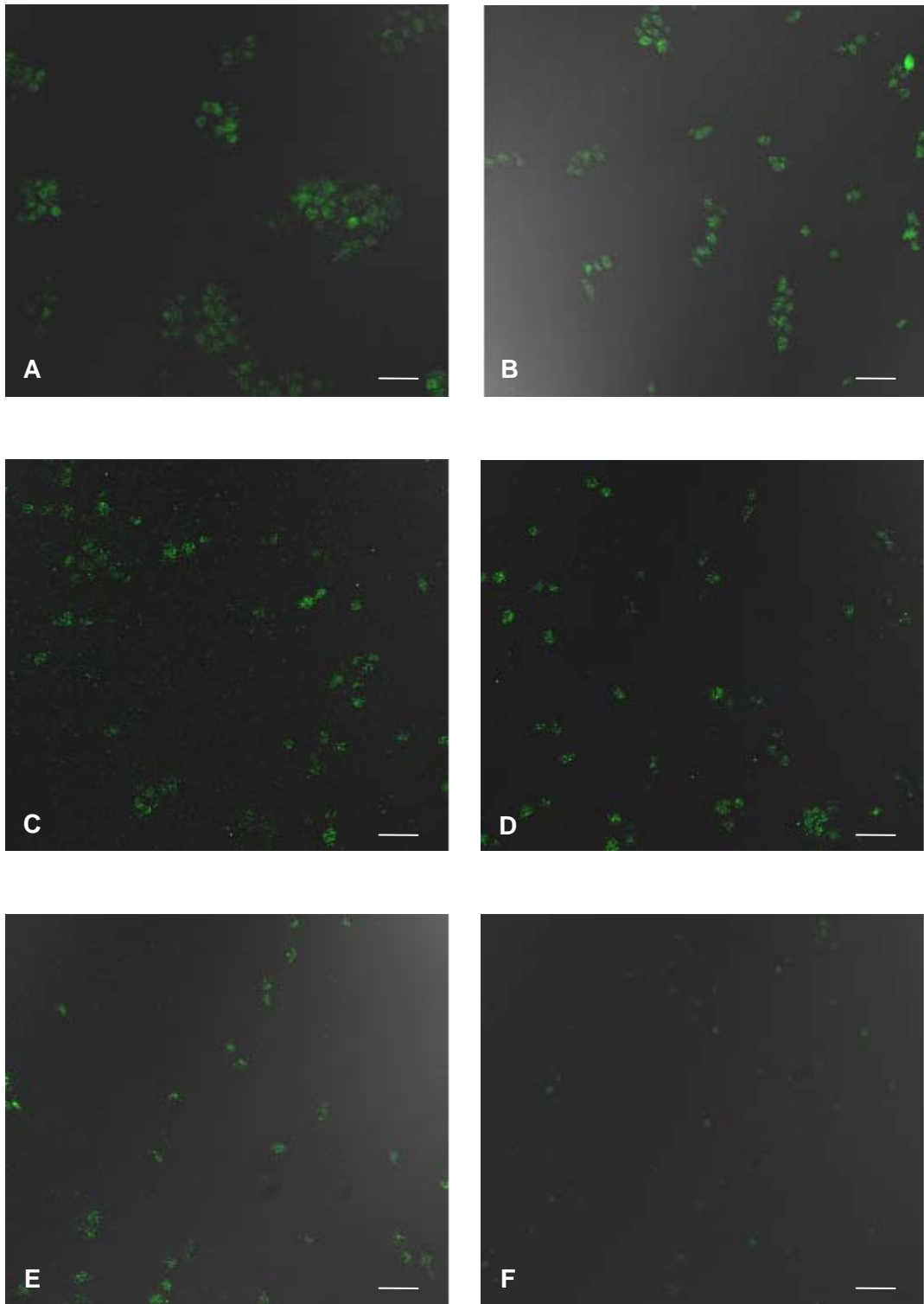
Como observado, as células das culturas contínuas de *K. lactis*, sob a menor velocidade de crescimento ( $0,01 \text{ h}^{-1}$ ) e sob a condição limitante de nitrogênio mais intensa, apresentou maior porcentagem de ROS (~68 %) do que sob a maior velocidade de crescimento ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ), cuja porcentagem de ROS foi aproximadamente 9,5 %. Para culturas conduzidas sem condições de limitação por nitrogênio, a porcentagem de ROS foi de 10,4 %.



**Figura 7:** Perfil celular representativo da população de *K. lactis* (leveduras), conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Porcentagem de células marcadas com Dihidrorodamina 123 (M). **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 8:** Porcentagem de ROS de populações de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 9:** Marcação com Dihidrorodamina 123 de espécies reativas de oxigênio intracelulares de *K. lactis* conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ . Barras = 5  $\mu\text{m}$ .

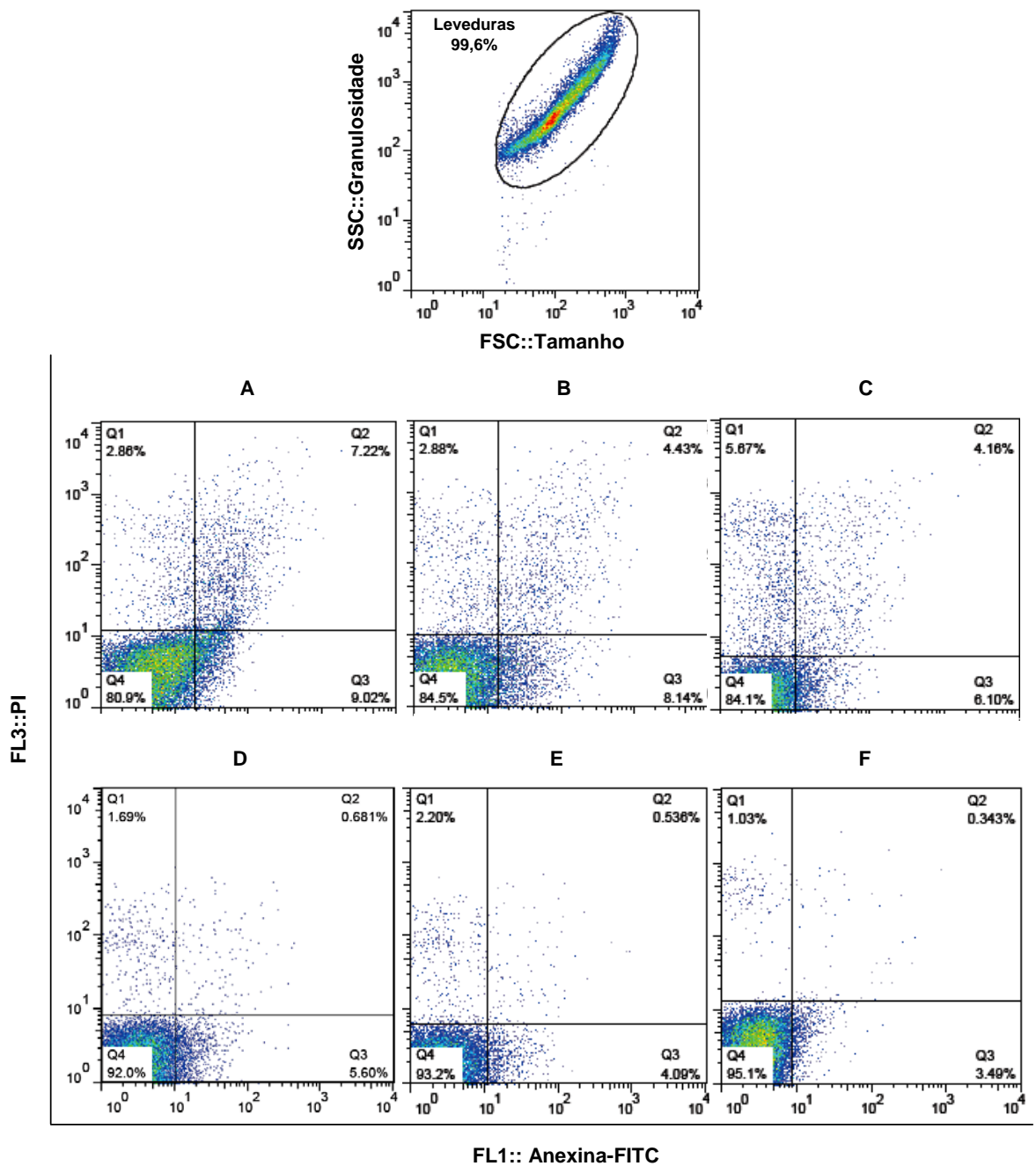
### 3.1.4. Apoptose por externalização de fosfatidilserina, condensação e fragmentação do DNA em células de culturas de *Kluyveromyces lactis*

A presença de características morfológicas de apoptose nas células de *K. lactis* das culturas contínuas, sob limitação por nitrogênio, e da cultura controle foi realizada pelas colorações Anexina V e DAPI e as técnicas de TUNEL e eletroforese em campo pulsado.

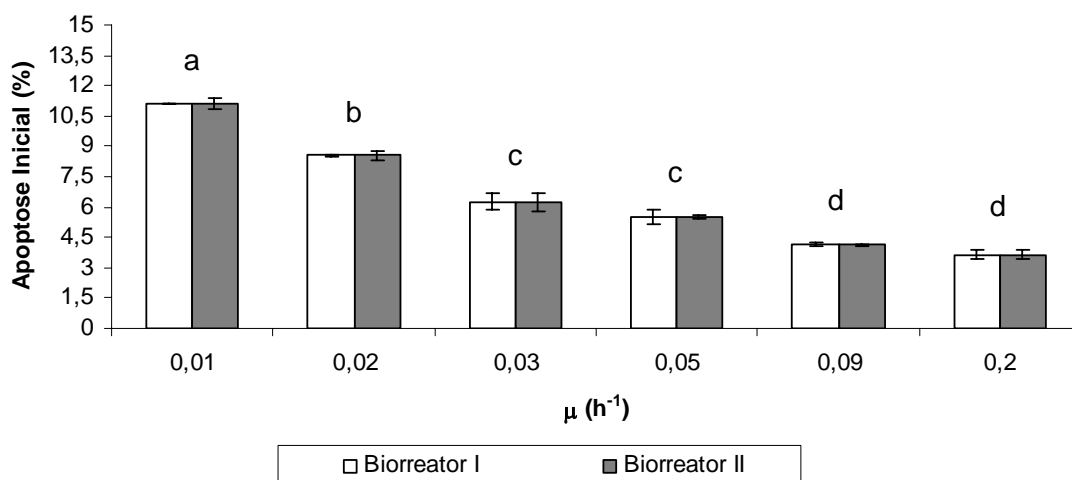
A Figura 10A-F demonstra a análise realizada para a detecção de apoptose por externalização de fosfatidilserina, por citometria de fluxo, utilizando o Anexina-FITC e iodeto de propídeo (PI). Anexina V pertence a uma classe de proteínas dependentes de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e possui habilidade de ligar-se a fosfolipídios ácidos, como a fosfatidilserina. Normalmente, esse fosfolipídeo encontra-se na parte interna da membrana plasmática. Porém, no estágio de apoptose inicial a fosfatidilserina é translocada para a parte externa da membrana, levando a exposição desse fosfolipídeo, o qual pode ser reconhecido pela Anexina V (HAYES *et al.*, 2004).

O perfil da população e a porcentagem de leveduras que foram marcadas com Anexina-FITC (células em apoptose inicial), com Anexina-FITC e PI (células em apoptose tardia) e com PI (células em necrose) estão representadas no terceiro (Q3), segundo (Q2) e primeiro quadrante (Q1), respectivamente. As Figuras 11 e 12 mostram as porcentagens de células em apoptose inicial e tardia, para cada velocidade de crescimento, nos biorreatores I e II. A Figura 13A-F apresenta a marcação (emissão de fluorescência verde) das células de *K. lactis*, em apoptose inicial, em cada condição fisiológica.

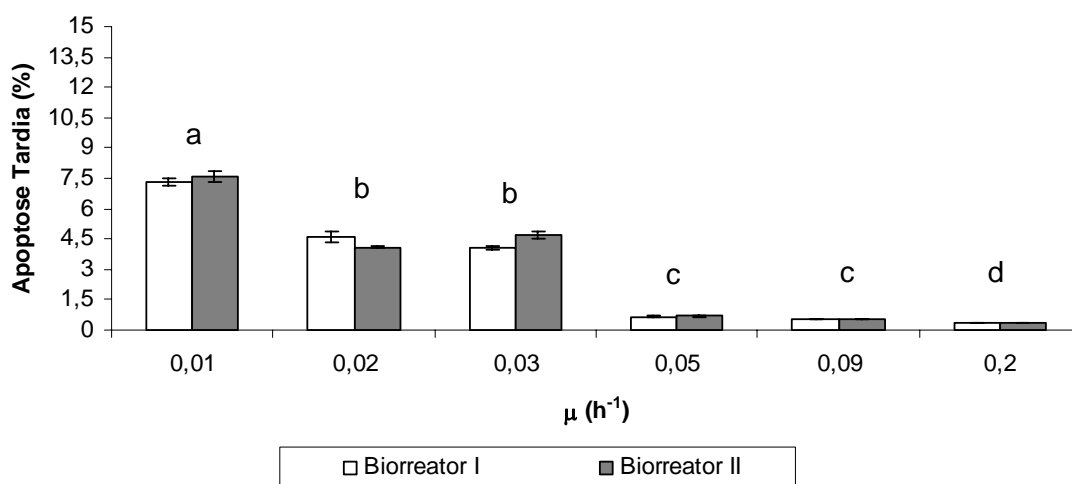
Considerando a população de células da levedura analisada, a porcentagem de células em processo de apoptose inicial e tardia não foi alta, variando entre 11 a 3,7 % e 7,6 a 0,35 %, respectivamente, dentro das velocidades de crescimento avaliadas. No entanto, a porcentagem de células em apoptose inicial foi maior do que em apoptose tardia. Nesse contexto, sob as menores velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02  $\text{h}^{-1}$ , a porcentagem de células em apoptose inicial (~10 e ~8 %) foi maior do que na população de células sob as maiores velocidades de crescimento de 0,09 e 0,2  $\text{h}^{-1}$  (~4,1 e ~3,5%). Nas condições de crescimento sem limitação por nitrogênio, a porcentagem de células de *K. lactis* em apoptose inicial e tardia foi de 1,74 e 2,32 %, respectivamente.



**Figura 10:** Perfil celular representativo da população de *K. lactis* (leveduras), conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Porcentagem de células marcadas com Anexina-FITC (Q3), Anexina-FITC e PI (Q2) e PI (Q1), em gráfico de FL1 (Anexina-FITC) versus FL3 (PI). **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .

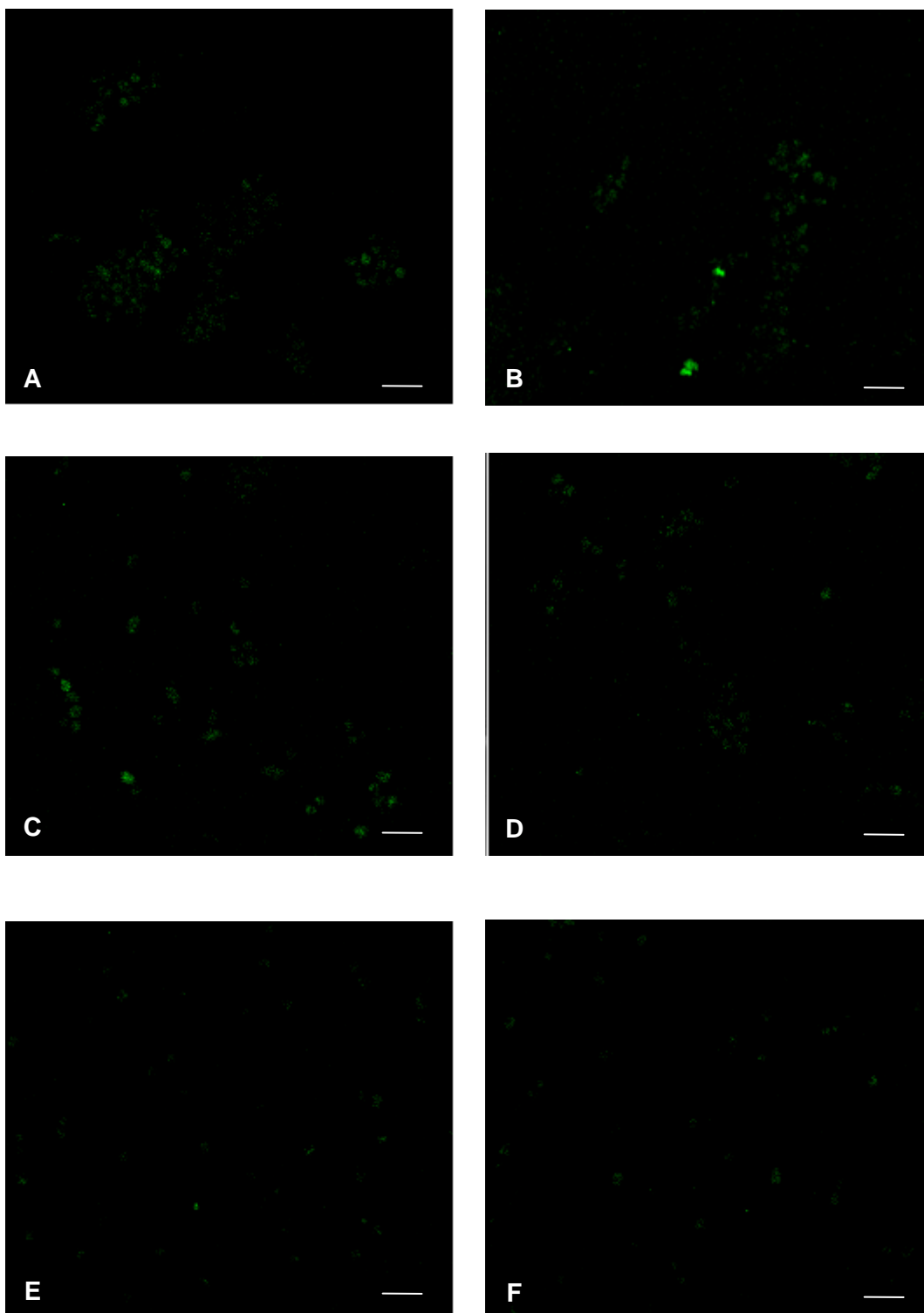


**Figura 11:** Porcentagem de apoptose inicial de populações de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 12:** Porcentagem de apoptose tardia de populações de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.





**Figura 13:** Marcação com Anexina-FITC de células de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. em apoptose inicial. **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ . Barras = 5  $\mu\text{m}$ .

