

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estudo da produção de β -galactosidase por leveduras a
partir de soro de queijo**

Rosane Rech

Porto Alegre - RS

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DE SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Estudo da produção de β -galactosidase por leveduras à partir de soro de queijo

Rosane Rech

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub
Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Porto Alegre
Fevereiro / 2003

Você vê coisas que existem e pergunta: “Por quê?”

Mas eu sonho com coisas que nunca existiram e pergunto: “Por que não?”

George Bernard Shaw

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, que me deu muita força de vontade, coragem e tranqüilidade quando não mais parecia haver uma luz no fim do túnel.

Ao meu orientador Marco A. Z. Ayub que, além de orientador e colega, é um amigo.

Às minhas bolsistas de iniciação científica Aline Schilling, Daniela R. Rosa, Natália Franken e Camila D. Teles, sem a ajuda, a disponibilidade e o empenho de vocês este trabalho não teria se realizado.

À minha Comissão de Acompanhamento, professoras Célia Carlini e Irene Schrank, por terem acreditado no meu trabalho quando este parecia não ir em frente.

Ao Prof. João A. P. Henriques, à Dr^a. Jenifer Saffi e ao Renato Moreira Rosa, pela ajuda.

Aos secretários do PPGBCM, Sílvia Regina Centeno e ao Luciano Saucedo, pela disponibilidade e ajuda.

Aos meus colegas do Bioteclab, todos.

Aos meus colegas do ICTA.

Aos meus pais René e Ruth, sem eles eu com certeza não teria conquistado tudo o que já consegui na vida.

Ao meu irmão Rafael, minha irmã Raquel e à minha cunhada Carol: eu adoro vocês!

Ao Leonardo, meu amor...

Índice

Resumo.....	11
1 Introdução	12
2 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 Soro de queijo	13
2.2 A enzima β -galactosidase.....	14
2.2.1 Aplicações da β -galactosidase na indústria de alimentos.....	14
2.2.2 Microrganismos que produzem β -galactosidase	16
2.2.3 Produção de β -galactosidase recombinante por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.2.4 Produção industrial de β -galactosidase	18
2.3 Metabolismo da lactose em <i>Kluyveromyces lactis</i>	19
2.3.1 Genes responsáveis pelo metabolismo da lactose em <i>Kluyveromyces lactis</i>	19
2.3.2 Regulação do metabolismo da lactose em <i>Kluyveromyces lactis</i>	20
2.4 Produção de β -galactosidase em biorreator.....	24
2.4.1 Transferência de oxigênio em culturas microbianas	24
2.4.2 Cultivo em batelada alimentada para otimização da produtividade de biorreatores	26
2.5 Bibliografia	28
3 Resultados e Discussão	35
3.1 Influence of aeration and agitation on the production of β -galactosidase by <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556	37
3.1.1 Abstract	37
3.1.2 Introduction	37
3.1.3 Materials and methods	38
3.1.4 Results and discussion.....	40
3.1.5 Conclusions	44
3.1.6 Resumo.....	45
3.1.7 References	45
3.2 Feeding strategies for fed-batch cultivation of <i>Kluyveromyces marxianus</i> in cheese-whey .	47
3.2.1 Abstract	47
3.2.2 Introduction	47
3.2.3 Materials and methods	48
3.2.4 Results and discussion.....	50
3.2.5 Conclusions	56

3.2.6	References	57
3.3	Fed-batch cultivation of recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using cheese-whey as culture medium.....	59
3.3.1	Abstract	59
3.3.2	Introduction	59
3.3.3	Materials and methods	60
3.3.4	Results and discussion.....	63
3.3.5	Conclusions	71
3.3.6	References	72
4	Discussão Geral.....	75
5	Conclusões e Perspectivas.....	78
	Abstract	80
	Anexo I.....	81
	Anexo II	86

Lista de Figuras

Figura 2.2.1: Hidrólise da lactose.	15
Figura 2.3.1: Sequências dos <i>upstream activation sites</i> UAS _G dos genes <i>GAL</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e UASI, UASII e UASIII do gene <i>LAC4</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> . As letras em negrito em UAS _G , UASII e UASIII representam os nucleotídeos homólogos à UASI.	22
Figura 2.3.2: Regulon da β-galactosidase (<i>LAC4</i>) e da lactose-permease (<i>LAC12</i>) de <i>K. lactis</i>	22
Figura 2.4.1: Etapas da transferência de oxigênio da bolha de ar para a célula.....	26
Figure 3.1.1: Growth of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 in bioreactor at agitation of 500rpm and aeration of 3L.min ⁻¹ (condition I).	42
Figure 3.1.2: Growth of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 in bioreactor at agitation of 600rpm and aeration of 6L.min ⁻¹ (condition II).	43
Figure 3.1.3: Growth of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 in bioreactor at agitation of 700rpm and aeration of 9L.min ⁻¹ (condition III).	44
Figure 3.2.1: Batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey.	52
Figure 3.2.2: Fed-batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Exponential ascending feeding profile for 20 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.	52
Figure 3.2.3: Batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 20 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.	53
Figure 3.2.4: Fed-batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Exponential ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.	53
Figure 3.2.5: Fed-batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.	54
Figure 3.2.6: Fed-batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 35 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.	54

Figure 3.2.7: Fed-batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: two times concentrated cheese-whey.....	55
Figure 3.2.8: Fed-batch culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: three times concentrated cheese-whey.....	55
Figure 3.2.9: Influence of the feeding concentration on volumetric activity of β -galactosidase during a fed-batch culture with a linear ascending feeding profile during 25 hours.	56
Figure 3.3.1: Plasmids used in this work to co-transform strain W303. (a) Plasmid pMR4 contains <i>LAC12</i> gene that codes <i>K. lactis</i> lactose-permease; (b) Plasmid pMR11 contains <i>LAC4</i> gene that codes <i>K. lactis</i> β -galactosidase (Rubio-Teixeira <i>et al.</i> , 1998).....	61
Figure 3.3.2: Growth and β -galactosidase production of transformed <i>S. cerevisiae</i> strains (BLR) compared with the wild strain (W303) and with <i>K. marxianus</i> CBS6556 in YPL.....	64
Figure 3.3.3: Growth and β -galactosidase production of transformed <i>S. cerevisiae</i> strains (BLR) compared with the wild strain (W303) and with <i>K. marxianus</i> CBS6556 in YPL. Data represent the mean of two experiments.	64
Figure 3.3.4: Biomass, β -galactosidase activity and sugar consumption of <i>S. cerevisiae</i> BLR030 in orbital shaker at 30°C.....	65
Figure 3.3.5: Batch culture of <i>S. cerevisiae</i> BLR030 grown on cheese-whey. Data represent the mean of two experiments.....	68
Figure 3.3.6: Fed-batch culture of <i>S. cerevisiae</i> BLR030 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Data represent the mean of two experiments.....	69
Figure 3.3.7: Fed-batch culture of <i>S. cerevisiae</i> BLR030 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 35 hours. Data represent the mean of two experiments.....	70
Figure 3.3.8: Fed-batch culture of <i>S. cerevisiae</i> BLR030 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 50 hours. Data represent the mean of two experiments.....	71
Figura 4.1: Comparação das curvas de crescimento das leveduras <i>K. marxianus</i> CBS6556 (Km) e <i>S. cerevisiae</i> BLR030 (Sc) de cultivos em regime batelada (batch) e batelada alimentada com alimentação linear (L) e exponencial (E) durante	

20 horas (20), 25 horas (25), 35 horas (35) e 50 horas (50), com meio de alimentação concentrado duas (2X), três (3X) ou quatro vezes (4X). 75

Figura 4.2: Comparação da produção específica de β -galactosidase das leveduras *K. marxianus* CBS6556 (Km) e *S. cerevisiae* BLR030 (Sc) de cultivos em regime batelada (batch) e batelada alimentada com alimentação linear (L) e exponencial (E) durante 20 horas (20), 25 horas (25), 35 horas (35) e 50 horas (50), com meio de alimentação concentrado duas (2X), três (3X) ou quatro vezes (4X). 76

Figura 4.3: Comparação da concentração volumétrica de β -galactosidase das leveduras *K. marxianus* CBS6556 (Km) e *S. cerevisiae* BLR030 (Sc) de cultivos em regime batelada (batch) e batelada alimentada com alimentação linear (L) e exponencial (E) durante 20 horas (20), 25 horas (25), 35 horas (35) e 50 horas (50), com meio de alimentação concentrado duas (2X), três (3X) ou quatro vezes (4X). 77

Lista de Tabelas

Tabela 2.2.1: Solubilidade e poder edulcorante relativo da sacarose, lactose e de alguns monossacarídeos.....	16
Tabela 2.2.2: Características da β -galactosidases disponíveis comercialmente.....	19
Table 3.1.1: Effect of aeration and agitation rates on the growth parameters of <i>K. marxianus</i>	41
Table 3.1.2: Effect of different types of impellers over K_La in a bioreactor as measured in this work.	42
Table 3.2.1: Yields and productivity for batch cultivation and for different feeding profile and time of fed-batch cultivation: exponential ascending for 20 hours (E20) and 25 hours (E25) and linear ascending for 20 hours (L20), 25 hours (L25) and 35 hours (L35).	56
Table 3.2.2: Yields and productivity for batch cultivation and for different feeding medium concentrations of fed-batch cultivation for a linear ascending profile for 25 hours. 4X: cheese-whey 280g/L, yeast extract 20g/L. 3X: cheese-whey 210g/L, yeast extract 15g/L. 2X: cheese-whey 140g/L, yeast extract 10g/L.	56
Table 3.3.1: Yields and productivity for batch cultivation and for different feeding time of fed-batch cultivation: during 25 hours (FB25), during 35 hours (FB35) and during 50 hours (FB50).....	66

Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar a produtividade do processo de produção de β -galactosidase de leveduras em biorreator utilizando soro de queijo como meio de cultura.

Na primeira parte do estudo determinou-se a influência das velocidades de aeração e de agitação do biorreator na produção de β -galactosidase pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. As condições de agitação e aeração testadas foram: 500rpm e 3L/min (condição I); 600rpm e 6L/min (condição II) e 700rpm e 9L/min (condição III). Os resultados mostraram que esta levedura, considerada *Crabtree* negativa, produz etanol, cuja concentração é maior nas condições de menor aeração. A produção de β -galactosidase mostrou-se dependente das velocidades de aeração, sendo menor na condição de maior aeração, e sendo que a maior produtividade da enzima foi atingida na condição intermediária de oxigenação (condição II).

Após, estudou-se diferentes estratégias de alimentação objetivando culturas de alta concentração celular de *K. marxianus* em cultivos batelada alimentada. Foram testados dois perfis de alimentação (linear e exponencial), três tempos de alimentação (20, 25 e 35 horas) e três diferentes concentrações do meio de alimentação (soro de queijo concentrado duas, três ou quatro vezes). Os resultados mostraram que os cultivos em regime de batelada alimentada não geraram altas concentrações de biomassa. Contudo, a inserção contínua de lactose no meio de cultura induziu uma alta atividade específica de β -galactosidase, aumentando, conseqüentemente, a atividade volumétrica e a produtividade do processo. A melhor estratégia de alimentação, linear crescente durante 25 horas com soro de queijo três vezes concentrado, resultou em uma produtividade β -galactosidase de 291U/(L.h), 50% maior que a produtividade da cultura em batelada.