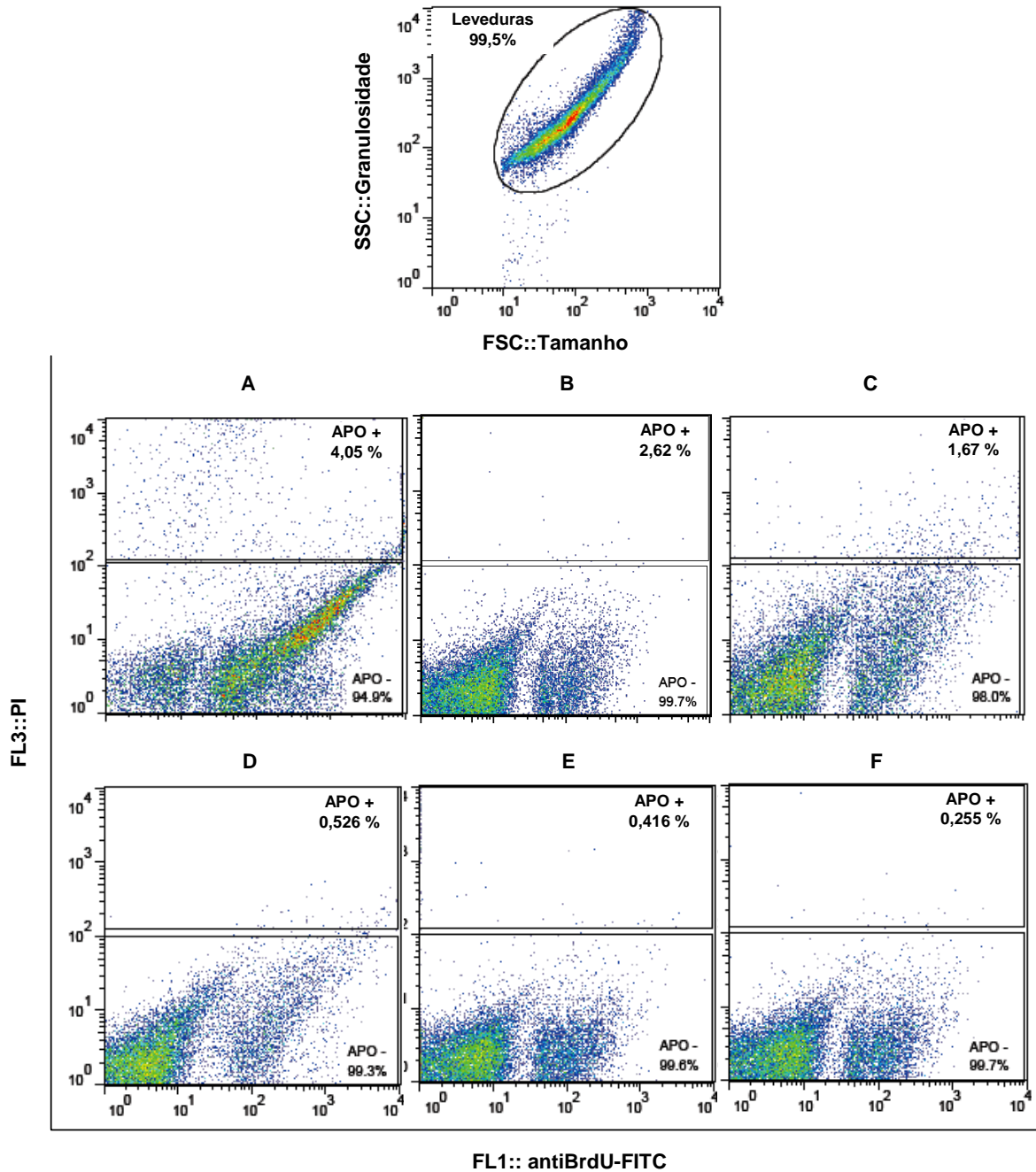
A Figura 14A-F apresenta a análise realizada para a detecção de apoptose por fragmentação do DNA, por citometria de fluxo, utilizando antiBrdU-FITC e iodeto de propídeo (PI). Extremidades 3'-OH do DNA fragmentado de células apoptóticas são reconhecidas pelo nucleotídeo trifosfato de deoxiuridina bromolato (Br-dUTP). A enzima deoxinucleotidil transferase (TdT) catalisa a adição de deoxiribonucleosídeos trifosfatos nas extremidades 3'-OH (ESCHENFELDT *et al.*, 1987). Assim, anticorpos monoclonais específicos contra BrdUTP (antiBrdU) são conjugados a fluorocromos (FITC) para atuarem como sondas moleculares que permitem a detecção das células que apresentam DNA fragmentado marcado com BrdUTP (GRATZNER, 1982).

O perfil da população e a porcentagem de leveduras que foram marcadas com antiBrdU-FITC (células apoptóticas) e não marcadas com antiBrdU-FITC (células não apoptóticas) estão representadas nos quadrantes (APO<sup>+</sup>) e (APO<sup>-</sup>), respectivamente. A Figura 15 mostra as porcentagens de células apoptóticas por fragmentação do DNA, para cada velocidade de crescimento, nos biorreatores I e II. A Figura 16A-F demonstra a marcação (emissão de fluorescência verde) das células apoptóticas de *K. lactis*, além da condensação e fragmentação do DNA por marcação com DAPI (emissão de fluorescência azul), nas mesmas condições.

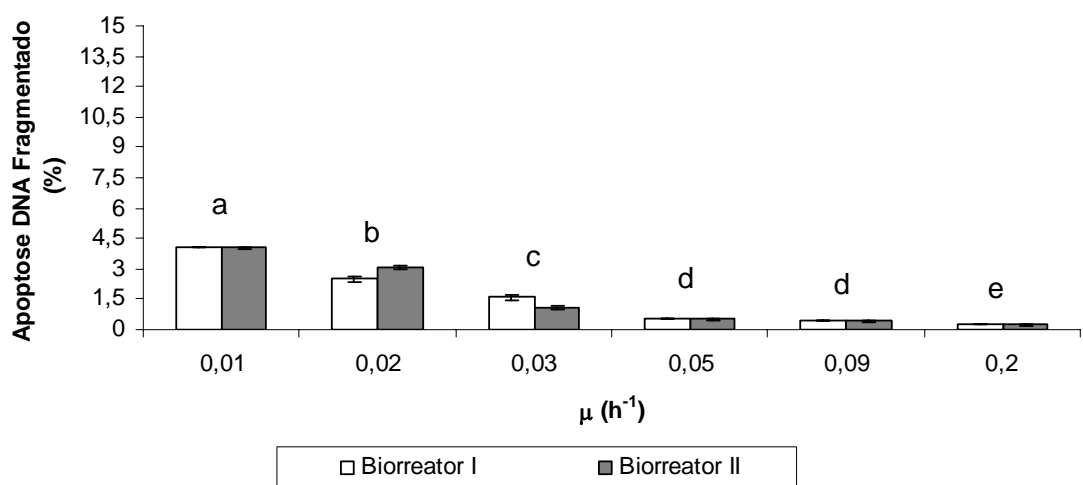
Em concordância com a análise de apoptose por externalização de fosfatidilserina, a porcentagem de células apoptóticas por fragmentação do DNA foi baixa, variando entre 4 a 0,3 %, em todas as velocidades de crescimento avaliadas. Porém, a porcentagem de células apoptóticas foi maior nas menores velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup>, cujos valores foram: ~4 e ~3 %, respectivamente. A porcentagem de células apoptóticas de *K. lactis*, em condições não limitantes por nitrogênio, foi de 0,083 %.

Uma vez que a fragmentação do DNA de células apoptóticas de leveduras pode ser averiguada pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), esta foi realizada. A Figura 17 mostra o perfil eletroforético de culturas contínuas de *K. lactis* conduzidas sob as diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio. Em cada condição avaliada, foi observada a presença de 5 bandas, que possivelmente representam 5 cromossomos, com 3,0; 2,6; 1,8; 1,5 e 1,1 Mb de tamanho. A maior intensidade

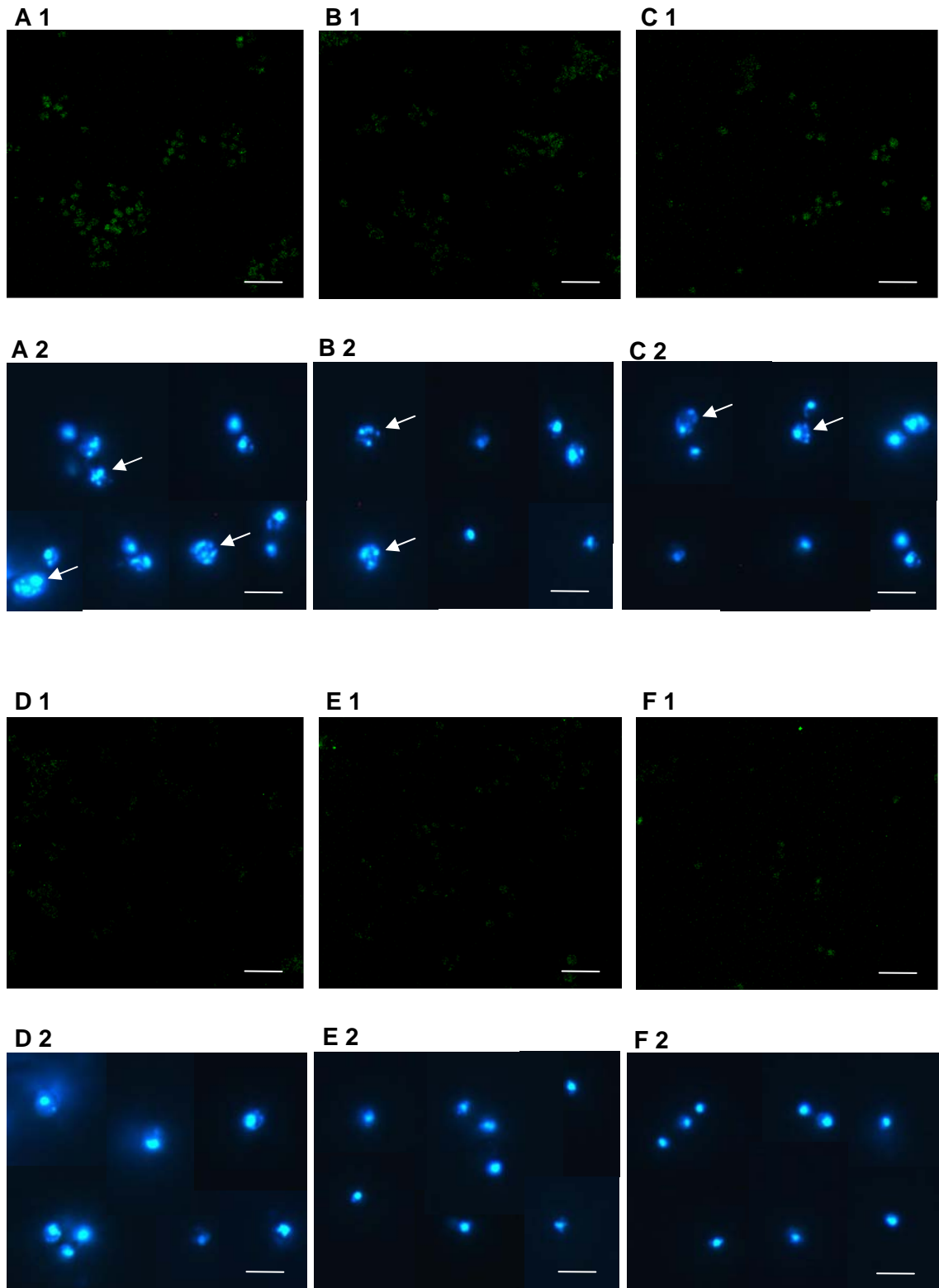
da banda de 2,6 Mb ou a presença de uma banda difusa abaixo dessa pode indicar uma co-migração e, conseqüentemente, a existência de mais um cromossomo na linhagem de *K. lactis*. Entretanto, não foi observado o padrão de fragmentação de DNA, típico de células apoptóticas, o que pode ser explicado pela baixa porcentagem de células apoptóticas por fragmentação de DNA obtida.



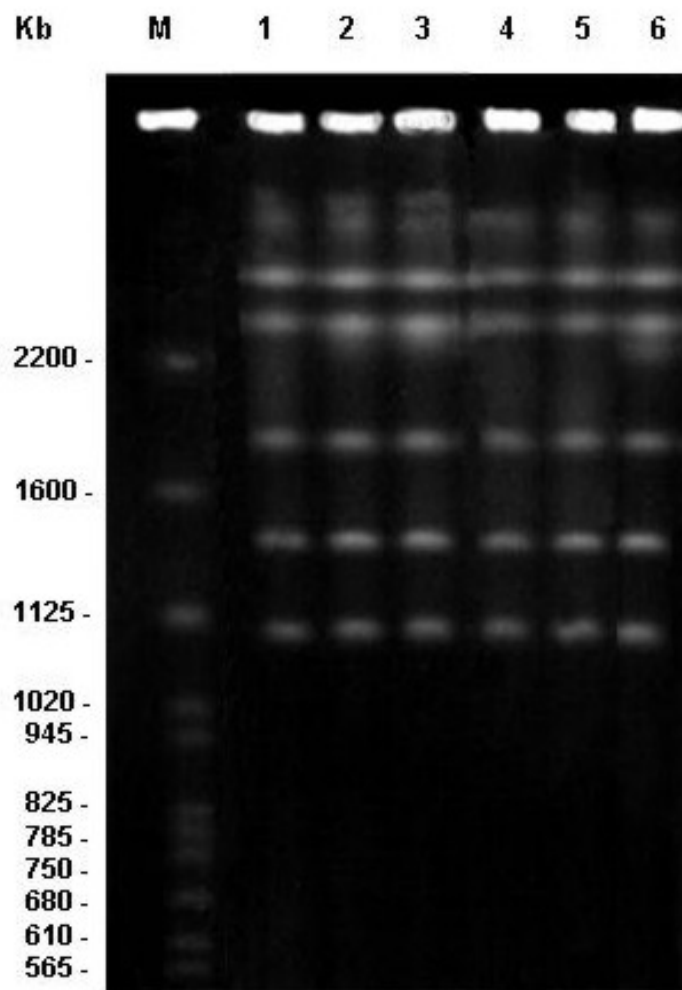
**Figura 14:** Perfil celular representativo da população de *K. lactis* (leveduras), conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Porcentagem de células marcadas com antiBrdU-FITC (APO<sup>+</sup>) e PI (APO<sup>-</sup>), em gráfico de FL1 (antiBrdU-FITC) versus FL3 (PI). **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 15:** Porcentagem de apoptose por DNA fragmentado de populações de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 16:** Marcação com antiBrdU-FITC (**1**) e DAPI (**2** - **setas**) de células apoptóticas por fragmentação do DNA de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. **(A)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(B)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(C)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(D)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(E)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(F)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 17:** Perfil eletroforético representativo de cromossomos de *K. lactis* conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. **(M)** Marcador (*Saccharomyces cerevisiae*), **(1)**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , **(2)**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ , **(3)**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ , **(4)**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ , **(5)**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ , **(6)**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .

### 3.1.5. Dimensões celulares de *Kluyveromyces lactis*

Para avaliar se as dimensões celulares de *K. lactis* foram alteradas nas condições avaliadas, o tamanho das células foi medido. A Tabela 1 mostra que as dimensões das células de *K. lactis* nas culturas contínuas conduzidas, sob limitação por nitrogênio, foram na ordem de 2 a 3,5  $\mu\text{m}$ . As dimensões celulares de *K. lactis*, conduzida sem condições de limitação por nitrogênio foi de 2,12  $\mu\text{m}$ . Além disso, as dimensões celulares de *K. lactis* aumentaram aproximadamente 44 % com a redução da velocidade de crescimento de 0,01 para 0,2  $\text{h}^{-1}$ .

**Tabela 1:** Dimensões celulares de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Os resultados representam as médias aritméticas  $\pm$  o desvio padrão de 3 repetições.

$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Dimensão ( $\mu\text{m}$ )	
	I	II
0,01	$3,53 \pm 0,005^a$	$3,71 \pm 0,011^a$
0,02	$3,09 \pm 0,003^b$	$3,16 \pm 0,017^b$
0,03	$2,72 \pm 0,003^c$	$2,55 \pm 0,009^c$
0,05	$2,44 \pm 0,002^d$	$2,38 \pm 0,005^d$
0,09	$2,17 \pm 0,004^e$	$2,19 \pm 0,013^e$
0,2	$2,03 \pm 0,002^e$	$2,08 \pm 0,022^e$

I = Biorreator 1; II = Biorreator 2

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.1.6. Produção de alcoóis aromáticos por culturas de *Kluyveromyces lactis*

A produção de alcoóis aromáticos por culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, está apresentada na Tabela 2. Enquanto triptofol e feniletanol foram detectados em todas as velocidades de crescimento, tirosol foi apenas detectado na velocidade de crescimento de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ . No entanto, na menor velocidade de crescimento ( $0,01 \text{ h}^{-1}$ ), a produção de triptofol foi aproximadamente 10 vezes maior do que na maior velocidade de crescimento ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ). Para feniletanol, essa diferença de produção foi cerca de 33 vezes. Culturas de *K. lactis* conduzidas sem condições de limitação por nitrogênio produziram  $1,1$  e  $0,31 \mu\text{M.mL}^{-1}$  de triptofol e feniletanol, respectivamente. Nessas condições, também não foi detectada a produção de tirosol.



**Tabela 2:** Concentração de alcoóis aromáticos no sobrenadante de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Os resultados representam as médias aritméticas  $\pm$  o desvio padrão de 3 repetições.

$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Tryptofol ( $\mu\text{M.mL}^{-1}$ )		Feniletanol ( $\mu\text{M.mL}^{-1}$ )		Tirosol ( $\mu\text{M.mL}^{-1}$ )	
	I	II	I	II	I	II
0,01	$0,843 \pm 0,033^a$	$0,812 \pm 0,054^a$	$1,044 \pm 0,186^a$	$1,032 \pm 0,119^a$	$0,975 \pm 0,006$	$0,984 \pm 0,016$
0,02	$0,793 \pm 0,005^b$	$0,745 \pm 0,064^b$	$0,099 \pm 0,009^b$	$0,087 \pm 0,014^b$	nd*	nd*
0,03	$0,724 \pm 0,007^c$	$0,710 \pm 0,014^c$	$0,063 \pm 0,002^c$	$0,058 \pm 0,008^c$	nd*	nd*
0,05	$0,212 \pm 0,029^d$	$0,219 \pm 0,017^d$	$0,044 \pm 0,005^d$	$0,040 \pm 0,010^d$	nd*	nd*
0,09	$0,125 \pm 0,021^e$	$0,138 \pm 0,014^e$	$0,036 \pm 0,003^d$	$0,039 \pm 0,007^d$	nd*	nd*
0,2	$0,085 \pm 0,018^f$	$0,072 \pm 0,016^f$	$0,031 \pm 0,001^d$	$0,036 \pm 0,012^d$	nd*	nd*

\*nd = não detectado

I = Biorreator 1; II = Biorreator 2

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

Geralmente, culturas de leveduras, que constituem os micro-organismos melhor adaptados a processos produtivos na fabricação, em escala, de etanol e bebidas fermentadas, estão sujeitas à perda de atividade metabólica e viabilidade, em períodos curtos de tempo, o que evidencia o envelhecimento dessas culturas e o comprometimento da produção dos referidos compostos em seu rendimento máximo.