Paralelamente a este estudo, construiu-se uma cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* produtora de β -galactosidase. A levedura *S. cerevisiae* W303 foi transformada com os plasmídeos integrativos *LAC4* e *LAC12*, que codificam β -galactosidase e lactose-permease de *Kluyveromyces lactis*. A cepa transformante BLR030 foi escolhida entre as outras devido ao seu crescimento e produção de β -galactosidase. Um meio de cultura composto por soro de queijo desproteínizado suplementado por extrato de levedura (1%) e peptona (3%) foi escolhido, entre os meios testados, para os experimentos em biorreator. Foram realizados cultivos em regime de batelada e batelada alimentada com alimentação linear crescente durante 25 (FB25), 35 (FB35) e 50 (FB50) horas. Os cultivos FB35 e FB50 apresentaram as maiores atividades específicas da enzima (em torno de 1.800U/g) e também a maior produtividade de β -galactosidase (180U/(L.h)).

1 Introdução

À medida que o século 21 foi se aproximando, a biotecnologia emergiu como uma área inovadora, vigorosa e promissora, tanto no meio acadêmico como no meio industrial. Os avanços na biologia molecular, na instrumentação e na computação desencadearam o desenvolvimento de uma área inerentemente multidisciplinar: a engenharia de bioprocessos.

O desenvolvimento da engenharia de bioprocessos permitiu o aperfeiçoamento dos processos biotecnológicos tradicionais conhecidos há séculos pela humanidade, mas, sobretudo abriu novos horizontes para o estudo e industrialização de novos produtos, provenientes de microrganismos geneticamente modificados ou não, como enzimas, bioplásticos, vacinas e proteínas terapêuticas, entre outros.

Paralelamente, à proporção que a população mundial tem aumentado, surgiu a preocupação com a utilização sem controle dos recursos naturais na Terra. Isto se traduziu em legislações sobre o controle de emissões (tanto aéreas como efluentes hídricos) das indústrias e nas pesquisas sobre desenvolvimento sustentável e utilização de fontes de energia renováveis.

Dentro deste contexto este trabalho propõe a utilização de um efluente da indústria de laticínios, o soro de queijo, como meio de cultura para a produção da enzima β -galactosidase, um produto de valor agregado. Este estudo desenvolveu-se em duas frentes: a construção de uma cepa recombinante de levedura com alta produtividade específica de β -galactosidase e o estudo e otimização, em biorreator, do processo de produção da enzima, utilizando técnicas de cultivo em batelada alimentada tanto para uma cepa selvagem quanto para a cepa recombinante.

Mais especificamente, os objetivos deste trabalho foram:

1. estudar a influência da aeração e da agitação do biorreator sobre a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* em cultivos batelada;
2. desenvolver um cultivo em regime batelada alimentada para maximizar a produção de β -galactosidase por *K. marxianus* visando culturas com altas concentrações celulares;
3. construir uma cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* com alta produtividade de β -galactosidase;
4. estudar a produção de β -galactosidase recombinante em biorreator através de cultivos em batelada e batelada alimentada.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Soro de queijo

O soro de queijo constitui-se no líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite durante a fabricação de queijo. Este subproduto representa em torno de 85-95% do volume de leite utilizado e retém 55% dos nutrientes do leite, sobretudo lactose (4,5-5%w/v), proteínas solúveis (0,6-0,8%w/v), lipídeos (0,4-0,5%w/v) e sais minerais (8-10% do extrato seco). Contudo, devido à sua baixa concentração de matéria sólida (6-7%w/v), o soro de queijo normalmente é considerado um efluente. Apesar de diversas tecnologias para a utilização de soro de queijo já estarem desenvolvidas, e algumas já sendo utilizadas, aproximadamente a metade da produção mundial de soro de queijo não é tratada e é descartada diretamente como efluente (González-Siso, 1996). Segundo dados do *US Department of Agriculture*, a produção de queijo no Brasil vem aumentando anualmente, atingindo 445 mil toneladas no ano de 2000 (USDA–NASS, 2002), o que gerou, aproximadamente, 4 milhões de toneladas de soro de queijo.

A primeira tentativa de aproveitamento do soro de queijo foi sua utilização *in natura* na alimentação de animais em fazendas, sobretudo porcos, pois, em adição às proteínas de alta qualidade e à lactose, o soro ainda contém cálcio, fósforo, enxofre e vitaminas hidrossolúveis. Contudo, a grande quantidade de lactose e minerais e a distância entre as indústrias de queijo e as fazendas onde este pode ser consumido são fatores limitantes para a utilização do soro na alimentação animal (González-Siso, 1996; Barba *et al.*, 2001).

Hoje, parte do soro de queijo gerado é desidratado e comercializado em pó como aditivo para a indústria de produtos lácteos, panificação, salgadinhos, biscoitos e confeitos (Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA, 1997). Só os Estados Unidos produziram 538,8 mil toneladas de soro desidratado no ano de 2000 (USDA–NASS, 2002). Além do soro de queijo em pó, produtos derivados deste como soro com teor de lactose reduzido, soro desmineralizado, concentrados de proteína de soro (WPC-34, WPC-50, WPC-60, WPC-75 e WPC-80), isolado de proteína de soro (WPI) e lactose têm encontrado ampla aplicação nas indústrias acima referidas. Os concentrados e isolados de proteína de soro ainda têm larga aplicação na indústria de embutidos devido às suas propriedades funcionais, e na indústria de alimentos especiais e de bebidas fortificadas com proteínas devido ao seu alto valor nutricional (Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA, 1997).

Contudo, as aplicações acima não são suficientes para utilizar todo o soro de queijo. Desta forma, diversos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver processos para a transformação do soro em produtos de maior valor agregado. Entre estes, destacam-se os que transformam o soro de queijo ou o permeado de soro em meio de cultura para a formação de biomassa e produção de etanol (Marwaha e Kennedy, 1984; Chen e Zall, 1982; Tin e Mawson, 1993), ácido láctico (Mehaia e Cheryan, 1987; Tejayadi e Cheryan, 1995), ácido propiônico (Jain *et al.*, 1991; Colomban *et al.*, 1993), óleo microbiano (Floetenmeyer *et al.*, 1985), extrato de levedura e ribonucleotídeos (Moresi *et al.*, 1995; Belem *et al.*, 1997), e enzimas como β -galactosidase (Bales e Castillo, 1979; Greenberg e Mahoney, 1982; Gomez e Castillo, 1983) e inulinase (Hewitt e GrootWassink, 1984).

2.2 A enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (β -D-galactoside galactohidrolase, EC 3.2.1.23), popularmente conhecida como lactase, hidrolisa os resíduos β -galactopiranosil de glicosídeos de fenol, 4-nitrofenol e outras pequenas moléculas, de dissacarídeos como a lactose (Gal β 1 \rightarrow 4Glc) e lactulose (Gal β 1 \rightarrow 4Fru) e de oligossacarídeos livres. A β -galactosidase também hidrolisa α -L-arabinoses, mas não hidrolisa α -D-galactosídeos (rafinose, estaquiose, galactinol e melobiose), metil-D-galactosídeos ou β -D-galactofuranosídeos (anéis com cinco átomos) (Keeseey, 1987).

2.2.1 Aplicações da β -galactosidase na indústria de alimentos

A utilização da β -galactosidase na indústria de laticínios se dá principalmente com o objetivo de produzir leite livre de lactose para pessoas com intolerância a este dissacarídeo (García-Caribay e Gómez-Ruiz, 1996).

A lactose, um dissacarídeo formado por glicose e galactose, é praticamente o único carboidrato presente no leite, onde sua concentração é de 4,7 a 5,2% no leite de vaca, 6,5% no leite humano e em torno de 4,5% em leites de cabra e ovelha (García-Caribay e Gómez-Ruiz, 1996). No homem, como na maioria dos mamíferos, a atividade de β -galactosidase intestinal cai após o período normal de amamentação. Em populações das regiões norte e central da Europa a atividade de β -galactosidase permanece relativamente alta até a idade adulta, entretanto em certos grupos étnicos de negros e asiáticos ocorre a deficiência de β -galactosidase intestinal na idade adulta (Duran e Angelis, 1985). Quando não há hidrólise da lactose no intestino, a mesma não é absorvida, chegando à última porção do intestino delgado e do cólon intacta. O resultado é uma

modificação na flora intestinal que leva uma produção excessiva de gás e de ácido, gerando distúrbios intestinais como cólica, flatulência e diarreia (Kardel *et al.*, 1995). Apesar de sua baixa digestibilidade por algumas populações, a lactose está envolvida na absorção de cálcio e fósforo e sua não absorção implica na perda destes e outros sais minerais (García-Caribay e Gómez-Ruiz, 1996; Kardel *et al.*, 1995). Para este público, além de produtos lácteos com baixo teor de lactose, como leites e iogurtes, também está disponível β -galactosidase em cápsulas ou gotas, como complemento alimentar. A Figura 2.2.1 mostra a hidrólise da lactose em seus monossacarídeos glicose e galactose.

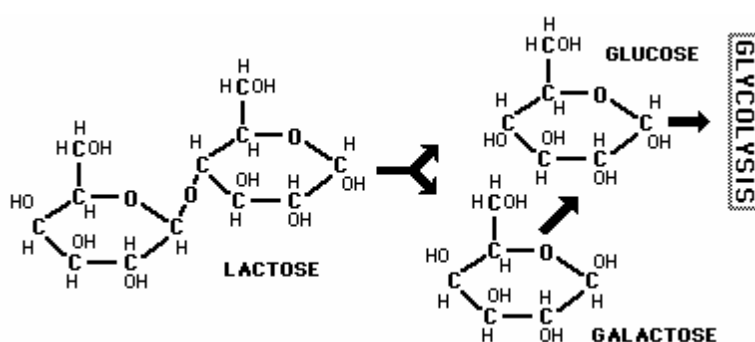


Figura 2.2.1: Hidrólise da lactose.
 Fonte: <http://www.science-projects.com/Lactase.htm>

Outras aplicações da β -galactosidase na indústria de laticínios devem-se a modificações nas propriedades físicas e químicas dos produtos resultantes da hidrólise da lactose no leite e no soro de queijo (Holsinger, 1978). O poder adoçante e a solubilidade de uma mistura de glicose e galactose são consideravelmente maiores que a lactose, conforme mostrado na Tabela 2.2.1. A glicose e a galactose apresentam baixa viscosidade, o que permite alta concentração de sólidos sem que haja cristalização. A glicose e a galactose são, ainda, de 2,5 a 5 vezes mais reativas à reação de Maillard que a lactose (Kardel *et al.*, 1995).

Diante do exposto, a β -galactosidase aplica-se na indústria de laticínios na fabricação de leite com baixo teor de lactose, na fabricação de doces de leites, leites aromatizados e concentrados, em leites fermentados, queijo e na fabricação de sorvetes. A β -galactosidase também pode ser utilizada para transformação do soro de queijo em um xarope concentrado de glicose e galactose para sua utilização como substituto da sacarose em produtos como sorvetes, chocolates, produtos de confeitaria, iogurtes e refrigerantes de frutas (Kardel *et al.*, 1995; Zadow, 1983).

Tabela 2.2.1: Solubilidade e poder edulcorante relativo da sacarose, lactose e de alguns monossacarídeos.

	Doçura relativa	Solubilidade (g/100g solução)		
		10°C	20°C	30°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-galactose	32	28	36	47
D-glicose	74	40	54	70
D-frutose	173	---	82	87

Fonte: Zadow, 1983.

2.2.2 Microrganismos que produzem β -galactosidase

Possíveis fontes de β -galactosidase incluem plantas (amêndoas, pêssegos, damascos, maçãs, sementes de alfafa, grãos de café e extremidades de rosas selvagens), órgãos de animais (intestino), bactérias, leveduras (enzimas intracelulares) e fungos filamentosos (enzimas extracelulares) (Gekas e López-Leiva, 1985; Wierzibicki e Kosikowski, 1973).