Tipicamente, células de leveduras que possuem características de envelhecimento apresentam alterações estruturais, morfológicas e bioquímicas, tais como aumento do número de cicatrizes e maior conteúdo de quitina na parede celular, acúmulo de ROS intracelularmente, presença de características de apoptose, aumento das dimensões celulares, dentre outras (KELLER *et al.*, 1971; MADEO *et al.*, 1997; ZHANG, 2002; JAZWINSKI, 2005). Os resultados do presente trabalho confirmaram que culturas de *K. lactis*, sob cultivo contínuo e limitação por nitrogênio, exibem tais características de envelhecimento (ANEXO 3).

A ocorrência de tais alterações estruturais, morfológicas e bioquímicas em células de *K. lactis*, em diferentes velocidades de crescimento, nas condições mencionadas, indicaram que os sinais de envelhecimento foram mais evidentes nas culturas conduzidas em baixas velocidades de crescimento ( $\mu = 0,01$  e  $0,02 \text{ h}^{-1}$ ) quando o tempo de residência das células nos biorreatores foi de 100 e 50 horas, respectivamente. Provavelmente, o envelhecimento das células de *K. lactis* foi mais em função do limite do número de brotos que a levedura é capaz de gerar (15 a 20 brotos) do que talvez pela própria condição de limitação nutricional por nitrogênio. Embora tenha sido relatado que condições de restrição calórica, por redução da concentração de glicose no meio, retardam o envelhecimento de culturas de *S. cerevisiae* (GUARENTE, 2005), enquanto condições de limitação por nitrogênio podem acelerar o envelhecimento de leveduras (SCHIPPER *et al.*, 2000; CORRÊA, 2007), o efeito da limitação por nitrogênio no envelhecimento das culturas de *K. lactis* não pode ser diretamente inferido, nesse estudo.

Um dos primeiros indícios do envelhecimento de células de *K. lactis*, nas condições analisadas, pode ser indicada pela notável redução da viabilidade

celular da levedura nas culturas contínuas, sob limitação por nitrogênio, nas menores velocidades de crescimento. Culturas de *S. cerevisiae*, em meio sintético completo, apresentaram redução na viabilidade celular com a progressão do envelhecimento replicativo das células (LAM *et al.*, 2011). BOER e colaboradores (2008) verificaram que o efeito de condições de restrição nutricional, na viabilidade de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, é dependente do tipo de nutriente. Assim, a viabilidade da referida levedura sob restrição por leucina ou uracila é cerca de 10 vezes menor do que por amônia, fosfato ou sulfato. No entanto, no presente trabalho, não é possível inferir se a redução da viabilidade de *K. lactis* foi decorrente do envelhecimento natural das células, que alcançaram o número máximo de brotos, ou da condição extrema de limitação por nitrogênio.

A maior detecção de cicatrizes, pela marcação com Alexa Flúor 488 conjugado a WGA, e consequentemente a maior concentração de N-acetilglicosamina na parede celular de *K. lactis*, sob as velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup>, também apontam para o maior envelhecimento das culturas da levedura, nessas condições de limitação por nitrogênio. Um progressivo aumento dos sinais de envelhecimento de culturas de *S. cerevisiae* foi observado pelo aumento do número de cicatrizes e pela maior intensidade da fluorescência emitida pelas regiões de cicatrizes dos brotos gerados, por marcação com Alexa Flúor 488 e 633 conjugados a WGA (KUREC *et al.*, 2009; LAM *et al.*, 2011). LAM e colaboradores (2011) relacionaram a intensidade da fluorescência observada, por citometria de fluxo, com o envelhecimento das células de *S. cerevisiae*, a partir do número de cicatrizes determinado. Assim, células com 0 a 4 cicatrizes apresentaram intensidade de fluorescência abaixo de 10<sup>1</sup>; células com 5 a 9 e com 7 a 12 cicatrizes apresentaram intensidade de fluorescência entre 10<sup>1</sup> a 10<sup>2</sup> e 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup>, respectivamente.

O acúmulo intracelular de ROS, em culturas de *K. lactis* conduzidas na velocidade de crescimento de 0,01 h<sup>-1</sup>, foi aproximadamente 6 vezes maior do que nas células da levedura sob a velocidade de 0,2 h<sup>-1</sup>. A formação e o acúmulo de ROS também estão relacionados com o processo de envelhecimento de leveduras, como já observado para *S. cerevisiae* (SOHAL & WEINDRUCH, 1996; LAUN *et al.*, 2001; LAM *et al.*, 2011). Por outro lado, condições de restrição calórica por redução da concentração de glicose no

meio, de 2 % para 0,5 %, previnem a formação de ROS e prolongam o *lifespan* de *S. cerevisiae*, retardando seu envelhecimento, sendo que o mesmo não foi verificado para *K. lactis*, nas mesmas condições (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Porém, no presente estudo, não é possível afirmar que a limitação por nitrogênio também não tenha prevenido o acúmulo de ROS nem o retardamento do envelhecimento de *K. lactis*. O acúmulo de ROS pode ter ficado mais evidente pelo fato das culturas provavelmente estarem sujeitas a outros efeitos mais severos, intrínsecos da célula. A partir da maior detecção de ROS, nas células das culturas conduzidas sob as menores velocidades de crescimento, sugere-se que talvez não sejam as condições limitantes por nitrogênio que promovam o envelhecimento das culturas de *K. lactis*. O aumento das dimensões celulares de *K. lactis*, sob as menores velocidades de crescimento, também confirmam essa hipótese. Por outro lado, uma comparação da levedura, em cultivo contínuo, sob diferentes velocidades de crescimento, e em condições limitantes de carbono *versus* nitrogênio pode esclarecer essa incerteza.

Uma vez que características morfológicas de apoptose, tais como externalização da fosfatidilserina, condensação e fragmentação do DNA, também retratam o processo de envelhecimento celular de leveduras (MADEO *et al.*, 1997) e podem ser induzidas pelo acúmulo intracelular de ROS (LAUN *et al.*, 2001), os resultados desse trabalho confirmam a presença dessas características e indicam a tendência de culturas de *K. lactis*, conduzidas sob baixas velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio, acumularem maior porcentagem de células apoptóticas. Vale ressaltar que, geralmente, é relatado a indução da morte celular programada, em leveduras, por peróxido de hidrogênio, ácido acético, drogas, estresse osmótico, irradiação ultra-violeta, expressão de proteínas heterólogas pro-apoptóticas, dentre outros (MADEO *et al.*, 1999; SHIMIZU *et al.*, 2000; LUDOVICO *et al.*, 2001; CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2009). No entanto, no presente estudo nenhum desses agentes foram utilizados para induzir o processo de apoptose e o acúmulo de células apoptóticas ocorreu naturalmente, indicando que o maior tempo de residência das culturas, sob as menores velocidades de crescimento pode explicar essa resposta fisiológica de morte celular programada, em *K. lactis*.

Culturas de *S. cerevisiae* e *Candida albicans* produzem sinais extracelulares de comunicação celular, tais como alcoóis aromáticos, associados à densidade populacional e às condições do meio em que se encontram, principalmente referente à disponibilidade de nitrogênio (CHEN & FINK, 2006). Esses compostos produzidos podem induzir o processo de apoptose em *C. albicans* (SHIRTLIFF et al., 2009). Sob baixas velocidades de crescimento e em condições limitantes de nitrogênio, *K. lactis* produziu maiores concentrações de triptofol, feniletanol e tirosol. Tal fato é coerente com o descrito por CHEN & FINK (2006), onde a produção desses alcoóis aromáticos foi maior após as culturas entrarem na fase estacionária e em condições de maior densidade populacional. Sugere-se que a maior detecção desses compostos na velocidade de crescimento de  $0,01\text{ h}^{-1}$ , pode estar relacionada ao envelhecimento das culturas, nessa condição, o que pode ser confirmado pelos demais resultados obtidos e já discutidos.

Portanto, a maior ocorrência de características de envelhecimento, além da maior produção de alcoóis aromáticos, nas culturas contínuas de *K. lactis*, sob baixas velocidades de crescimento, sugerem que essa condição favorece os estudos da fisiologia do envelhecimento dessa levedura.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOER, V. M.; AMINI, S.; BOTSTEIN, D. Influence of genotype and nutrition on survival and metabolism of starving yeast. **PNAS**, v. 105, n. 19, p. 6930-6935, 2008.
- BULIK, D. A.; OLCZAK, M.; LUCERO, H. A.; OSMOND, B. C.; ROBBINS, P. W.; SPECHT, C. A. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 886-900, 2003.
- CARMONA-GUTIERREZ, D. & MADEO, F. Tracing the roots of death: apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Dong Z, Yin X-M (eds). **Essentials of Apoptosis – A Guide for Basic and Clinical Research**. Humana Press, p. 325-354, 2009.
- CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BUTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, p. 763-773, 2010.
- CHEN, H. & FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes & Development**, v. 20, p. 1150-1161, 2006.
- CORRÊA, L. F. M. **Cinética de crescimento e longevidade de culturas de *Kluyveromyces lactis* sob estresse por nitrogênio**. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 50p., 2007 (Dissertação de Mestrado).
- DICKINSON, J. R. & SCHWEIZER, M. S. **The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. CRC Press LLC, NY, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004.
- DILOVA, I.; EASLON, E.; LIN, S. J. Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 752-767, 2007.
- ESCHENFELDT, W.H; PUSKAS, R. S.; BERGER, S. L. Homopolymeric tailing. **Methods in Enzymology**, v. 152, p. 337-342, 1987.
- GOMES, P; MARQUES, B. S.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; LEÃO, C. Low auxotrophy-complementing amino acid concentrations reduce yeast chronological life span. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 383-391, 2007.
- GRATZNER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science**, v. 218, p. 474-475, 1982.

GUARENTE, L.; LIN, S.; KAEBERLEIN, M.; ANDALIS, A. A.; STURTZ, L.A.; DEFOSSEZ, P.; CULOTTA, V. C.; FINK, G. R. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. **Nature**, v. 418, p. 344-348, 2002.

GUARENTE, L. Calorie restriction and SIR2 genes – Towards a mechanism. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 923-928, 2005.

HARMAN, D. The aging process, **PNAS**, v. 78, n. 11, p. 7124-7128, 1981.

HAYES, M. J. & MOSS, S. E. Annexins and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p.1166-1170, 2004.

JAZWINSKI, S. M. Growing old: metabolic control and yeast aging. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 769-792, 2002.

JAZWINSKI, S. M. Yeast longevity and aging – the mitochondrial connection. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 243-248, 2005.

JIANG, J. C.; JARUGA E.; REPNEVSKAYA, M. V.; JAZWINSKI, S. M. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. **FASEB Journal**, v. 14, p. 2135-2137, 2000.

KELLER, F. A. & CABIB, E. Chitin and Yeast Budding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 1, p. 160-166, 1971.

KITAGAKI, H.; ARAKI, Y.; FUNATO, K.; SHIMOI, H. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. **Febs Letters**, v. 581, p. 2935-2942, 2007.

LAM, Y. T.; AUNG-HTUT, M. T.; LIM, Y. L.; YANG, H.; DAWES, I. W. Changes in reactive oxygen species begin early during replicative aging of *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p. 963-970, 2011.

LAUN, P.; PICHOVA, A.; MADEO, F.; FUCHS, J.; ELLINGER, A.; KOHLWEIN, S.; DAWES, I.; FRÖHLICH, K.; BREITENBACH, M. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1166-1173, 2001.

LUDOVICO, P.; SOUSA, M. J.; SILVA, M. T.; LEÃO, C.; CÔRTE-REAL, M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**, v. 147, p.2409-2415, 2001.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 3, p. 729-734, 1997.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S.J; WOLF, D.H.; FRÖHLICH, K. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, n. 4, p. 757-767, 1999.

MADEO, F.; HERKER, E; WISSING, S; JUNGWIRTH, H; EISENBERG, T; FRÖHLICH, K. Apoptosis in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 655-660, 2004.

OLIVEIRA, G.; TAHARA, E.; GOMBERT, A.; BARROS, M.; KOWALTOWSKI, A. Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 40, p. 381-388, 2008.

O'SULLIVAN, D.; TOSI, P.; CREUSOT, F.; COOKE, B. M.; PHAN, T.; DRON, M.; LANGIN, T. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, v. 33, n. 4, p. 291-298, 1998.

POLIAKOVÁ, D.; SOKOLIKOVÁ, B.; KOLAROV, J.; SABOVÁ, L. The antiapoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub> prevents the cytotoxic effect of Bax, but not Bax-induced formation of reactive oxygen species, in *Kluyveromyces lactis*. **Microbiology**, v. 148, p. 2789-2795, 2002.

RIBEIRO, G. F.; CÔRTE-REAL, M.; JOHANSSON, B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 4584-4591, 2006.

SCHIPPER, R. G.; PENNING, L. C.; VERHOFSTAD, A. A. J. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? **Seminars in Cancer Biology**, v.55, p. 450-468, 2000.

SEVERIN, F. F.; MEER, M. V.; SMIRNOVA, E. A.; KNORRE, D. A.; SKULACHEV, V. P. Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 1350-1353, 2008.

SHIMIZU, S.; SHINOHARA, Y.; TSUJIMOTO, Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. **Oncogene**, v. 19, p. 4309-4318, 2000.

SHIRTLIFF, M. E.; KROM, B. P.; MEIJERING, R. A. M.; PETERS, B. M.; ZHU, J.; SCHEPER, M. A.; HARRIS, M. L.; JABRA-RIZK, M. A. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2392-2401, 2009.

SOHAL, R. S. & WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, p. 59-63, 1996.

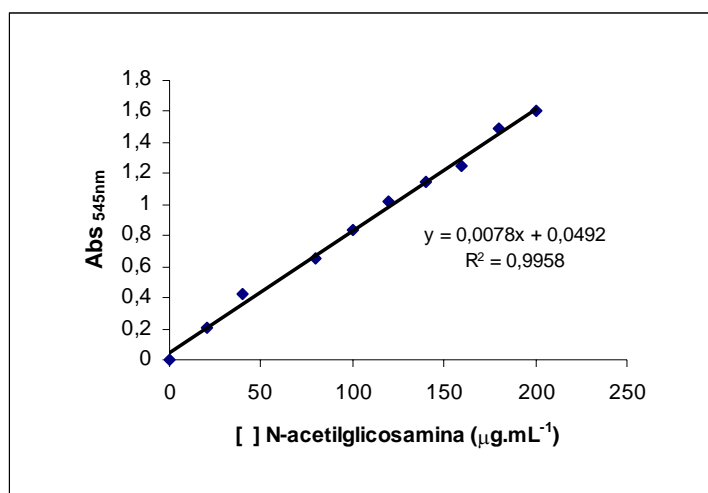
SOR, F. & FUKUHARA, H. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. **Yeast**, v. 5, p. 1-10, 1989.



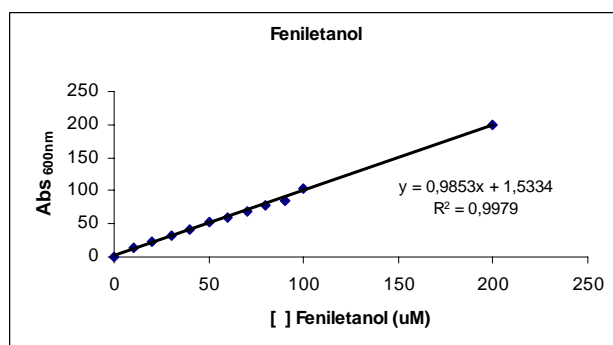
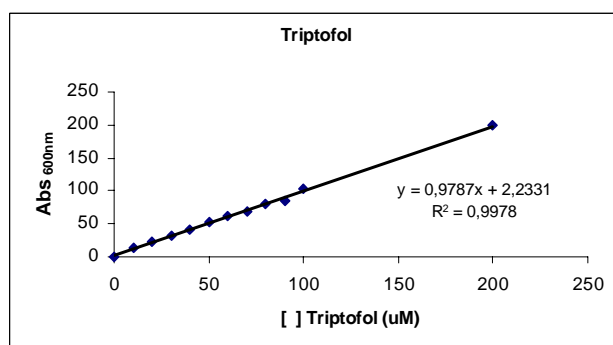
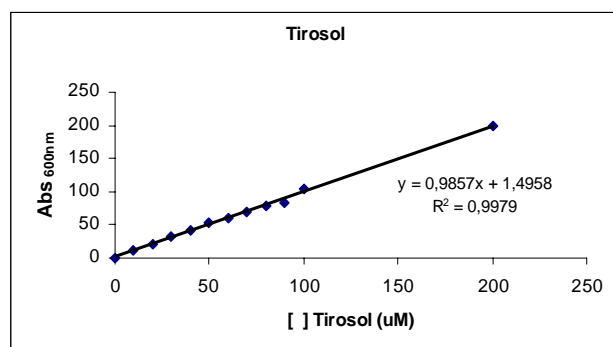
WINTER, V. J. Slow growth, stress response and aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.16, p. 121-137, 2004.

ZHANG, Y. & HERMAN, B. Ageing and apoptosis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 245-260, 2002.

## **6. ANEXOS**



**Anexo 1:** Curva padrão de N-acetilglicosamina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), nas concentrações de 0 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Anexo 2:** Curva padrão tirosol, triptofol e feniletanol, nas concentrações de 0 a 200  $\mu\text{M}$ .

**Anexo 3:** Porcentagem de populações de células de *K. lactis*, conduzidas em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, e analisadas por citometria de fluxo, quanto à diferentes características de envelhecimento. Os resultados representam as médias aritméticas  $\pm$  o desvio padrão de 3 repetições.