Entre as bactérias produtoras de β -galactosidase encontram-se cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Leuconostoc citrovorum*, e bactérias termofílicas como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* (Gekas e López-Leiva, 1985; Wierzibicki e Kosikowski, 1973). Destes organismos, foi o *S. thermophilus* que recebeu maior atenção dos pesquisadores (Greenberg e Mahoney, 1982). As β -galactosidasas de bactérias possuem pH ótimo em torno da neutralidade e temperatura ótima variando entre 30°C e 50°C, conforme o microrganismo produtor (Wierzibicki e Kosikowski, 1973).

Diversas leveduras têm sido estudadas como potenciais produtoras de β -galactosidase. Entre elas encontram-se cepas de *Candida pseudotropicalis*, *Tolulopsis versatilis*, *Tolulopsis sphaerica*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* (Wierzibicki e Kosikowski, 1973; Bales e Castillo, 1979; Itoh *et al.*, 1982; Gómez e Castillo, 1983; Furlan *et al.*, 1995; Rech *et al.*, 1999). As leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* aparecem em alguns trabalhos com sua denominação antiga de *Saccharomyces lactis* e *Saccharomyces fragilis* respectivamente. As β -galactosidasas de leveduras possuem atividade ótima em pH neutro (entre 6,0 e 7,5) e temperatura ótima variando de 30°C a 40°C, contudo todas elas mantêm uma atividade residual em torno de 40% a 15°C (Itoh *et al.*, 1982; Rech *et al.*, 1999) o que permite que a hidrólise

da lactose do leite seja realizada a menores temperaturas, evitando o crescimento de microrganismos.

A atividade de β -galactosidase foi descrita em diversos fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus flavus*, *Neuspora crassa*, *Mucor pucillus*, *Mucor meihei*, *Scopuloriopsis*, *Alternaria palmi*, *Curvularia inaequalis*, *Fusarium moniliforme* e *Alternaria alternara*. Os fungos do tipo *Neuspora* apresentam atividade ótima de β -galactosidase nos pHs 4,5 e 7,0, sugerindo um sistema de duas enzimas agindo sobre o mesmo substrato. Já a β -galactosidase proveniente de *Aspergillus* atinge atividade máxima em pH 3,5 a 5,5. As temperaturas de atividade máxima de β -galactosidase de fungos filamentosos variam entre 40°C e 50°C (Gekas e López-Leiva, 1985; Wierzibicki e Kosikowski, 1973).

2.2.3 Produção de β -galactosidase recombinante por *Saccharomyces cerevisiae*

Desde o surgimento das metodologias bioquímicas básicas necessárias para a biologia molecular nos anos setenta, os trabalhos desenvolvidos levaram à produção de diversos compostos úteis como insulina, interferon e hormônio de crescimento em microrganismos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar das primeiras pesquisas em DNA recombinante estarem focadas, sobretudo em procariotos como *E. coli*, a levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo atrativo para o estudo de proteínas eucarióticas heterólogas (Patkar e Seo, 1992). A levedura *S. cerevisiae* é reconhecida como um organismo seguro (GRAS – *Generally Recognized as Safe*), não possui endotoxinas nem vírus líticos e é capaz de realizar modificações pós-traducionais (Alberghina *et al.*, 1991).

A levedura *S. cerevisiae* é largamente utilizada na indústria de panificação, na produção de bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas e na produção de álcool etílico. Como não possui atividade de β -galactosidase, é incapaz de crescer em lactose como única fonte de carbono. À partir do conhecimento dos genes que codificam as proteínas que permitem o metabolismo da lactose em *Kluyveromyces lactis*, iniciaram-se pesquisas que visavam construir uma *S. cerevisiae* capaz de crescer em lactose. Dickson (1980) expressou o gene *LAC4* (β -galactosidase) de *K. lactis* em uma cepa de *S. cerevisiae*, contudo esta cepa revelou-se incapaz de crescer em lactose devido à ausência da lactose-permease. A primeira cepa de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar lactose foi construída por Sreerikshna e Dickson (1985), que clonaram uma região de 13kb do DNA de *K. lactis* que continha o gene *LAC4*. Este trabalho possibilitou a localização do gene *LAC12* (lactose-permease) de *K. lactis*.

A partir do final da década de 90, surgiram novos trabalhos de construção de cepas de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar lactose. Rubio-Teixeira *et al.* (1998) e Adam *et al.* (1999) construíram cepas *S. cerevisiae* capazes de metabolizar lactose através da integração no genoma dos genes *LAC4* e *LAC12* de *K. lactis* nos sítios de rDNA (DNA ribossomal). Estas cepas mostraram-se altamente eficientes na assimilação de lactose, inclusive soro de queijo (Rubio-Teixeira *et al.*, 2000) e como levedura de panificação (Adam *et al.*, 1999) respectivamente.

Domingues *et al.* (1999a) construíram uma cepa floculante *S. cerevisiae* capaz de metabolizar lactose através da expressão dos genes *LAC4* e *LAC12* de *Kluyveromyces marxianus*. Esta cepa foi testada em fermentações contínuas para a produção de etanol utilizando lactose como única fonte de carbono (Domingues *et al.*, 1999b) ou utilizando permeado de soro de queijo (Domingues *et al.*, 2001).

Outros estudos de produção de β -galactosidase recombinante por *S. cerevisiae* foram feitos em termos de clonagem e expressão do gene *LACA*, β -galactosidase extracelular de *Aspergillus niger* (Kumar *et al.*, 1992; Ramakrishnan e Hartley, 1993; Domingues *et al.*, 2000; Domingues *et al.*, 2002), expressão de β -galactosidase de *Escherichia coli* (Compagno *et al.*, 1995) e de *Candida pseudotropicalis* (Tretiak *et al.*, 1998).

2.2.4 Produção industrial de β -galactosidase

A β -galactosidase de *E. coli*, apesar de bastante estudada, não é utilizada no processamento de alimentos devido ao seu custo e ao fato de problemas de toxicidade devido à presença de coliformes no extrato enzimático (Gekas e López-Leiva, 1985).

Em virtude do seu pH ótimo em torno de (3,0-5,0), as β -galactosidases de fungos filamentosos têm sua utilização limitada ao soro de queijo ácido e ao soro de queijo doce previamente acidificado, ao passo que a β -galactosidases de leveduras, que possuem seu pH ótimo entre 6,5 e 7,3 são as enzimas destinadas à hidrólise da lactose no leite (García-Caribay e Gómez-Ruiz, 1996). A Tabela 2.2.2 mostra as características das principais enzimas comerciais disponíveis no mercado em 1996.

Contudo, hoje parece que o mercado de produção de β -galactosidase é dominado por duas grandes empresas: a Novo Nordisk A/S, dinamarquesa, que comercializa a β -galactosidase sob o nome de Lactozym[®] e a Royal Gist-Brocades NV, holandesa, que comercializa a enzima sob o nome Maxilact[®]. Ambas lactases são provenientes de leveduras do gênero *Kluyveromyces*.

Tabela 2.2.2: Características da β -galactosidases disponíveis comercialmente.

Origem	PH ótimo	Temperatura ótima
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60°C
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50 – 55°C
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5 – 7,3	35°C
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,6	37°C
<i>Candida kefyr</i>	6,2	45 – 47°C
<i>Escherichia coli</i>	7,0	37°C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	7,1	55°C

Fonte: García-Caribay e Gómez-Ruiz, 1996

2.3 Metabolismo da lactose em *Kluyveromyces lactis*

O metabolismo da lactose em *E. coli* foi longamente estudado e o operon *lac* é largamente utilizado como exemplo de regulação gênica em bactérias. Contudo, os primeiros estudos do metabolismo da lactose em eucariotos, utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis* como exemplo, datam de 1980 e o mecanismo completo de regulação destes genes ainda não está totalmente elucidado nos dias de hoje.

2.3.1 Genes responsáveis pelo metabolismo da lactose em *Kluyveromyces lactis*

A partir de 51 cepas mutantes de *K. lactis* incapazes de crescer em lactose (Lac⁻), foram determinados, através de testes de complementação, sete genes responsáveis pelo fenótipo Lac⁺: *LAC3*, *LAC4*, *LAC5*, *LAC6*, *LAC7*, *LAC8* e *LAC9*. Os estudos também mostraram que cepas com as mutações *lac3*, *lac5*, *lac7*, *lac8* e *lac9* também são incapazes de crescer em galactose (Gal⁻). Cepas com as mutações *lac3*, *lac5* e *lac6* não crescem em glicose em presença de lactose e cepas com mutações *lac3* e *lac5* não crescem em glicose em presença de galactose. As cepas com mutações *lac4* possuem níveis de β -galactosidase quase não detectáveis (Sheetz e Dickson, 1980). Análises destas cepas mutantes realizadas pelos mesmos autores mostraram que o gene *LAC4* é o único gene que codifica a enzima β -galactosidase em *K. lactis* (Sheetz e Dickson, 1981).

Trabalhos posteriores com cepas com níveis elevados de β -galactosidase na ausência de indutores (lactose ou galactose) caracterizaram o gene *LAC10*, cujo produto, a proteína LAC10, parece funcionar como uma proteína regulatória negativa, que evita a transcrição dos genes regulados pela lactose/galactose na ausência de indutor (Dickson *et al.*, 1981).

Shreekrishna e Dickson (1985) construíram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de metabolizar lactose através da subclonagem de um fragmento de 13kb do genoma de *K. lactis* que continha o gene *LAC4*. Análises das cepas transformantes mostraram que, além da expressão do gene *LAC4*, o fenótipo Lac⁺ em *S. cerevisiae* era determinado também pela expressão do gene da lactose-permease de *K. lactis*, designado *LAC12* e localizado entre 2 e 8,6kb acima do gene *LAC4*. Riley *et al.* (1987) determinaram que o gene *LAC12* é o único gene responsável pela lactose-permease em *K. lactis*, que é induzido pela presença de lactose ou galactose, é transcrito na direção oposta do *LAC4* e que existem em torno de 2,5kb entre os sítios de início de transcrição dos dois genes. O gene *LAC12* foi então seqüenciado por Chang e Dickson (1988) que descobriram que seu RNA mensageiro possui 4,7kb e duas *open reading frames*, denominadas ORFI, com 1761 bases e ORFII, com 1266 bases, separadas por uma zona não codificante de 573 bases. Estes autores ainda determinaram que não existia *splicing* do mRNA e que somente a ORFI codificava para a lactose-permease. O peptídeo predito pela ORFI é hidrofóbico, como seria de se esperar de uma proteína de membrana.

Estudos realizados por Lacy e Dickson (1981) e por Das *et al.* (1985) mostraram que a expressão da β -galactosidase em *K. lactis* é sujeita a regulação transcricional e que um elemento regulatório positivo está envolvido na indução do gene *LAC4*. O produto do gene *LAC9* foi identificado como a proteína regulatória positiva que ativa a expressão da β -galactosidase e permite que a levedura *K. lactis* metabolize lactose.

2.3.2 Regulação do metabolismo da lactose em *Kluyveromyces lactis*

O primeiro trabalho publicado em termos de regulação da enzima β -galactosidase em *K. lactis* data de 1981. Lacy e Dickson (1981) determinaram que existe um aumento coordenado entre a concentração do RNA mensageiro de β -galactosidase e a atividade enzimática. Também determinaram que a meia-vida do RNA mensageiro da β -galactosidase era o mesmo ($4,8 \pm 0,4$ min) quando medido antes e após a indução da enzima. Deste modo concluíram que a expressão do gene de β -galactosidase em leveduras é sujeita a regulação transcricional.

Experimentos de deleção de nucleotídeos acima do sítio de início de transcrição do *LAC4* realizados por Das *et al.* (1985) mostraram que seqüências de DNA que iniciam entre as posições -435 e -391 são essenciais para a indução do gene *LAC4* pela lactose ou galactose e que seqüências acima da posição -139 são necessárias para manter níveis basais de transcrição.