$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Viabilidade (%)		Cicatrizes (%)		ROS (%)		Apoptose Inicial (%)		Apoptose Tardia (%)		Apoptose DNA Fragmentado (%)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0,01	57,40 $\pm 0,070^d$	58,95 $\pm 0,353^d$	85,16 $\pm 0,424^a$	84,25 $\pm 0,494^a$	67,14 $\pm 0,282^a$	66,60 $\pm 0,283^a$	9,01 $\pm 0,12^a$	11,1 $\pm 0,282^a$	7,34 $\pm 0,162^a$	7,6 $\pm 0,282^a$	4,07 $\pm 0,035^a$	4,04 $\pm 0,049^a$
0,02	62,67 $\pm 0,282^d$	60,95 $\pm 0,353^d$	83,24 $\pm 0,141^a$	82,45 $\pm 0,494^a$	39,65 $\pm 0,141^b$	39,15 $\pm 0,353^b$	8,18 $\pm 0,14^b$	8,55 $\pm 0,219^b$	4,60 $\pm 0,240^b$	4,08 $\pm 0,056^b$	2,52 $\pm 0,141^b$	3,09 $\pm 0,092^b$
0,03	79,21 $\pm 0,565^c$	77,8 $\pm 0,565^c$	52,89 $\pm 0,494^b$	52,4 $\pm 0,282^b$	25,65 $\pm 0,282^c$	25,75 $\pm 0,353^c$	6,40 $\pm 0,424^c$	6,27 $\pm 0,452^c$	4,08 $\pm 0,113^b$	4,71 $\pm 0,212^b$	1,59 $\pm 0,120^c$	1,15 $\pm 0,012^c$
0,05	89,76 $\pm 0,777^b$	89,00 $\pm 0,424^b$	46,91 $\pm 0,353^c$	47,85 $\pm 0,212^c$	20,71 $\pm 0,282^d$	20,90 $\pm 0,282^d$	5,85 $\pm 0,353^c$	5,50 $\pm 0,070^c$	0,651 $\pm 0,042^c$	0,691 $\pm 0,013^c$	0,518 $\pm 0,011^d$	0,538 $\pm 0,026^d$
0,09	90,01 $\pm 0,848^b$	89,50 $\pm 0,282^b$	44,88 $\pm 0,707^c$	44,00 $\pm 0,141^c$	11,73 $\pm 0,282^e$	11,50 $\pm 0,141^e$	4,15 $\pm 0,077^d$	4,13 $\pm 0,042^d$	0,530 $\pm 0,019^c$	0,511 $\pm 0,022^c$	0,419 $\pm 0,033^d$	0,429 $\pm 0,026^d$
0,2	94,37 $\pm 0,282^a$	94,15 $\pm 0,212^a$	41,66 $\pm 0,141^d$	40,95 $\pm 0,353^d$	8,89 $\pm 0,226^f$	8,70 $\pm 0,283^f$	3,45 $\pm 0,219^d$	3,61 $\pm 0,212^d$	0,348 $\pm 0,022^d$	0,327 $\pm 0,033^d$	0,277 $\pm 0,031^e$	0,258 $\pm 0,050^e$

I = Biorreator 1; II = Biorreator 2

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## **CAPÍTULO 4**

### **PERFIL METABÓLICO EXTRACELULAR DE CULTURAS CONTÍNUAS DE *Kluyveromyces lactis* SOB LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO**

## 1. INTRODUÇÃO

A levedura *Kluyveromyces lactis* tem se destacado como um modelo alternativo à *Saccharomyces cerevisiae*, tanto em estudos fisiológicos e genéticos quanto como agentes em processos industriais e biotecnológicos, para a produção de biomoléculas de interesse, tais como vitaminas, peptídeos, proteínas, etanol e outros metabólitos. Entretanto, essas culturas perdem atividade metabólica e viabilidade, em períodos curtos de tempo, o que pode afetar a produção dessas biomoléculas em seu rendimento máximo.

Os gêneros das leveduras *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*, apesar de possuírem o mesmo ancestral, possuem requerimentos nutricionais e redes metabólicas distintas, devido provavelmente a diferença de nicho ecológico destes micro-organismos. Assim, essas diferenças metabólicas fazem das leveduras do gênero *Kluyveromyces* interessantes alternativas às leveduras modelo *Saccharomyces* (RUBIO-TEXEIRA, 2005).

Nas análises globais da expressão genética (genômica funcional), no proteoma, transcriptoma e metaboloma, em diferentes estados fisiológicos, o sistema de cultura contínua tem sido recomendado (KAMINISKI & FRIEDMAN, 2002; PIPER *et al.*, 2002). Em estudos fisiológicos, esse sistema é útil, porque estabelece um estado fisiológico permanente uniforme e definido, uma vez que cada velocidade de crescimento, dada pelo fluxo de alimentação da cultura, corresponde a um estado fisiológico distinto. Alguns estados fisiológicos, incluindo condições de limitação nutricional, estabelecidos na cultura contínua favorecem a síntese de produtos microbianos de interesse, seja enzimas ou outras proteínas, além de metabólitos (aminoácidos, antibióticos, vitaminas, pigmentos) não associados ao crescimento (AON & CORTASSA, 2001; AVIGNONE-ROSSA *et al.*, 2002). Estudos relacionados ao transcriptoma, proteoma e metaboloma de leveduras, sob limitação nutricional, disponibilidade de oxigênio e resposta ao estresse oxidativo têm sido realizados, utilizando cultura contínua (TER LINDE *et al.*, 1999; WICK *et al.*, 2001; KOERKAMP *et al.*, 2002; BOER *et al.*, 2003; MASHEGO *et al.*, 2005; BOER *et al.*, 2007; TAI *et al.*, 2007; SANTOS, 2008).

Mudanças globais no metabolismo, sob diferentes condições fisiológicas, podem ser acompanhadas pela caracterização do perfil metabólico

de culturas microbianas, a partir da identificação e quantificação dos metabólitos (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). O metaboloma ou perfil metabólico de *K. lactis*, pode revelar metabólitos específicos de interesse biotecnológico e relacionados a respostas fisiológicas da levedura, quando em condições de limitação nutricional por nitrogênio ou mesmo metabólitos que possam sinalizar o processo de envelhecimento, por exemplo. Uma vez que estudos prévios demonstraram que culturas contínuas de *K. lactis* conduzidas sob baixas velocidades de crescimento e sob limitação por sulfato de amônio apresentam células com características de envelhecimento (CORRÊA, 2007 e 2011), é possível que o perfil metabólico da levedura proporcione a identificação de moléculas sinalizadoras, no meio extracelular, que estejam relacionadas ao processo de envelhecimento ou a outras respostas fisiológicas, nas condições mencionadas.

Devido à produção simultânea de diversos metabólitos, diferentes métodos analíticos ou plataformas experimentais acoplados à espectrometria de massas (LC-MS e GC-MS) têm sido amplamente utilizados para explorar o metaboloma de micro-organismos, com destaque para as leveduras (ALLEN *et al.*, 2003; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). Tanto o procedimento de LC-MS, como GC-MS mostram-se vantajosos, considerando rapidez, resolução e confiabilidade para a aquisição de dados, sendo que a identificação de compostos desconhecidos é facilmente conseguida (LU *et al.*, 2005; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; NIELSEN *et al.*, 2008; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2010). De forma complementar às informações obtidas sobre o transcriptoma e o proteoma, estão as aplicações potenciais das análises do metaboloma na biotecnologia, na elucidação das propriedades cinéticas do metabolismo, em estudos de novas rotas metabólicas e redes regulatórias, além de estudos relacionados à engenharia metabólica (VAN DER WERF *et al.*, 2007; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2007).

Nesse sentido, foi proposto neste trabalho caracterizar o perfil metabólico extracelular de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, em diferentes velocidades de crescimento, sob condições fisiológicas de limitação nutricional por nitrogênio. Além disso, uma possível correlação entre os metabólitos extracelulares produzidos e a condição de limitação nutricional ou o processo de envelhecimento foi realizada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Conforme estabelecido previamente no Capítulo 2, culturas contínuas de *K. lactis* foram conduzidas em diferentes velocidades de crescimento (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>), sob diferentes níveis de limitação por nitrogênio, impostos pela variação dos fluxos de alimentação das culturas. O sobrenadante das culturas coletado, em triplicata, e representativo de cada condição de regime permanente (*steady-state*) foi utilizado para as posteriores análises do perfil metabólico de *K. lactis*. Como controle, foi utilizada uma cultura de *K. lactis*, conduzida sem condições de limitação por nitrogênio (YCB + 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio), sob batelada, e em fase exponencial de crescimento.

### 2.1. Análise de substrato e produtos do metabolismo de culturas de *Kluyveromyces lactis*

O consumo de glicose, das culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, foi acompanhado pela medida da concentração do açúcar remanescente, no sobrenadante das culturas. Produtos do metabolismo, tais como etanol e glicerol, foram também analisados nas mesmas amostras, em triplicata. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo modelo Hewlett Packard, série 1050, com detector índice de refração, modelo Hewlett Packard HP 1047A e utilizando a coluna HPX-87H (tamanho da partícula = 8 µm e dimensões de 300 X 7,8 mm). O eluente usado foi 0,005 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com fluxo de 0,7 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura de operação foi 60 °C e a pressão máxima, de 95 bar. O volume de injeção de cada amostra, em triplicata, foi de 20 µL. As concentrações de glicose e metabólitos foram medidas, mediante a comparação delas com as dos padrões externos preparados nas concentrações de 5 a 20 mM (0,9 a 3,6 mg.mL<sup>-1</sup>) para glicose e de 10 a 40 mM (4,6 a 18,4 mg.mL<sup>-1</sup>) para etanol e glicerol.

As taxas específicas de consumo de glicose e de produção de metabólitos - etanol e glicerol (mg.mL<sup>-1</sup>.mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi determinada pela razão da concentração de glicose, etanol ou glicerol detectada pela biomassa obtida das culturas contínuas, em regime permanente, em cada velocidade de



crescimento, e o valor resultante multiplicado pela taxa de diluição (D) de cada cultura.

## **2.2. Análise de metabólitos extracelulares de culturas de *Kluyveromyces lactis***

Os metabólitos extracelulares das culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, foram analisadas por cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massa.

### **2.2.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)**

A produção de metabólitos extracelulares pelas culturas contínuas de *K. lactis* foi acompanhada pela detecção dos compostos no sobrenadante das culturas, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. As análises foram realizadas no Núcleo de Análise de Biomoléculas (CCB/UFV).

O sobrenadante das culturas foi estocado a - 80 °C, imediatamente após a coleta. No momento do uso, o mesmo foi diluído dez vezes em solução de 15 % de acetonitrila e 0,1 % de ácido fórmico.

O fracionamento dos metabólitos extracelulares foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no sistema LC-20AD – UFLC (Shimadzu®), utilizando uma coluna de fase reversa C18 (tamanho da partícula = 5 µm e dimensões de 125 X 2 mm). O eluente foi uma solução de 15 % de acetonitrila e 0,1 % de ácido fórmico. O fluxo foi de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção de cada amostra, em triplicata, foi de 20 µL. As amostras foram submetidas à ionização *eletrospray* com detecção por espectrometria de massa. Para as análises de espectrometria de massa, foi usado o espectrômetro de massa Micro TOF-QII acoplado ao LC (Bruker Daltonics®).

Os espectros de massa (MS) e os espectros de massa em *tandem* (MS/MS) foram obtidos no modo positivo. Para a fragmentação dos compostos (íons), o método CID (*Collision Induced Dissociation*) foi utilizado. Os resultados da espectrometria de massas foram obtidos pela razão massa/carga (50 a 1500) para cada amostra. O perfil de massa molecular obtido de cada amostra foi submetido à análise comparativa com aqueles depositados em bancos de dados ([http://metlin.scripps.edu/metabo\\_search\\_alt2.php#](http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php#)) e com aqueles descritos na literatura.

### 2.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A produção de metabólitos extracelulares pelas culturas contínuas de *K. lactis* também foi acompanhada pela detecção dos compostos no sobrenadante das culturas, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. As análises foram realizadas no Metabolomics Applied to Medical & Industrial Microbiology Laboratory (Centre for Microbial Innovation, School of Biological Sciences, University of Auckland/Nova Zelândia), em colaboração científica com o Dr. Silas G. Villas-Boas.

O sobrenadante das culturas foi adicionado de 20 µL de 10 mM de alanina deuterizada (D<sub>4</sub>-ALA) e, posteriormente, concentrado por liofilização.

As amostras foram analisadas, em triplicata, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, no sistema GC7890 acoplado ao MSD5975 (Agilent Technologies®), utilizando uma coluna de capilaridade para cromatografia gasosa (ZB1701 - 30 m X 250 µm X 0,15 µm). O método de derivatização por metilcloroformato (MCF), descrito por VILLAS-BÔAS *et al.* (2010), foi realizado. A identificação dos metabólitos foi feita mediante a comparação com a dos espectros de massa salvos em bibliotecas já existentes.

Os espectros de massa (MS) e os espectros de massa em *tandem* (MS/MS) foram obtidos no modo positivo e negativo. Os resultados da espectrometria de massas foram obtidos pela razão massa/carga para cada amostra. O perfil de massa molecular obtido de cada amostra foi submetido à análise comparativa com aqueles depositados em bancos de dados.

### 2.3. Análises de dados

Os dados obtidos foram normalizados e analisados pelo método de análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA), conforme descrito por NIELSEN *et al.* (2008) e VILLAS-BÔAS *et al.* (2010), respectivamente.

Os programas MetAlign (Rikilt, UK), MultiExperiment Viewer versão 4.6 (TM4 Software Suite, USA) e R versão 2.13.0 (Development Core Team, NZ), foram usados para realizar a análise dos dados. O agrupamento hierárquico (*Hierarchical Clustering* - HCL) e a correlação de Pearson foram utilizados para agrupar os dados.

O programa PAPI (*Pathway Activity Profiling*) foi utilizado para correlacionar os metabólitos extracelulares produzidos pelas culturas de *K. lactis* com a atividade de diferentes vias metabólicas (AGGIO *et al.*, 2010).

Para constatar diferenças significativas entre os dados analisados, foi aplicado o Teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (programa Assistat versão 7.6 beta - DEAG/CTRN/UFCG, Paraíba/Brasil).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Consumo de glicose e formação de produtos do metabolismo em culturas de *Kluyveromyces lactis*

O consumo de glicose e a formação de produtos finais do metabolismo, como etanol e glicerol, das culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, nas seis velocidades de crescimento avaliadas, estão apresentados na Tabela 1. Foi verificado que o aumento da velocidade de crescimento diminuiu o consumo de glicose por *K. lactis*, aproximadamente, 28 vezes. Isso quando comparadas as velocidades de crescimento de 0,01 e 0,2 h<sup>-1</sup>. Considerando a formação de etanol e glicerol, o aumento da velocidade de crescimento também reduziu a concentração de ambos metabólitos, ~2 e ~20 vezes, respectivamente. No entanto, quando as taxas específicas de consumo de glicose e de produção de etanol e glicerol foram determinadas (dados não mostrados), sob a maior velocidade de crescimento (0,2 h<sup>-1</sup>), o consumo de glicose (~2,17 mg.mL<sup>-1</sup>.mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e a produção de etanol (~0,75 mg.mL<sup>-1</sup>.mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e glicerol (~0,03 mg.mL<sup>-1</sup>.mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foram maiores do que na menor velocidade de crescimento (0,01 h<sup>-1</sup>), cujos valores determinados para glicose, etanol e glicerol foram ~1,2 x 10<sup>-3</sup>, ~0,02 e ~9,4 x 10<sup>-3</sup> mg.mL<sup>-1</sup>.mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Apesar de *K. lactis* apresentar metabolismo predominantemente oxidativo, ou seja, metabolismo respiratório caracterizado pela oxidação completa do açúcar (glicose) a CO<sub>2</sub>, os resultados mostraram que a levedura apresentou metabolismo oxidorreduutivo, isto é, metabolismo fermentativo, de acordo com as taxas específicas de consumo de glicose e de produção de metabólitos, nas maiores velocidades de crescimento. Culturas de *S. cerevisiae*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento (0,025 a 0,4 h<sup>-1</sup>), sob limitação por glicose, como fonte de carbono, também apresentaram maiores taxas específicas de consumo de glicose e produção de etanol e glicerol nas maiores velocidades de crescimento (HOEK *et al.*, 1998). No metabolismo fermentativo, o açúcar é parcialmente oxidado a piruvato e este reduzido a etanol. Glicerol também constitui um produto final do metabolismo fermentativo (DICKINSON & SCHWEIZER, 2004). Porém leveduras, incluindo algumas do gênero *Kluyveromyces*, podem apresentar

simultaneamente o metabolismo fermentativo e o respiratório, caracterizando o metabolismo respirofermentativo, quando a repressão do metabolismo oxidativo pelo fermentativo, bem conhecido em *S. cerevisiae*, não se verifica (SISO *et al.*, 2000).

**Tabela 1:** Consumo de glicose e produtos finais do metabolismo de culturas contínuas de *K. lactis*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio. Os resultados representam as médias aritméticas  $\pm$  o desvio padrão de 3 repetições.