Em 1986, Salmeron e Johnston (1986) mostraram que a proteína regulatória positiva *LAC9* de *K. lactis* é capaz de ativar a expressão da β -galactosidase (*LAC4*) em *K. lactis* e dos

genes da galactose (*GAL*) em cepas de *S. cerevisiae* com mutações *gal4*, o gene que codifica para a proteína GAL4, a proteína regulatória positiva que ativa os genes *GAL* em *S. cerevisiae*.

A capacidade do gene *LAC9* complementar mutações *gal4* fez com que Leonardo *et al.* (1987) e Ruzzi *et al.* (1987) pesquisassem UASs (*upstream activation sites*) na região promotora do gene *LAC9* semelhantes aos UASs dos genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10* de *S. cerevisiae*, onde se liga a proteína GAL4 (UAS_G). Ruzzi *et al.* (1987) encontram uma região entre as posições -434 e -418 acima do início da transcrição do *LAC4* em que 11 dos 17 pares de bases são iguais à sequência de ligação UAS_G nos genes *GAL* e determinaram um segundo elemento essencial para ativação do *LAC4* na região entre -391 e -326 que não possuía homologia com a sequência UAS_G. Breunig e Kuger (1987) mostraram que a proteína regulatória *LAC9* se liga na região homóloga a UAS_G em *K. lactis*. Leonardo *et al.* (1987), mediante experimentos com PCR e deleções, determinaram a existência de dois UASs, denominados UASI (nucleotídeos -420 a -436) e UASII (nucleotídeos -657 a -673). Também encontraram um terceiro potencial UAS, localizado entre os nucleotídeos -1088 a -1072, com 41 e 47% de homologia com UASI e UASII respectivamente. A Figura 2.3.1 mostra as seqüências dos sítios UAS_G, UASI, UASII e UASIII. Contudo, uma cepa com os nucleotídeos -1065 a -377 deletados ainda possui indução de β-galactosidase em presença de lactose ou galactose, sugerindo que existem um ou mais elementos com resposta à indução além de UASI e UASII. Estes mesmos autores determinaram a existência de uma seqüência 5'-TATTTAATA, centrada em torno do nucleotídeo -230, similar a seqüências denominadas TATAboxes necessárias para a iniciação da transcrição. Este resultado explica porque cepas com os nucleotídeos -196 a -376 deletados possuem baixos níveis de β-galactosidase tanto em condições de indução como de não indução. Experimentos posteriores realizados por Ficca e Hollenberg (1989) mostraram que a -230 TATAbox é suficiente para a indução máxima de β-galactosidase, contudo uma -142 TATAbox (5'-AATTATTATT) restaura parte da atividade de β-galactosidase em cepas que a -230 TATAbox é deletada. Os autores concluíram que a distribuição espacial das TATAboxes no promotor do gene *LAC4* de *K. lactis* controla a eficiência pela qual a RNA polimerase II é direcionada aos sítios de iniciação da transcrição.

Cinco sítios potenciais de ligação da *LAC9* na região intergênica de 2,6kb entre os sítios de iniciação da transcrição dos genes *LAC4* e *LAC12* são conhecidos: UASI, UASII e UASIII localizados nas posições -428, -665 e -1081 do ATG *LAC4* (Ruzzi *et al.*, 1987; Leonardo *et al.*, 1987) e UASIV e UASV localizados nas posições -337 e -617 do ATG *LAC12* (Chang e Dickson, 1988). Estudos realizados por Gödecke *et al.* (1991) mostraram que a deleção do UASI diminui em 70% a atividade de β-galactosidase, a deleção do UASII diminui em 25-30% a atividade de β-galactosidase e mutações em UASIV e UASV levam a apenas 20% e 50% de atividade de

β -galactosidase quando comparadas com a cepa selvagem. Determinaram, também que as deleções em UASI e UASII reduzem a expressão do gene *LAC12* em 40% e 60-70%, respectivamente, mostrando que UASI, UASII, UASIV e UASV atuam juntamente para ativar ambos os genes. Estes autores também mostraram que deleções em UASIII não levam a uma diminuição de atividade de β -galactosidase e que a proteína LAC9 não se liga em UASIII *in vitro*. Uma ilustração da construção dos genes *LAC4* e *LAC12* com sua região intergênica é mostrada na Figura 2.3.2.

UAS _G	CGGA ^G GACAGTCGTCCG
UASI	GCGGAAATTTGTGGTCCG
UASII	GCGGAATTCTG TTCACCG
UASIII	GCGGAAGAGG TAACGCCT

Figura 2.3.1: Seqüências dos *upstream activation sites* UAS_G dos genes *GAL* de *Saccharomyces cerevisiae* e UASI, UASII e UASIII do gene *LAC4* de *Kluyveromyces lactis*. As letras em negrito em UAS_G, UASII e UASIII representam os nucleotídeos homólogos à UASI.

Fonte: Ruzzi *et al.*, 1987; Leonardo *et al.*, 1987.



Figura 2.3.2: Regulon da β -galactosidase (*LAC4*) e da lactose-permease (*LAC12*) de *K. lactis*. *LAC4*: gene que codifica a β -galactosidase; *LAC12*(ORFI): gene que codifica a lactose-permease; ORFII: parte do gene da lactose-permease que é transcrito mas não é traduzido; UASI, UASII, UASIV e UASV: *upstream activation sites* que regulam a transcrição dos genes *LAC4* e *LAC12*; UASIII: *upstream activation site* não operacional; TATAbox: TATAbox do gene *LAC4* centrada na posição -230.