$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Glicose Residual (mg.mL <sup>-1</sup> )		Etanol (mg.mL <sup>-1</sup> )		Glicerol (mg.mL <sup>-1</sup> )	
	I	II	I	II	I	II
0,01	0,161 $\pm$ 0,022 <sup>d</sup>	0,189 $\pm$ 0,045 <sup>d</sup>	2,922 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	3,046 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	1,223 $\pm$ 0,023 <sup>a</sup>	1,102 $\pm$ 0,037 <sup>a</sup>
0,02	0,294 $\pm$ 0,015 <sup>d</sup>	0,289 $\pm$ 0,039 <sup>d</sup>	2,817 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	3,115 $\pm$ 0,024 <sup>a</sup>	0,238 $\pm$ 0,019 <sup>b</sup>	0,276 $\pm$ 0,021 <sup>b</sup>
0,03	0,494 $\pm$ 0,031 <sup>c</sup>	0,472 $\pm$ 0,024 <sup>c</sup>	2,752 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>	2,685 $\pm$ 0,018 <sup>b</sup>	0,190 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup>	0,205 $\pm$ 0,026 <sup>c</sup>
0,05	0,558 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup>	0,599 $\pm$ 0,013 <sup>c</sup>	2,714 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	2,637 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	0,174 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>	0,158 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup>
0,09	1,245 $\pm$ 0,017 <sup>b</sup>	1,451 $\pm$ 0,028 <sup>b</sup>	1,845 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup>	1,852 $\pm$ 0,017 <sup>c</sup>	0,079 $\pm$ 0,018 <sup>d</sup>	0,081 $\pm$ 0,013 <sup>d</sup>
0,2	4,443 $\pm$ 0,045 <sup>a</sup>	4,318 $\pm$ 0,071 <sup>a</sup>	1,540 $\pm$ 0,004 <sup>d</sup>	1,524 $\pm$ 0,007 <sup>d</sup>	0,063 $\pm$ 0,012 <sup>d</sup>	0,060 $\pm$ 0,010 <sup>d</sup>

I = Biorreator 1; II = Biorreator 2

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

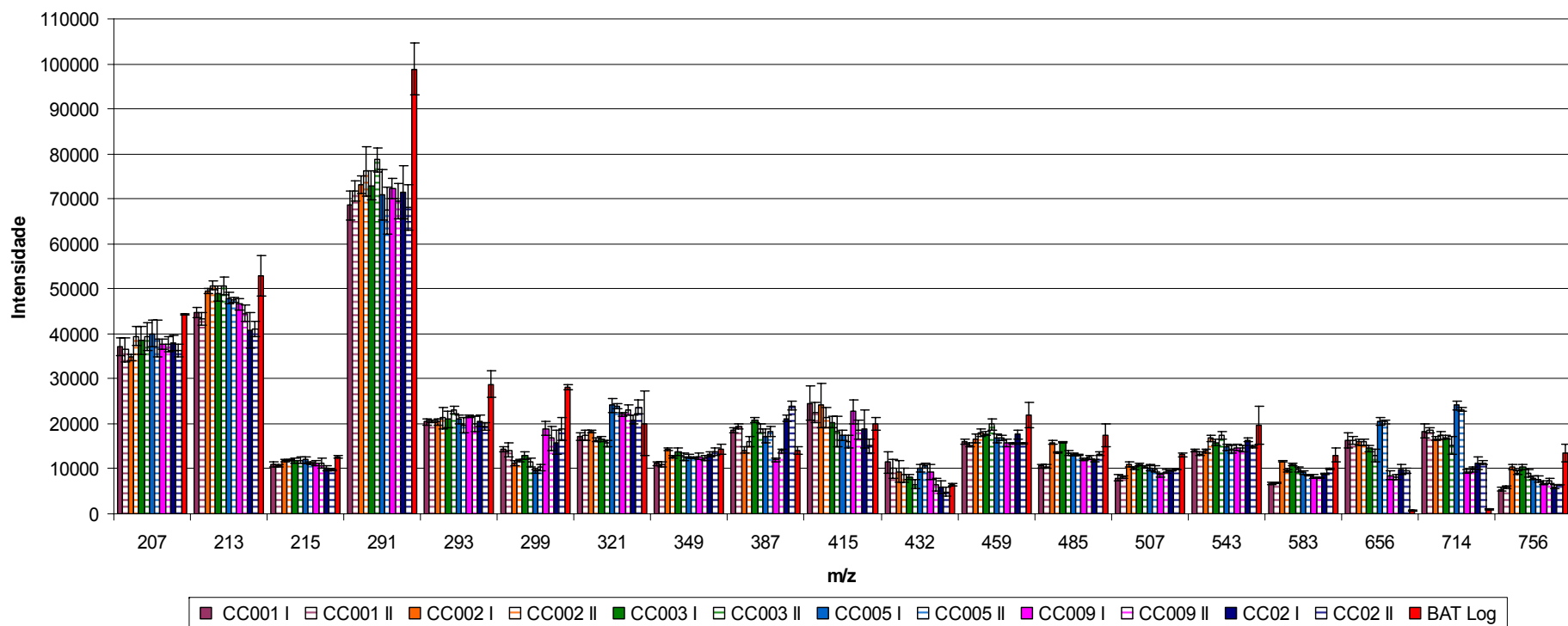
### 3.2. Perfil metabólico extracelular de culturas de *Kluyveromyces lactis* por LC-MS

Com a finalidade de caracterizar o perfil metabólico extracelular de culturas contínuas de *K. lactis*, em diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio, o sobrenadante dessas culturas foi submetido à cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas. A Figura 1 apresenta o perfil da intensidade *versus* a razão massa carga ( $m/z$ ) de fragmentos de metabólitos extracelulares representativo de *K. lactis*, nos biorreatores I e II. Como controle, foi utilizada uma cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (BAT Log).

Pela análise da razão massa/carga, variando entre 50 a 1500, foram detectados 19 fragmentos de metabólitos extracelulares diferentes, com intensidade detectada acima de 5400, para cada amostra. Foram eles ( $m/z$ ): 207, 213, 215, 291, 293, 299, 321, 349, 387, 415, 432, 459, 485, 507, 543, 583, 656, 714 e 756. A maior ou menor abundância desses fragmentos em cada condição fisiológica avaliada está representada na Tabela 2. Não foi observada uma tendência da abundância de todos os fragmentos em determinadas velocidades de crescimento. No entanto, foi verificado que os fragmentos 299, 321, 349, 485, 507, 543, 583 e 756 foram diferencialmente menos abundantes ( $\leq 2$  vezes) nas menores velocidades de crescimento ( $0,01$  a  $0,05\text{ h}^{-1}$ ), enquanto os fragmentos 432, 656 e 714 foram menos abundantes ( $\leq 2$  vezes) nas maiores velocidades de crescimento ( $0,09$  e  $0,2\text{ h}^{-1}$ ). A partir dessas observações, foi realizada uma tentativa de identificação dos metabólitos extracelulares relacionados a esses fragmentos que apresentaram abundância diferencial dependente da condição fisiológica. Porém, a identificação desses metabólitos extracelulares produzidos por *K. lactis* não obteve êxito (dados não mostrados) e não foi conclusiva. Por isso, não foi possível comparar o perfil de massa molecular obtido de cada possível metabólito extracelular com aqueles depositados em bancos de dados e com aqueles descritos na literatura. No entanto, apesar disso, o mapa de calor, análises dos componentes principais e de agrupamento foram realizadas com os dados da intensidade e razão massa/carga dos fragmentos detectados, na tentativa de evidenciar diferenças e/ou similaridades na abundância desses metabólitos, nas condições

avaliadas, além de relacionar os dados desses metabólitos com as velocidades de crescimento, em função da limitação por nitrogênio aplicada.





**Figura 1:** Perfil da intensidade (acima de 5400) *versus* a razão massa carga (m/z), obtido por LC-MS, de fragmentos de metabólitos extracelulares representativo de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas (CC), sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. I- Biorreator I e II- Biorreator II. BAT Log- controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento).

**Tabela 2:** Abundância de fragmentos de metabólitos extracelulares (m/z) representativo de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio.

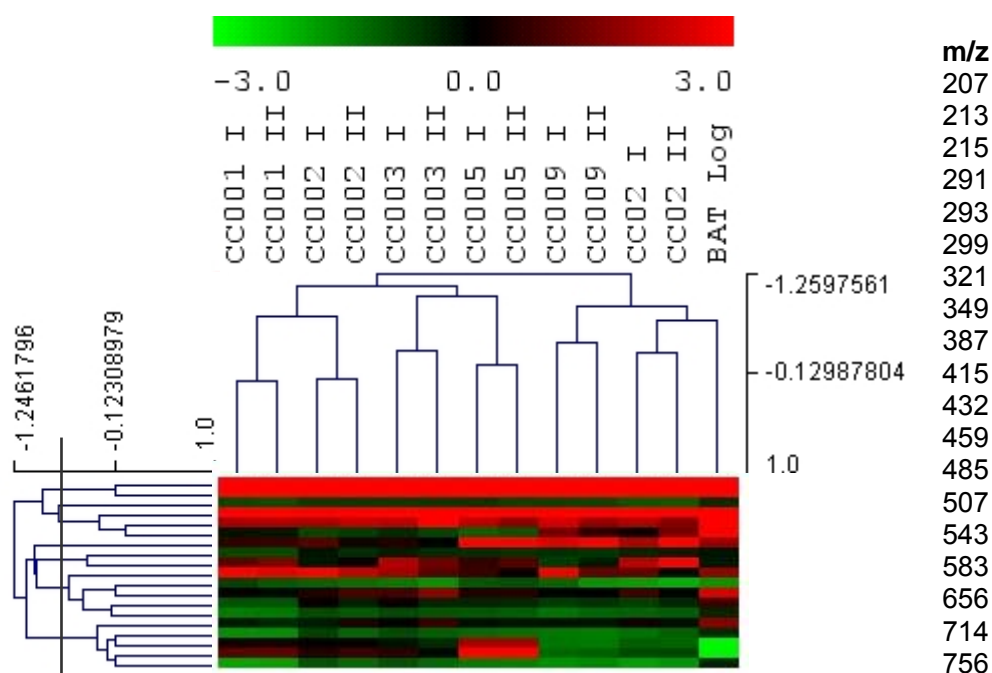
		Fragmentos de Metabólitos Extracelulares (m/z)																		
		207	213	215	291	293	299	321	349	387	415	432	459	485	507	543	583	656	714	756
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,01	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	0,02	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,03	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,05	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,09	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	0,2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	BAT Log*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

\*BAT Log (controle): cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento.

+ intensidade de fragmentos detectada sem diferença significativa entre as velocidades de crescimento avaliadas.

- intensidade de fragmentos  $\leq 2$  vezes do que o maior valor de intensidade detectada entre as velocidades de crescimento avaliadas.

A Figura 2 é o resultado do mapa de calor e do agrupamento hierárquico da intensidade e a razão massa carga, dos fragmentos de metabólitos extracelulares representativos de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, em diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio (biorreatores I e II) e conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (controle BAT Log). Os resultados confirmaram a menor abundância dos fragmentos 299, 321, 349, 485, 507, 583 e 756 nas menores velocidades de crescimento e a menor abundância dos fragmentos 432, 656 e 714 nas maiores velocidades de crescimento. Além disso, foi observado o agrupamento dos fragmentos de metabólitos extracelulares em 7 grupos: m/z 207 e 213; 291, 293 e 299; 349 e 387; 415, 432, 459, 485 e 507; 543, 583, 656, 714 e 756. Os fragmentos m/z 215 e 321 constituíram cada qual um grupo único.



**Figura 2:** Mapa de calor e agrupamento hierárquico da intensidade e razão massa carga (m/z), obtido por LC-MS, de fragmentos de metabólitos extracelulares representativo de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas (CC), sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. I- Biorreator I e II- Biorreator II. BAT Log- controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento).

Apesar dos metabólitos extracelulares produzidos por *K. lactis* não terem sido identificados, no presente estudo, foi observado que houve um perfil diferencial dos fragmentos dos metabólitos em função da velocidade de crescimento das culturas. Tanto pelo perfil da intensidade *versus* a razão massa carga ( $m/z$ ), como pelo mapa de calor, a abundância de determinados fragmentos foi maior ou menor nas menores velocidades de crescimento, onde as condições de limitação por nitrogênio são mais intensas. A partir da análise de metabólitos intracelulares, por LC-MS/MS, em culturas de *S. cerevisiae*, em condições limitantes de glicose, amônia, fosfato, uracila e leucina, sob as velocidades de crescimento de 0,05; 0,11; 0,16; 0,22 e 0,30  $\text{h}^{-1}$ , BOER e colaboradores (2010) verificaram que a produção desses metabólitos, principalmente aminoácidos, é afetada pela disponibilidade nutricional no meio e que a maior concentração de determinados tipos de metabólitos intracelulares é dependente do nutriente limitante e da taxa de crescimento. Além disso, as diferenças na produção dos metabólitos, entre os nutrientes limitantes são mais evidentes em baixas taxas de crescimento.

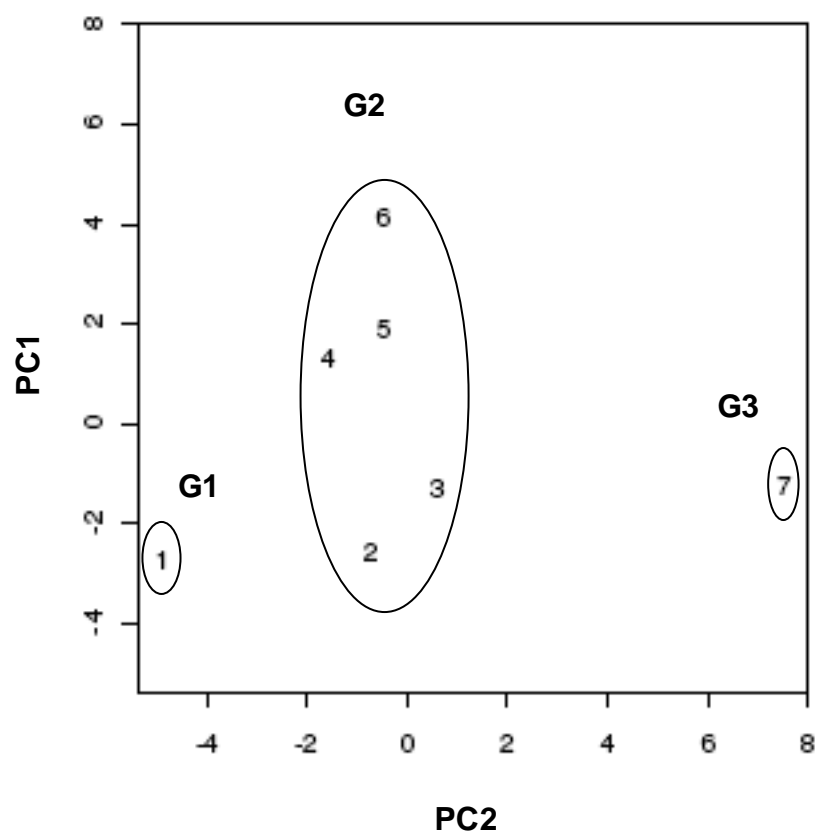
Uma vez realizado o agrupamento dos fragmentos dos metabólitos extracelulares, foi possível constatar 5 grupos constituídos por diferentes fragmentos ( $m/z$ ) e ainda 2 grupos constituídos pelos fragmentos  $m/z$  215 e  $m/z$  321, separadamente. Porém, não foi possível realizar a relação desses fragmentos com processos celulares ou vias metabólicas da levedura, o que dificulta a correlação de algum desses fragmentos de metabólitos extracelulares com o envelhecimento celular de *K. lactis* ou com a própria condição de limitação por nitrogênio. Isso só será possível com a identificação molecular e estrutural dos referidos metabólitos extracelulares.

BRAUER e colaboradores (2006) verificaram maior concentração de adenosina, citidina, citosina, colina, trealose, guanosina, fenilpiruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato, em culturas de *S. cerevisiae* sob limitação por nitrogênio, enquanto GUTTERIDGE e colaboradores (2010) observaram que condições limitantes por nitrogênio podem refletir no aumento dos níveis de cistationa e na redução dos níveis de glutamato, glutamina e alanina.

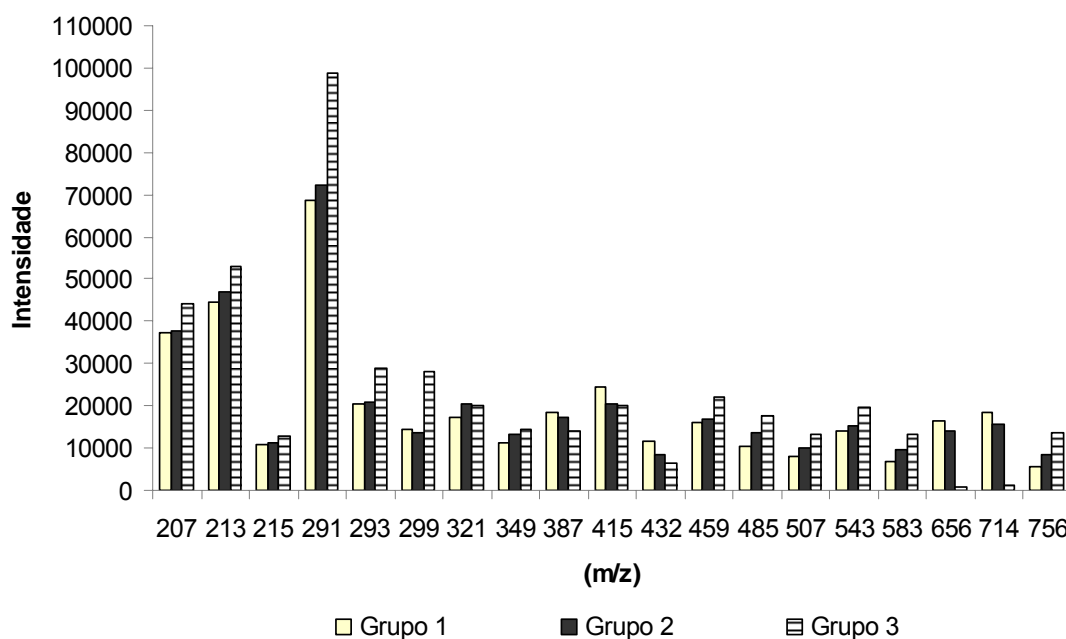
A análise de componentes principais (PCA) e o agrupamento dos tratamentos, correspondentes às culturas contínuas de *K. lactis* conduzidas, sob limitação por nitrogênio, nas velocidades de crescimento de 0,01; 0,02;

0,03; 0,05; 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup> (biorreatores I e II), além de uma cultura conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (BAT Log), estão apresentadas na Figura 3. Os componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) explicaram 83,01% da variação presente. O componente principal 1 representou todos os fragmentos de metabólitos extracelulares, exceto o m/z 321. Com relação ao agrupamento dos tratamentos avaliados, foram obtidos 3 grupos: o grupo 1 (G1), que representa as culturas conduzidas sob a velocidade de crescimento de 0,01 h<sup>-1</sup>; o grupo 2 (G2), que representa as culturas conduzidas sob as velocidades de crescimento de 0,02; 0,03; 0,05; 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>; o grupo 3 (G3), correspondente ao controle BAT log.

A Figura 4 mostra o perfil da intensidade *versus* a razão massa carga (m/z), representativo dos grupos 1, 2 e 3, relacionados aos fragmentos de metabólitos extracelulares de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, em diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio (biorreatores I e II) e conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (controle). Foi observado que à exceção dos fragmentos de metabólitos extracelulares m/z 299, 387, 415, 656 e 714, cuja intensidade foi aparentemente maior no grupo 1, os demais fragmentos apresentaram maior intensidade no grupo 3.



**Figura 3:** Análise de componentes principais e agrupamento de tratamentos representativo da intensidade e razão massa carga (m/z), obtido por LC-MS, de fragmentos de metabólitos extracelulares de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. **1-**  $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ ; **2-**  $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ; **3-**  $\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$ ; **4-**  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ; **5-**  $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ ; **6-**  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ; **7-** BAT Log- controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento). **G1** (Grupo 1); **G2** (Grupo 2); **G3** (Grupo 3).



**Figura 4:** Perfil da intensidade *versus* razão massa carga ( $m/z$ ), dos grupos 1, 2 e 3, relacionados aos fragmentos de metabólitos extracelulares representativos de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Grupo 1:  $\mu = 0,01h^{-1}$ ; Grupo 2:  $\mu = 0,02, 0,03, 0,05, 0,09$  e  $0,2 h^{-1}$ ; Grupo 3: BAT Log - controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento).

Embora a análise de componentes principais (PCA) e o agrupamento dos tratamentos tenha revelado 3 distintos grupos, sendo que no grupo 2 as velocidades de crescimento de  $0,02; 0,03; 0,05; 0,09$  e  $0,2 h^{-1}$  foram consideradas estatisticamente iguais e por isso agrupadas no mesmo grupo, os resultados referentes às características de envelhecimento das células das culturas contínuas de *K. lactis* (Capítulo 3), sob limitação por nitrogênio, indicam a diferença entre as velocidades de crescimento utilizadas. Considerando o pequeno número de variáveis utilizadas na análise (valores referentes à intensidade e razão massa/carga dos 19 fragmentos de metabólitos extracelulares detectados), tal fato pode explicar o resultado do agrupamento dos tratamentos em três grupos apenas.

A análise de componentes principais para metabólitos intracelulares já foi reportada para culturas de *S. cerevisiae*, revelando uma correlação entre os

níveis de metabólitos e a longevidade (*lifespan*) das culturas. Altos níveis de aminoácidos (metionina, prolina, treonina, glutamina, aspartato, glutamato, isoleucina e histidina) foram correlacionados positivamente com a extensão do *lifespan*, enquanto altos níveis de nucleotídeos e seus derivados (inosina, hipoxantina, cAMP, timidina monofosfato, guanosina monofosfato e ribose) foram correlacionados negativamente com a extensão do *lifespan* da levedura (YOSHIDA, *et al.*, 2010).

Mesmo com a maior intensidade da maioria dos fragmentos de metabólitos extracelulares no grupo 3, o perfil metabólico extracelular de *S. cerevisiae*, em diferentes fases de crescimento, cultivada em batelada, em meio YNB acrescido de glicose, aminoácidos, bases e ácidos orgânicos, mostrou que as maiores diferenças quanto à detecção e concentração dos metabólitos foram observadas na transição da fase exponencial para a fase estacionária do crescimento, ou seja, na fase de desaceleração (ALLEN *et al.*, 2003), correspondente à fase do crescimento de *K. lactis*, nas culturas contínuas, sob as diferentes velocidades de crescimento avaliadas. Por outro lado, a maior detecção dos fragmentos m/z 299, 387, 415, 656 e 714, no grupo 1, podem indicar metabólitos produzidos como resposta fisiológica das culturas à condição mais extrema de limitação por nitrogênio ou ao processo de envelhecimento celular, por exemplo. Juntamente com os fragmentos m/z 321, 349, 432, 485, 507, 543, 583 e 756, diferencialmente detectados entre as velocidades de crescimento avaliadas, a identificação desses metabólitos extracelulares pode esclarecer mais precisamente sua relação com respostas fisiológicas de *K. lactis* ou sugerí-los como metabólitos candidatos para tal.

### **3.3. Perfil metabólico extracelular de culturas de *Kluyveromyces lactis* por GC-MS**

Na tentativa de caracterizar o perfil metabólico extracelular de culturas contínuas de *K. lactis*, em diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio, visando a identificação e correlação dos metabólitos produzidos com as condições limitantes ou com o processo de envelhecimento celular, as amostras (sobrenadante) das culturas foram também analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. A Tabela 3 mostra os metabólitos extracelulares identificados das culturas contínuas da levedura,



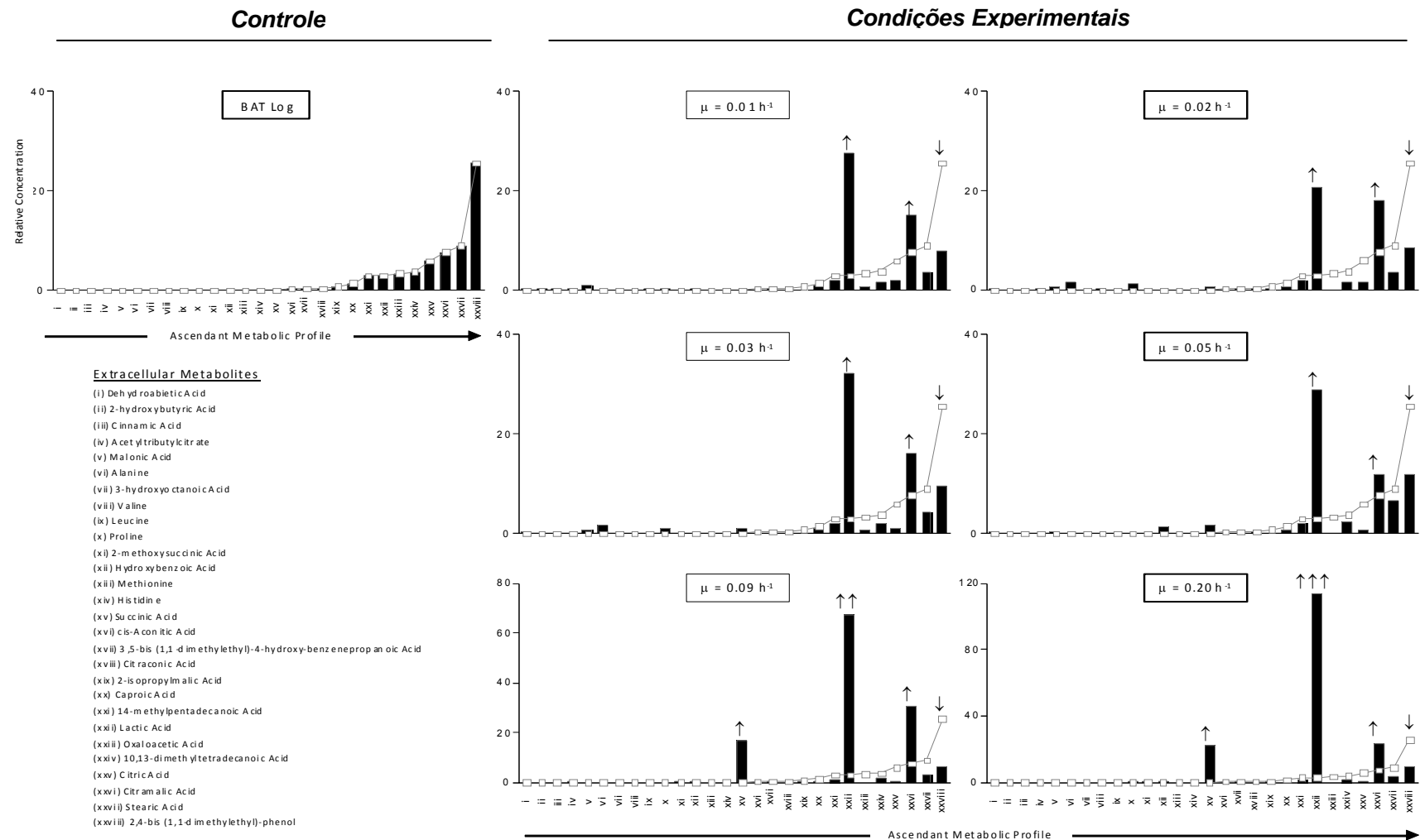
sob as diferentes velocidades de crescimento, cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. Como controle, foi utilizada uma cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (BAT Log). Foram identificados 28 metabólitos extracelulares secretados pelas culturas de *K. lactis*, nas condições avaliadas: 6 aminoácidos, 7 ácidos graxos e 15 ácidos orgânicos. Alguns metabólitos foram diferencialmente mais abundantes nas menores velocidades de crescimento, enquanto outros foram mais abundantes nas maiores velocidades de crescimento.

A Figura 5 apresenta o perfil metabólico extracelular ascendente das culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio. Todas as concentrações relativas dos metabólitos identificados, nas diferentes velocidades de crescimento e condições limitantes de nitrogênio, foram comparadas à cultura controle BAT Log. Foi observado que a concentração relativa de ácido citramálico foi maior do que a do controle, em todas as velocidades de crescimento analisadas. Por outro lado, a concentração relativa do ácido orgânico 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol reduziu quando comparada ao controle, em todas as velocidades de crescimento. A concentração relativa de ácido láctico aumentou consideravelmente nas velocidades de crescimento de 0,01; 0,02; 0,03 e 0,05 h<sup>-1</sup>, sendo os valores detectados duas vezes maiores do que os do controle, na velocidade de 0,09 h<sup>-1</sup>, e três vezes maiores do que os do controle, na velocidade de 0,2 h<sup>-1</sup>. A concentração relativa de ácido succínico, um intermediário da via TCA e de vias do metabolismo de aminoácidos, aumentou apenas nas velocidades de crescimento de 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>, cujas condições de limitação por nitrogênio são menos intensas.

A análise de metabólitos extracelulares, por GC-MS, em culturas de diferentes espécies de *Aspergillus*, detectou a presença abundante de principalmente aminoácidos e ácidos orgânicos, incluindo ácidos di e tricarboxílicos (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005 e 2010). Em condições de limitação por nitrogênio, sob baixas velocidades de crescimento, a concentração dos aminoácidos arginina, histidina, glutamina no meio foi reduzida, enquanto o acúmulo de alguns intermediários da via TCA ( $\alpha$ -cetoglutarato e fenilpiruvato) e trealose foi verificado, o que pode estar associado à regulação do metabolismo (BOER *et al.*, 2010).

**Tabela 3:** Metabólitos extracelulares de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, identificados por GC-MS após derivatização por MCF.

AMINOÁCIDOS	ÁCIDOS GRAXOS	ÁCIDOS ORGÂNICOS
Alanine	3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenepropanoic acid	Acetyltributylcitrate
Histidine	Caproic acid	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol
Leucine	Dehydroabietic acid	Cinnamic acid
Methionine	10,13-dimethyltetradecanoic acid	Cis-Aconitic acid
Proline	3-hydroxyoctanoic acid	Citraconic acid
Valine	14-methylpentadecanoic acid	Citramalic acid
	Stearic acid	Citric acid
		Hydroxybenzoic acid
		2-hydroxybutyric acid
		2-isopropylmalic acid
		Lactic acid
		Malonic acid
		2-methoxysuccinic acid
		Oxaloacetic acid
		Succinic acid

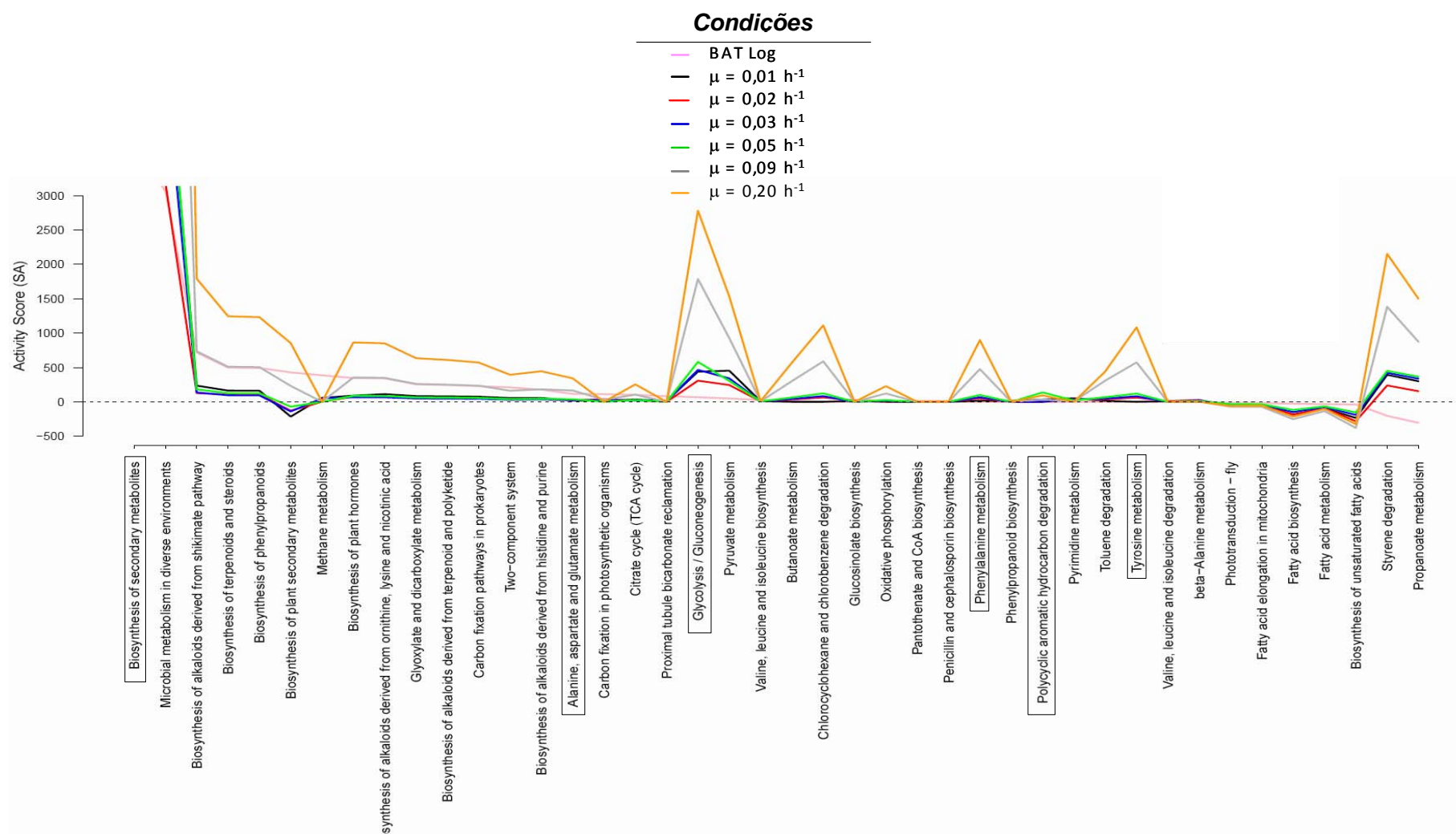


**Figura 5:** Perfil metabólico extracelular ascendente de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio. Controle - cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (BAT Log). (↑) Concentração relativa de metabólitos maior do que a do controle. (↓) Concentração relativa de metabólitos menor do que a do controle. (↑↑) Concentração relativa de metabólitos duas vezes maior do que a do controle. (↑↑↑) Concentração relativa de metabólitos três vezes maior do que a do controle.

A Figura 6 demonstra a atividade de possíveis vias metabólicas de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, baseada nos dados do perfil metabólico extracelular caracterizado por GC-MS. Como controle, também foi utilizada uma cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (BAT Log). Diferentes vias metabólicas foram relacionadas com a produção dos metabólitos extracelulares identificados. No entanto, nem todas as vias metabólicas podem estar integralmente ativas, mas específicas reações dessas vias podem estar ocorrendo. Os valores positivos do score representam metabólitos envolvidos nas vias metabólicas que foram secretados pela levedura, enquanto os valores negativos do score remetem àqueles metabólitos que foram transportados para o interior celular e, consequentemente, assimilados por *K. lactis*.

AGGIO e colaboradores (2010) relacionaram metabólitos intra e extracelulares, produzidos por culturas de *S. cerevisiae*, identificados por GC-MS, com diferentes vias metabólicas. Diferenças entre as atividades das vias metabólicas foram constatadas devido a diferenças nos perfis e na abundância dos metabólitos obtidos.

Possíveis correlações entre as vias e os metabólitos extracelulares produzidos e a condição de limitação nutricional ou o processo de envelhecimento, por exemplo, podem ser sugeridas. Uma possível correlação entre as vias e os metabólitos extracelulares com a condição de limitação por nitrogênio pode ser a detecção das vias referentes ao metabolismo de alanina, aspartato, glutamato, fenilalanina e tirosina. Outra possível correlação dessas vias e metabólitos extracelulares com o processo de envelhecimento de *K. lactis* pode ser a detecção das vias referentes à biossíntese de metabólitos secundários, glicólise/gliconeogênese e degradação de compostos aromáticos policíclicos. No entanto, uma análise mais minuciosa deve ser feita no sentido de correlacionar, mais precisamente, tais vias metabólicas com sinais extracelulares específicos que possam desencadear o processo de envelhecimento ou que possam estar envolvidos com as condições de limitação por nitrogênio.



**Figura 6:** Atividade das vias metabólicas de culturas contínuas de *K. lactis*, sob diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), cada uma correspondendo a um nível de limitação por nitrogênio, baseada nos dados do perfil metabólico extracelular. Controle - cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento (BAT Log).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGIO, R. B. M.; RUGGIERO, K.; VILLAS-BÔAS, S. G. Pathway activity profiling (PAPi): from the metabolite profile to the metabolic pathway activity. **Bioinformatics**, v. 26, n. 23, p. 2969-2976, 2010.

ALLEN, J; DAVEY, H. M.; BROADHURST, D; HEALD, J. K.; ROWLAND, J. J.; OLIVER, S. G.; KELL, D. B. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 692-696, 2003.

AON, J. C. & CORTASSA, S. Involvement of nitrogen metabolism in the triggering of ethanol fermentation in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 3, p. 250-264, 2001.

AVIGNONE-ROSSA, C.; WHITE, J.; KUIPER, A.; POSTMA, P. W.; BIBB, M.; TEIXEIRA, M. J. M. Carbon flux distribution in antibiotic-producing chemostat cultures of *Streptomyces lividans*. **Metabolic Engineering**, v. 4, p. 138-150, 2002.

BOER, V.M.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J. T.; PIPER, M. D. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3265-3274, 2003.

BOER, V. M.; TAI, S. L.; VURALHAN, Z.; ARIFIN, Y.; WALSH, M. C.; PIPER, M. D. W.; WINDE, J. H.; PRONK, J. T.; DARAN, J. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 604-620, 2007.

BOER, V. M.; CRUTCHFIELD, C. A.; BRADLEY, P. H.; BOTSTEIN, D.; RABINOWITZ, J. D. Growth-limiting intracellular metabolites in yeast growing under diverse nutrient limitations. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 198-211, 2010.

BRAUER, M. J.; YUAN, J.; BENNETT, B. D.; LU, W.; KIMBALL, E.; BOTSTEIN, D.; RABINOWITZ, J. D. Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes. **PNAS**, v. 103, n. 51, p. 19302-19307, 2006.

CORRÊA, L. F. M. **Cinética de crescimento e longevidade de culturas de *Kluyveromyces lactis* sob estresse por nitrogênio**. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 50p., 2007 (Dissertação de Mestrado).

DICKINSON, J. R. & SCHWEIZER, M. S. **The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. CRC Press LLC, NY, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004.

GUTTERIDG, A. E.; PIR, P.; CASTRILLO, J. I.; CHARLES, P. D; LILLEY, K. S.; OLIVER, S. G. Control of eukaryote cell growth: a systems biology study in yeast. **BMC Biology**, v. 8, n. 68, p. 1-20, 2010.

HOEK, P. V.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4226-4233, 1998.

KAMINISKI, N.; FRIEDMAN, N. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 27, p. 125-132, 2002.

KOERKAMP, M. G.; REP, M.; BUSSEMAKER, H. J.; HARDY, G. P. M. A.; MUL, A.; PIEKARSKA, K.; SZIGYARTO, C. A.; MATTOS, J. M. T.; TABAK, H. F. Dissection of transient oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 2783-2794, 2002.

LU, W.; KIMBALL, E.; RABINOWITZ, J. D. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 37-50, 2006.

MASHEGO, M. R.; JANSEN, M. L. A.; VINKE, J. L.; VAN GULIK, W. M.; HEIJNEN, J. J. Changes in the metabolome of *Saccharomyces cerevisiae* associated with evolution in aerobic glucose-limited chemostats. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 419-430, 2005.

NIELSEN, J.; HOJER-PEDERSEN, J.; SMEDSGAARD, J. The yeast metabolome addressed by electrospray ionization mass spectrometry: Initiation of a mass spectral library and its applications for metabolic footprinting by direct infusion mass spectrometry. **Metabolomics**, v. 4, p. 393-405, 2008.

PIPER, M. D.; LAPUJADE, P. D.; BRO, C.; REGENBERG, B.; KNUDSEN, S.; NIELSEN, J.; PRONK, J. T. Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses. An interlaboratory comparison using chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37001-37008, 2002.

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

SANTOS, A. V. **Proteoma extracelular de *Kluyveromyces lactis* em cultura contínua sob limitação de nitrogênio**. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 110p., 2008 (Tese de Doutorado).

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

TAI, S. L.; SNOEK, I.; LUTTIK, M. A. H.; ALMERING, M. J. H.; WALSH, M. C.; PRONK, J. T.; DARAN, J. Correlation between transcript profiles and fitness of deletion mutants in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 153, p. 877-886, 2007.

TER LINDE, J. J.; LIANG, H.; DAVIS, R. W.; STEENSMA, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J.T. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of the Bacteriology**, v. 181, p. 7409-7413, 1999.

VAN DER WERF, M. J.; OVERKAMP, K. M.; MULWIJK, B.; COULIER, L.; HANKEMEIER, T. Microbial metabolomics: Toward a platform with full metabolome coverage. **Analytical Biochemistry**, v. 370, p. 17-25, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613-646, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MOXLEY, J. F.; AKESSON, M.; STEPHANOPOULOS, G.; NIELSEN, J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 669-677, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ROESSNER, U.; HANSEN, M. A. E.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. **Metabolome Analysis – An Introduction**. ed. 1, John Wiley & Sons, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G.; SMART, K. F.; AGGIO, R. B. M.; HOUTTE, J. R. V. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, p. 1709-1729, 2010.

WICK, L. M.; QUADRONI, M.; EGLI, T. Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 588-599, 2001.

YOSHIDA, R.; TAMURA, T.; TAKAOKA, C.; HARADA, K.; KOBAYASHI, A.; MUKAI, Y.; FUKUSAKI, E. Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants. **Aging Cell**, v. 9, p. 616-625, 2010.



## **5. ANEXOS**

**Anexo 1:** Valores da intensidade e razão massa carga (m/z), obtido por LC-MS, de fragmentos de metabólitos extracelulares de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas (CC), em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio. I- Biorreator I e II- Biorreator II. BAT Log- controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento). Os resultados representam as médias aritméticas de 3 repetições.

	CC001 I	CC001 II	CC002 I	CC002 II	CC003 I	CC003 II	CC005 I	CC005 II	CC009 I	CC009 II	CC02 I	CC02 II	BAT Log
m/z	Intensidade												
<b>207</b>	37244,33	36474	34750,67	39420	38609,33	39318,67	40086,33	38954,33	37752,33	37670	37938,67	36274,67	44323
<b>213</b>	44739	43341,33	49565,33	50673,67	48973	50590	47938,67	47612,33	46685,67	44569,33	40771	41064,67	52803,5
<b>215</b>	10953	10584,67	11773,33	11870,67	11863	11909,33	12027,33	11251	11183	11140,67	10038,67	9721,333	12660
<b>291</b>	68558,67	71752	73053,33	76180,67	73005	78698,33	70906,33	67485	72201,33	69568,33	71358,67	68113,67	98870,5
<b>293</b>	20452,33	20662,67	20480	21298,67	20978,67	23200,33	21086	19703	21685,33	19892,33	20651,67	19424,67	28758,5
<b>299</b>	14363,33	14123	11187,67	11818,67	12984,33	11443,67	9533,333	10331	18972,67	16798,67	15874,67	18924,67	28102,5
<b>321</b>	17166,33	17403,67	18271	16382	16670	15683	24124,33	23875,67	22108,67	23032,67	20895	23764	20020,5
<b>349</b>	11151,67	11019,67	14349,33	12769,67	13779,33	12785	12768,67	12501,33	12785,67	12446,67	13131	13670	14364
<b>387</b>	18526,33	19410,33	14122,67	16020,33	20873,33	18954,67	17220,33	18292,67	12014	13945	21159,67	24035	14021,5
<b>415</b>	24590,67	22484,33	24069,67	21492	20388	18309	17424,67	16142,67	22709,67	18707,67	18763	15067	20012,5
<b>432</b>	11472,33	10034	9415,667	8679,333	8155,333	6571,333	10211	10662,67	9343,667	6502,333	5930,667	4844,667	6389,5
<b>459</b>	15988,67	15248	16657,33	17917	17774,67	19913,33	16774,67	16921,33	15783	15646,67	17620	15646	21961
<b>485</b>	10600,33	10485,67	15857,67	13627,67	15857	13435,67	13331,33	13039,33	12016,67	12631,33	11758	13301,67	17468,5
<b>507</b>	7996,333	8239,667	11043,33	10050,33	11041,33	10475	10222,33	9946,667	8633,667	9395,333	9587,333	9967,667	13195,5
<b>543</b>	14063	13349,67	13964	16751,67	15829,33	17461,67	14836,67	14388,67	14707	14539,67	16396,67	14844	19685,5
<b>583</b>	6763,667	6918,333	11655,33	9501,667	10975,67	9866,333	9143,667	8657,667	8274,333	8097,667	8827	9911,333	13057,5
<b>656</b>	16307,33	16342,33	15910,67	15900,67	14541	13007,67	20496	20432,67	8538,667	8181	9859,333	9533,667	773,5
<b>714</b>	18402	18648	16738,67	17504,67	16990,67	15173,67	24055	23153,67	9338,333	9881,667	11230	11360,33	1005
<b>756</b>	5484	5852,667	10396,67	9130,667	10424	9054,333	8005,667	7650,333	6824,667	7385,333	5966,333	6503,667	13517,5

**Anexo 2:** Valores da intensidade e razão massa carga (m/z), dos grupos 1, 2 e 3, relacionados aos fragmentos de metabólitos extracelulares de *K. lactis*, conduzida em culturas contínuas, em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio. I- Biorreator I e II- Biorreator II. BAT Log - controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento). Grupo 1:  $\mu = 0,01\text{h}^{-1}$ ; Grupo 2:  $\mu = 0,02, 0,03, 0,05, 0,09$  e  $0,2\text{h}^{-1}$ ; Grupo 3: BAT Log.

m/z	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3
	I	II	I	II	BAT Log
207	37244,3	36474	37827,5	38327,5	44323
213	44739	43341,3	46786,7	46902	52803,5
215	10953	10584,7	11377,1	11178,6	12660
291	68558,7	71752	72104,9	72009,2	98870,5
293	20452,3	20662,7	20976,3	20703,8	28758,5
299	14363,3	14123	13710,5	13863,3	28102,5
321	17166,3	17403,7	20413,8	20547,5	20020,5
349	11151,7	11019,7	13362,8	12834,5	14364
387	18526,3	19410,3	17078	18249,5	14021,5
415	24590,7	22484,3	20671	17943,7	20012,5
432	11472,3	10034	8611,27	7452,07	6389,5
459	15988,7	15248	16921,9	17208,9	21961
485	10600,3	10485,7	13764,1	13207,1	17468,5
507	7996,33	8239,67	10105,6	9967	13195,5
543	14063	13349,7	15146,7	15597,1	19685,5
583	6763,67	6918,33	9775,2	9206,93	13057,5
656	16307,3	16342,3	13869,1	13411,1	773,5
714	18402	18648	15670,5	15414,8	1005
756	5484	5852,67	8323,47	7944,87	13517,5

**Anexo 3:** Valores de concentrações relativas dos metabólitos extracelulares identificados, por GC-MS, em culturas de *K. lactis*, conduzidas em cultivo contínuo (CC), em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio, nos biorreatores I e II. BAT Log - controle (cultura de *K. lactis* conduzida sem condições de limitação por nitrogênio, sob batelada, e em fase exponencial de crescimento). Os resultados representam as médias aritméticas de 3 repetições.

Metabólitos Extracelulares Identificados	CC001	CC002	CC003	CC005	CC009	CC02	BAT Log
Stearic acid	3,65808	3,53966	4,36311	6,58063	2,731	3,84952	9,0357143
Dehydroabietic acid	0,29769	0,31103	0,27377	0,43	ND	ND	ND
2-hydroxybutyric acid	0,29731	0,11552	ND	ND	ND	ND	ND
Lactic acid	27,6062	20,6538	32,1541	29,01	67,52	114,194	2,9882353
Cinnamic acid	0,26923	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14-methylpentadecanoic acid	2,04077	1,7931	2,01148	1,98278	0,96659	1,60429	2,9776316
Citric acid	2,01846	1,52276	1,05779	0,8675	0,453	0,61227	6,005102
Acetyltributylcitrate	0,19423	0,18483	0,175	ND	0,13683	ND	ND
10,13-dimethyltetradecanoic acid	1,80308	1,7869	1,9459	2,25313	1,41267	1,60476	3,8
Citramalic acid	14,9969	17,9503	16,2852	11,865	30,4613	23,7524	7,6918367
Caproic acid	0,93731	0,57517	1,05779	0,82438	0,323	ND	1,4571429
Malonic acid	0,92308	0,6131	0,58361	0,325	0,12529	ND	ND
2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	8,01846	8,61793	9,42295	11,705	6,38133	9,56952	25,57551
Citraconic acid	0,40038	0,36759	ND	ND	0,223	0,33182	0,3285714
Alanine	ND	1,6431	1,63333	ND	ND	ND	ND
3-hydroxyoctanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-isopropylmalic acid	ND	0,17276	0,1918	0,21313	0,29967	0,32048	0,8387755
Valine	ND	0,25069	ND	ND	ND	ND	ND
Leucine	0,204	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proline	0,29167	1,14379	0,93037	ND	ND	0,61095	ND
Cis-Aconitic acid	0,13933	ND	ND	ND	ND	ND	0,2918367
2-methoxysuccinic acid	ND	ND	ND	ND	0,341	0,85143	ND
Hydroxybenzoic acid	0,32433	ND	ND	1,30125	0,315	0,8519	ND
Methionine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenepropanoic acid	0,12233	0,20793	0,16926	0,24438	ND	0,14286	0,3816327
Histidine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Succinic acid	ND	0,78034	1,09057	1,62875	16,8613	22,4114	ND
Oxaloacetic acid	0,72667	ND	0,63407	ND	ND	ND	3,4244898

ND = Não Detectado

## CONCLUSÕES GERAIS

As conclusões deste trabalho foram:

- As fontes preferenciais de nitrogênio para *K. lactis* foram sulfato de amônio, glutamato, glutamina, asparagina e aspartato, enquanto as fontes não-preferenciais foram metionina, histidina, triptofano e cisteína.
- A velocidade específica de crescimento de *K. lactis* aumentou em função da concentração de sulfato de amônio, no intervalo de 0,02 a 30,0 mM obedecendo, ao modelo cinético proposto por Monod, com uma correlação de 0,994.
- O tampão fosfato, pH 6 e 7, foi o que proporcionou o maior crescimento de *K. lactis* e a manutenção do pH do meio por mais tempo, considerando os maiores valores das velocidades específicas de crescimento e da biomassa.
- Culturas de *K. lactis* com densidades ópticas iniciais de 0,05, 0,1 e 0,2, possuíram as maiores velocidades específicas de crescimento.
- As condições fisiológicas de crescimento e de limitação por nitrogênio para culturas contínuas de *K. lactis* foram estabelecidas: meio YCB suplementado com sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, tamponado com tampão fosfato (pH 5,5 - 6,0) e com fluxo de alimentação, que resultasse em velocidades de crescimento de 0,01 a 0,2 h<sup>-1</sup>, correspondendo à limitação por nitrogênio de acordo com o modelo cinético previamente estabelecido.
- Culturas contínuas de *K. lactis* conduzidas sob as menores velocidades de crescimento ( $\mu = 0,01$  e 0,02 h<sup>-1</sup>), em regime permanente, sob limitação por nitrogênio, apresentaram maiores tempo de geração, tempo de residência, produção de biomassa e de proteínas extracelulares.
- A limitação por nitrogênio é garantida pelas próprias condições estabelecidas neste trabalho, porém mais estudos para o maior conhecimento sobre as respostas fisiológicas de leveduras em relação a essa condição são necessários.

- A viabilidade de culturas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, foi menor nas velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup> (~60%), quando comparada às velocidades de crescimento de 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup> (~90%).
- Sob as menores velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup>, a porcentagem de cicatrizes detectadas e a concentração de N-acetilglicosamina foram maiores do que na população de células sob as maiores velocidades de crescimento de 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>.
- As células das culturas contínuas de *K. lactis*, sob a velocidade de crescimento de 0,01 h<sup>-1</sup>, apresentou maior porcentagem de ROS (~67%) do que sob as maiores velocidades de crescimento.
- A porcentagem de células em processo de apoptose, tanto pela externalização de fosfatidilserina como pela fragmentação do DNA foi baixa, variando entre 11 a 0,3%, dentro das velocidades de crescimento avaliadas. No entanto, a porcentagem de células em apoptose foi maior sob as menores velocidades de crescimento de 0,01 e 0,02 h<sup>-1</sup>.
- Com a redução da velocidade de crescimento, as dimensões celulares de *K. lactis* aumentaram aproximadamente 44%.
- A produção de triptofol e feniletanol foi maior nas menores velocidades de crescimento, sendo que tirosol foi apenas detectado na velocidade de crescimento de 0,01 h<sup>-1</sup>.
- Essas observações sugerem que culturas contínuas de *K. lactis*, sob baixas velocidades de crescimento, sejam favoráveis para o estudo da fisiologia do processo de envelhecimento dessa levedura.
- Além disso, o aumento da velocidade de crescimento diminuiu o consumo de glicose por *K. lactis*, aproximadamente, 28 vezes, enquanto reduziu a concentração de etanol e glicerol ~2 e ~20 vezes, respectivamente, sugerindo que a levedura apresentou metabolismo respirofermentativo, nas condições avaliadas.
- Considerando o perfil metabólico extracelular de *K. lactis*, foram detectados, por LC-MS, 19 fragmentos de metabólitos diferentes, com intensidade detectada acima de 5400, porém não foi observada uma

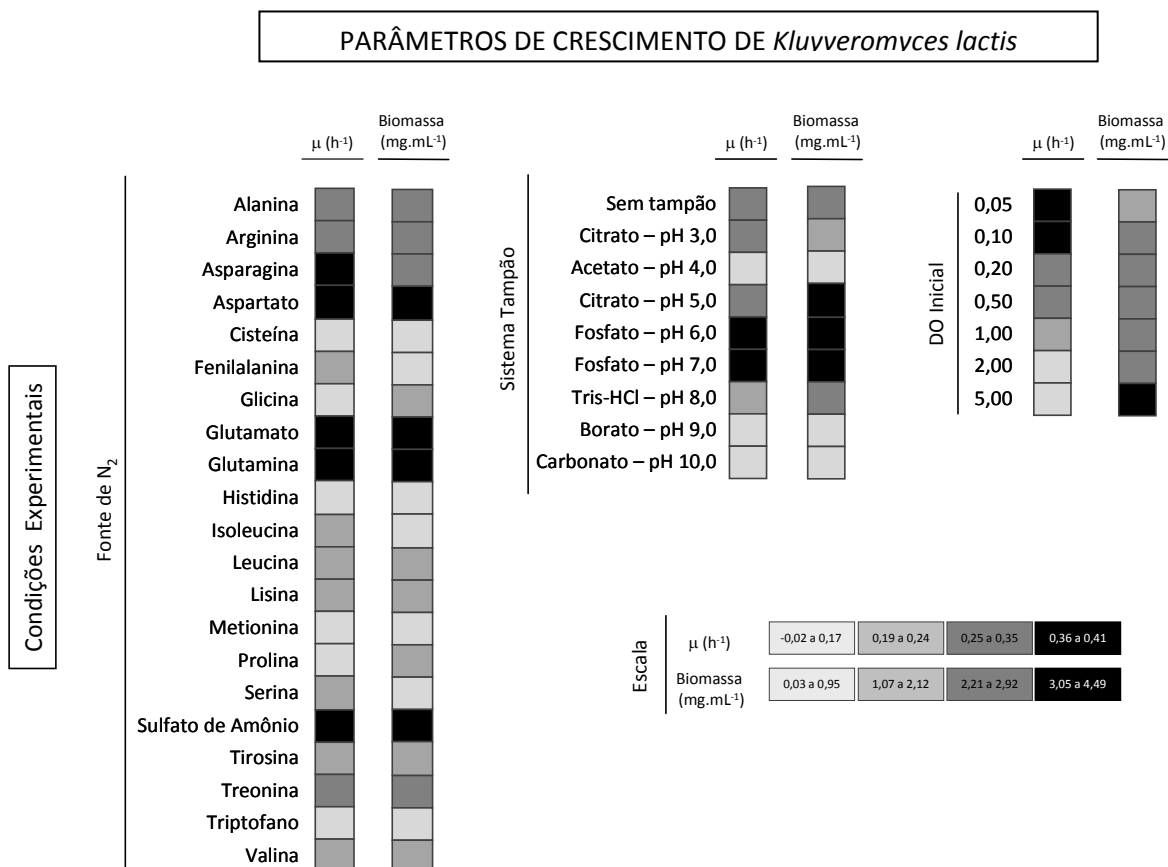
tendência da abundância de todos os fragmentos em determinadas velocidades de crescimento.

- Os fragmentos 299, 321, 349, 485, 507, 543, 583 e 756 foram diferencialmente menos abundantes nas velocidades de crescimento de 0,01 a 0,05 h<sup>-1</sup>, onde as condições de limitação por nitrogênio são mais expressivas, enquanto os fragmentos 432, 656 e 714 foram menos abundantes nas velocidades de crescimento de 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>.
- O agrupamento hierárquico dos fragmentos permitiu constatar 7 grupos constituídos por diferentes fragmentos (m/z), incluindo 2 grupos constituídos pelos fragmentos m/z 215 e m/z 321, separadamente.
- Pela análise de componentes principais e pelo agrupamento dos tratamentos, o componente principal 1 representou todos os fragmentos de metabólitos extracelulares, exceto o m/z 321 e foram obtidos 3 grupos: o grupo 1 (culturas conduzidas sob a velocidade de crescimento de 0,01 h<sup>-1</sup>), o grupo 2 (as culturas conduzidas sob as velocidades de crescimento de 0,02; 0,03; 0,05; 0,09 e 0,2 h<sup>-1</sup>) e o grupo 3 (controle). No entanto, os resultados referentes às características de envelhecimento das células das culturas contínuas de *K. lactis*, sob limitação por nitrogênio, indicam a diferença entre as velocidades de crescimento utilizadas.
- À exceção dos fragmentos de metabólitos extracelulares m/z 299, 387, 415, 656 e 714, cuja intensidade foi aparentemente maior no grupo 1, os demais fragmentos apresentaram maior intensidade no grupo 3.
- Não foi possível realizar a relação dos fragmentos detectados, por LC-MS, com processos celulares ou vias metabólicas da levedura, o que dificulta a correlação de algum desses fragmentos de metabólitos extracelulares com o envelhecimento celular de *K. lactis* ou com a própria condição de limitação por nitrogênio. A identificação desses metabólitos extracelulares pode esclarecer mais precisamente essa correlação.
- Pela análise de GC-MS, foram identificados 28 metabólitos extracelulares (aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos)

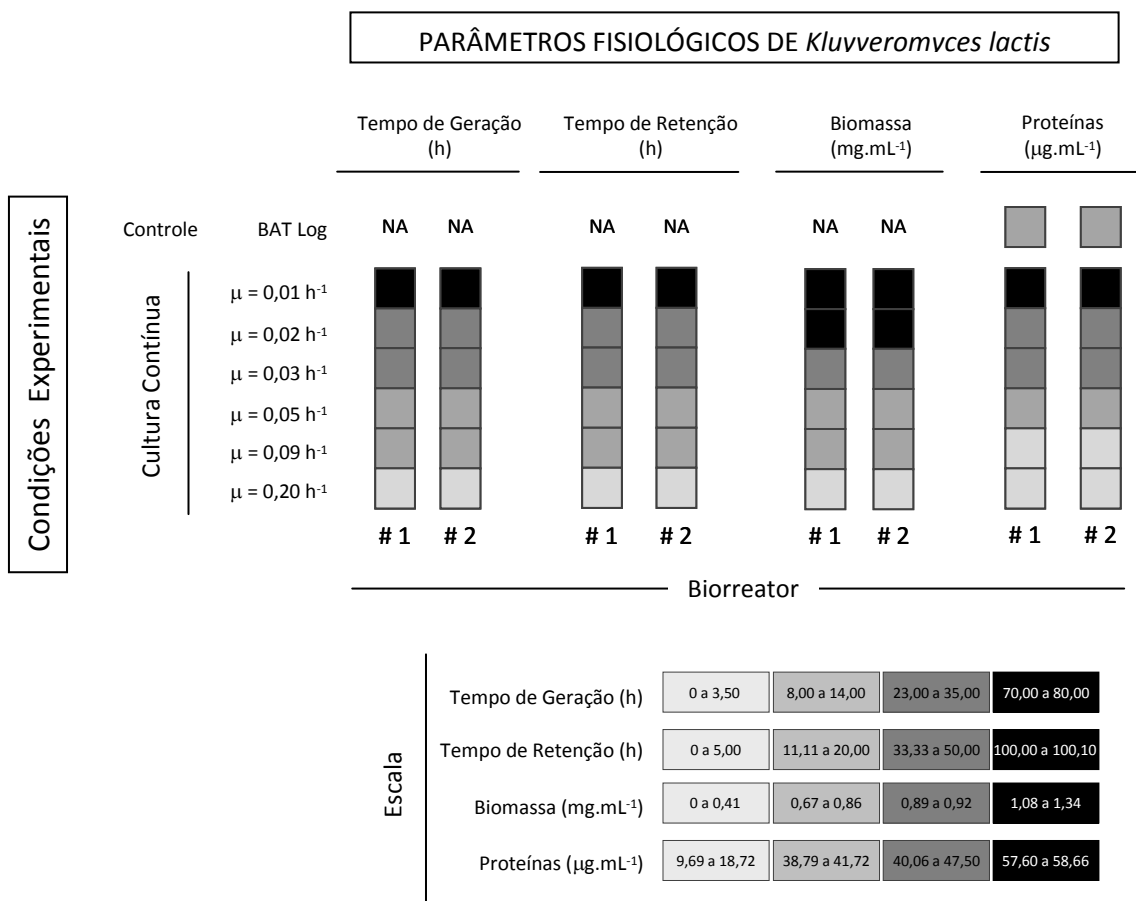
secretados pelas culturas de *K. lactis*, nas diferentes velocidades de crescimento, sob limitação por nitrogênio.

- Alguns metabólitos foram diferencialmente mais abundantes nas menores velocidades de crescimento, enquanto outros foram mais abundantes nas maiores velocidades de crescimento.
- Diferentes vias metabólicas foram relacionadas com a produção dos metabólitos extracelulares identificados, porém uma análise mais minuciosa deve ser feita no sentido de correlacioná-las com possíveis sinais extracelulares que possam desencadear o processo de envelhecimento ou que possam estar envolvidos com as condições de limitação por nitrogênio.



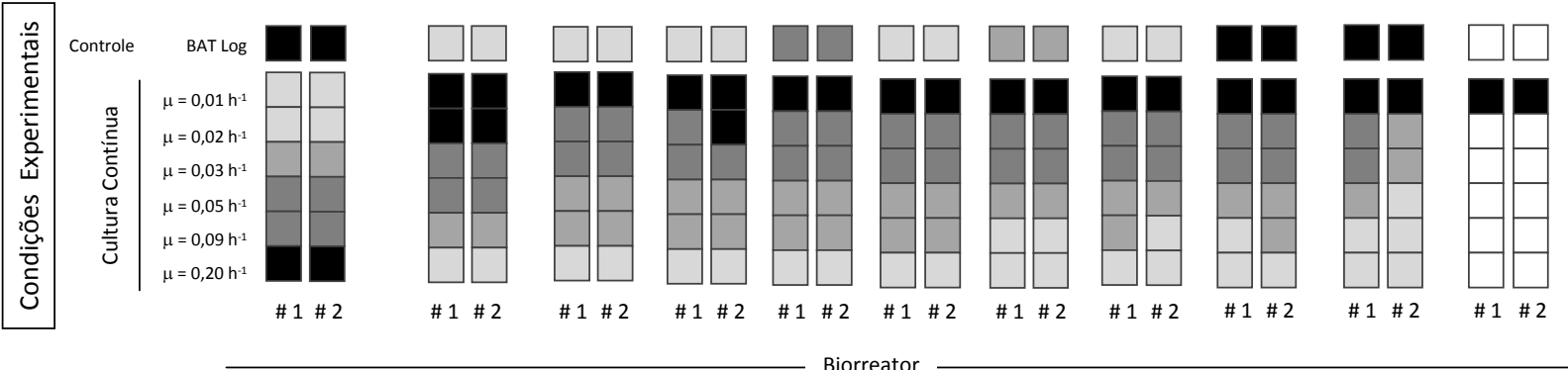


**Diagrama 1:** Diagrama representativo dos parâmetros de crescimento de culturas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas em batelada, sob diferentes fontes de nitrogênio, sistemas tampão e densidades óptica iniciais.

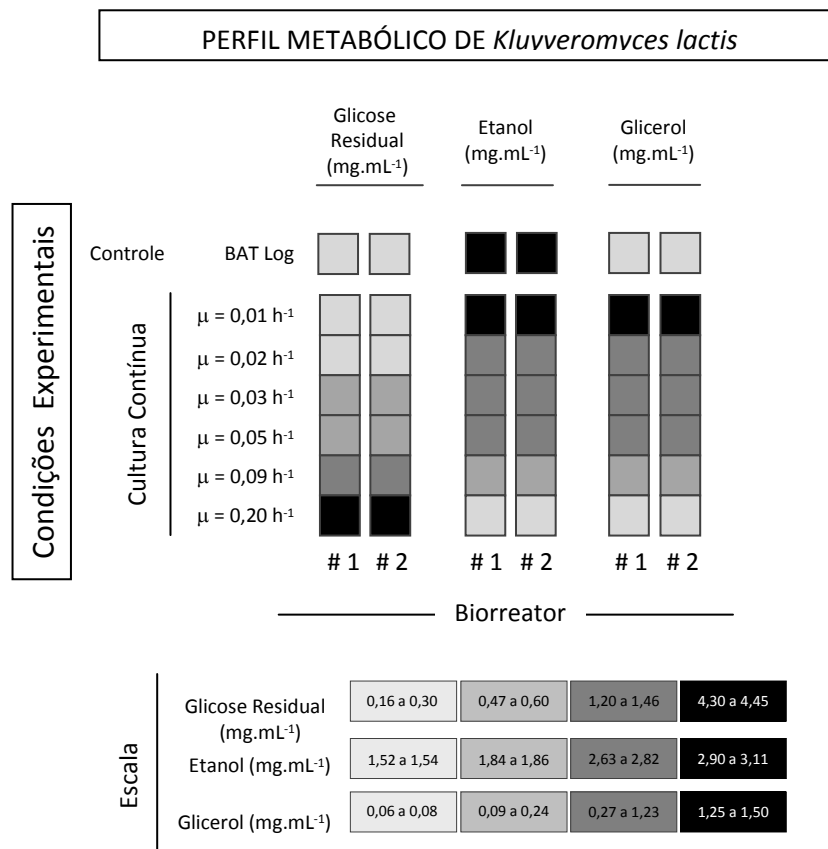


**Diagrama 2:** Diagrama representativo dos parâmetros fisiológicos de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio.

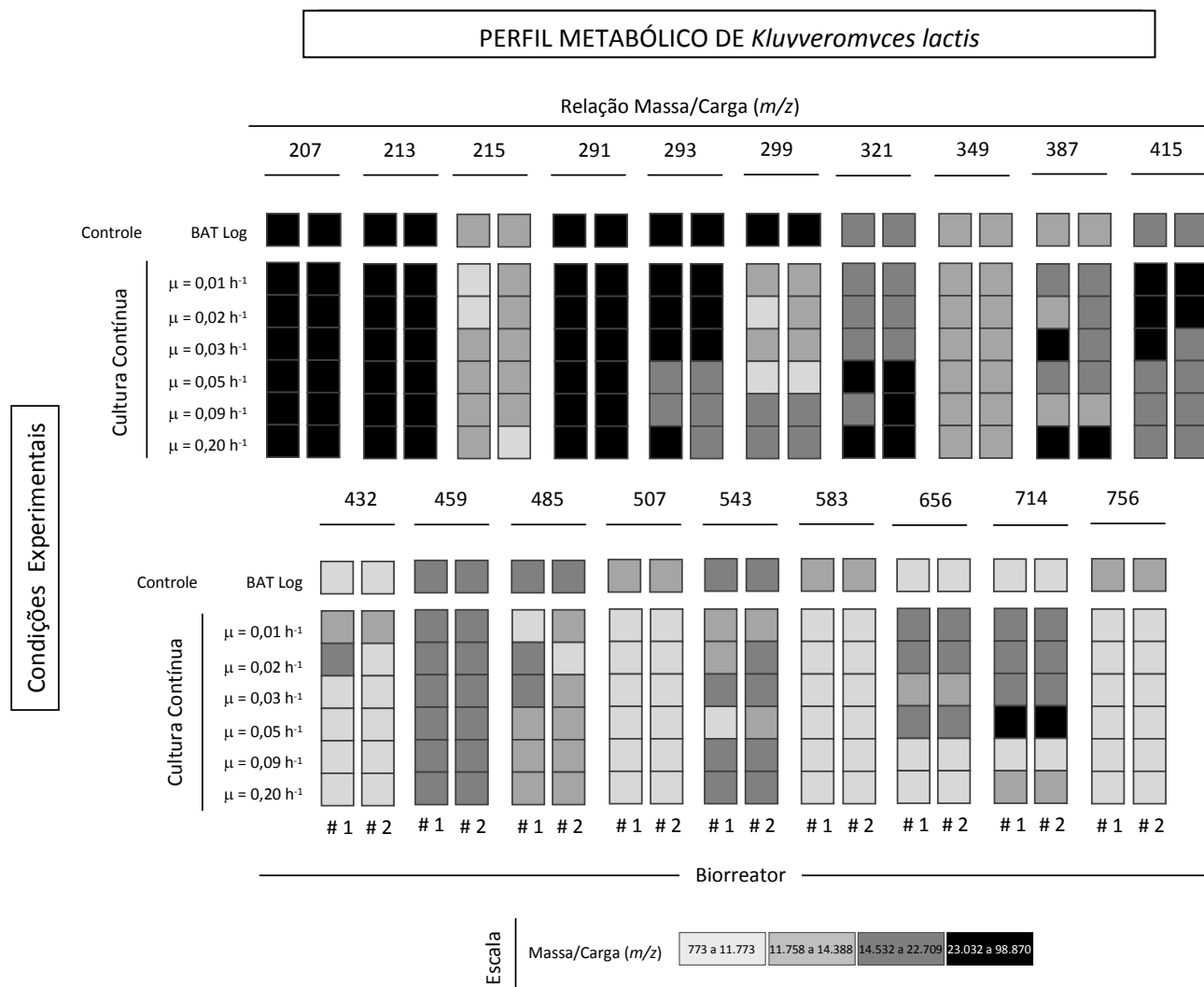
## PARÂMETROS DE ENVELHECIMENTO DE *Kluyveromyces lactis*



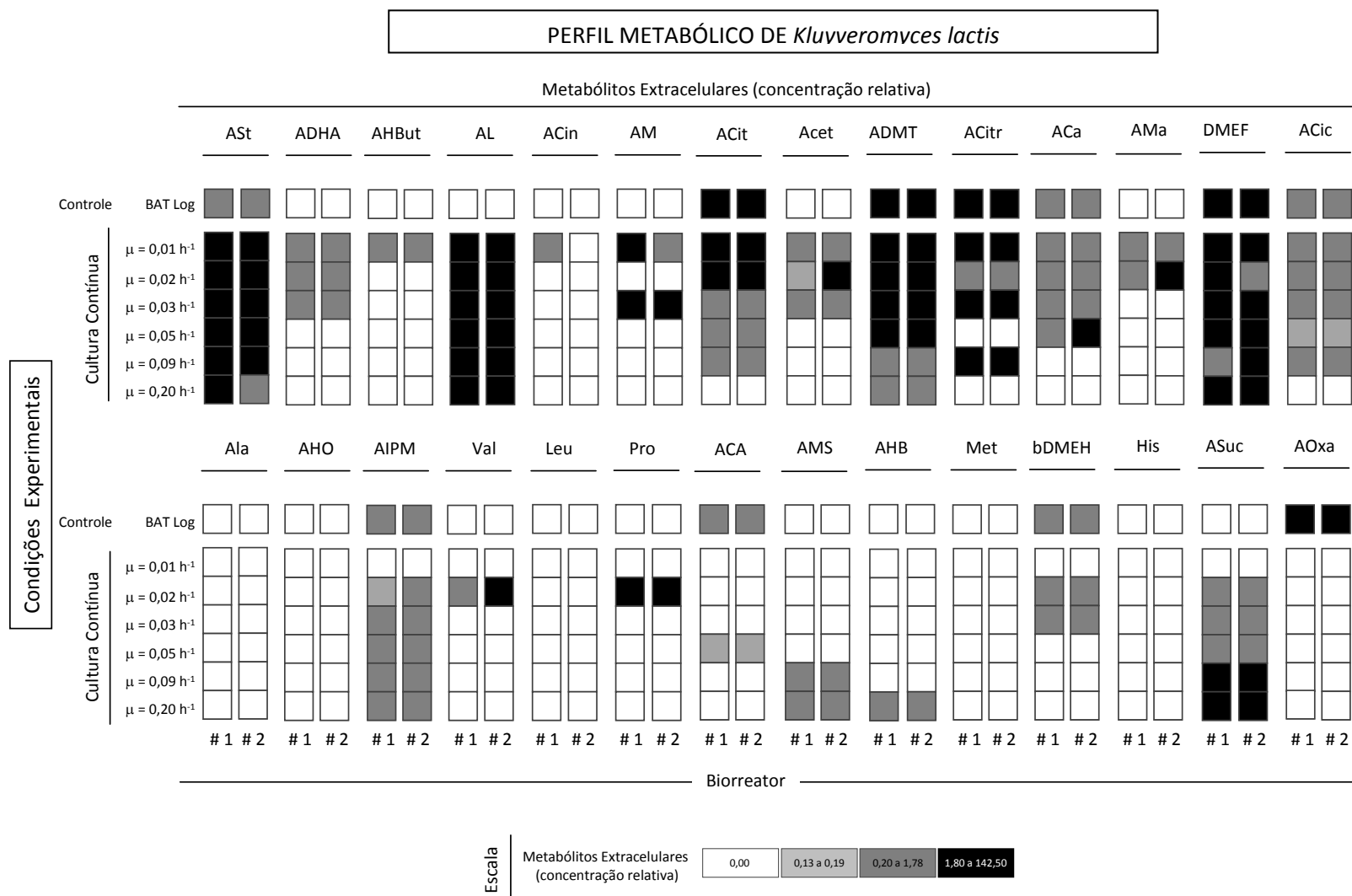
**Diagrama 3:** Diagrama representativo dos parâmetros de envelhecimento de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio.



**Diagrama 4:** Diagrama representativo do perfil metabólico (glicose residual, etanol e glicerol) de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio.



**Diagrama 5:** Diagrama representativo do perfil metabólico (LC-MS) de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio.



**Diagrama 6:** Diagrama representativo do perfil metabólico (GC-MS) de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis*, conduzidas em diferentes velocidades de crescimento ( $\mu$ ), sob limitação por nitrogênio.