Fonte: Chang e Dickson (1988); Godecke *et al.* (1991); Ficca e Hollenberg (1989); Leonardo *et al.* (1987)

O fenômeno de repressão catabólica por glicose, que é um fenômeno essencial na regulação da lactose em *E. coli*, não é encontrado em *K. lactis* (Das *et al.*, 1985). Contudo, segundo Riley *et al.* (1987), a expressão do gene *GAL4* em uma cepa mutante *lac9* de *K. lactis*, além de restaurar a expressão dos genes do metabolismo da lactose e da galactose, confere um novo fenótipo: uma severa repressão por glicose das enzimas induzidas por lactose ou galactose. Este resultado indica que as proteínas GAL4 e LAC9 ativam a transcrição de maneira similar, contudo os genes *GAL4* e *LAC9*, ou seus produtos, respondem diferentemente à glicose em *K. lactis*. Análises da seqüência de DNA do gene *LAC9* indicaram uma proteína de 865 aminoácidos. A

comparação desta seqüência com a da proteína GAL4 de *S. cerevisiae* revelou três regiões de homologia. Uma destas homologias ocorre na região amino-terminal da proteína e possui em torno de 90 aminoácidos. Esta região é conhecida como mediadora da ligação da proteína GAL4 em sítios de DNA (Wray *et al.*, 1987).

Somente em algumas cepas de *K. lactis* os genes induzíveis pela lactose e pela galactose são reprimidos pela glicose. Nestas cepas, quando o gene *LAC9* de uma cepa sensível à glicose (*LAC9-2*) é substituído por um alelo de uma cepa não sensível (*LAC9-1*), o gene da β -galactosidase não é mais reprimível pela glicose. A repressão pela glicose é mediada pela *LAC9*, mas esta habilidade é separada da função da *LAC9* de ativar a transcrição da β -galactosidase (Breunig, 1989). A comparação entre os dois alelos *LAC9* detectou duas alterações na região codificante do gene: uma inserção de três pares de bases que aumentam de oito para nove um grupo de códons de asparagina na *LAC9-2*, e uma mudança G→T que resulta numa substituição de uma triptofano por uma leucina no *cluster* da ligação Zn^{2+} do domínio de ligação no DNA da proteína *LAC9*. Contudo, uma alteração de dois pares de bases nas posições -178 e -192 do ATG do gene *LAC9* é suficiente para converter uma cepa sensível em uma não sensível à glicose (Zachariae *et al.*, 1993). Segundo estes autores, o promotor do gene *LAC9-2* gera repressibilidade por glicose no gene *LAC4* reduzindo a expressão do gene *LAC9*. Um pequeno aumento na concentração da proteína *LAC9* é suficiente para induzir o gene *LAC4* em presença de glicose. A repressão por glicose dos genes controlados pela proteína *LAC9* é uma consequência da incapacidade da *LAC9* de induzir a transcrição quando sua concentração é muito baixa (Zachariae *et al.*, 1993). Estudos realizados por Breunig (1989) para aumentar a concentração da proteína *LAC9* mediante o aumento do número de cópias do gene *LAC9* mostraram que a superexpressão do gene *LAC9* afeta a viabilidade celular. Czyz *et al.* (1993) mostraram que a proteína *LAC9* autoregula sua própria transcrição e que este mecanismo autoregulatório é essencial para a indução do regulon lactose-galactose e, conseqüentemente, para o rápido crescimento da *K. lactis* nestes açúcares.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a ativação da transcrição mediada pela proteína regulatória GAL4 é reprimida, na ausência de galactose, pela ligação da proteína GAL80 na região carboxi-terminal de 28 aminoácidos da GAL4 (Salmeron *et al.*, 1989). Dickson *et al.* (1990) mostraram que a homologia estrutural entre as regiões carboxi-terminal das proteínas *LAC9* de *K. lactis* a GAL4 de *S. cerevisiae* corresponde a uma homologia funcional, isto é, a β -galactosidase de *K. lactis* é regulada por uma proteína regulatória negativa análoga à GAL80, que se liga na região carboxi-terminal da proteína *LAC9* impedindo a indução na ausência de um indutor. Dickson *et al.* (1981) levantou a hipótese que a proteína codificada pelo gene *LAC10* de *K. lactis* funciona de maneira análoga à GAL80 de *S. cerevisiae*.

Zenke *et al.* (1993) clonaram o gene GAL80 de *K. lactis* e mostraram que há uma forte conservação estrutural entre a GAL80 de *K. lactis* e sua homóloga em *S. cerevisiae*. As leveduras *K. lactis* mutantes *gal80* mostraram expressão constitutiva dos genes do metabolismo lactose/galactose, confirmando que a GAL80 de *K. lactis* funciona essencialmente da mesma maneira que a GAL80 de *S. cerevisiae*, bloqueando a ativação dos genes regulados pela proteína regulatória positiva LAC9 na ausência de um açúcar indutor.

2.4 Produção de β -galactosidase em biorreator.

Diversos fatores podem influenciar no crescimento do microrganismo e na produção de β -galactosidase. Fatores como o enriquecimento do soro de queijo, o pH e a temperatura já foram estudados anteriormente, inclusive para a levedura *K. marxianus* (Rech *et al.*, 1999). Contudo, fatores como a oxigenação do meio de cultura também parecem influenciar a produção de β -galactosidase (García-Garibay *et al.*, 1987; Acevedo *et al.*, 1996).

Além da oxigenação, diferentes estratégias de cultivos em regime de batelada alimentada têm sido desenvolvidas com o objetivo de contornar problemas relativos à repressão catabólica, transferência de oxigênio e transferência de calor em biorreatores. Estes estudos estão aumentando a produtividade dos processos através da separação da fase de crescimento da fase de indução da proteína de interesse e da obtenção de culturas com alta concentração celular.

2.4.1 Transferência de oxigênio em culturas microbianas

As turbinas de agitação em um biorreator de tanque agitado são responsáveis por uma série de diferentes funções. Além de realizar a quebra das bolhas de ar provenientes do difusor de ar, a eliminação de zonas mortas (as quais podem tornar-se zonas de anaerobiose) e proporcionar uma boa mistura, as turbinas influenciam a transferência de massa das bolhas de ar para ao meio de cultura e deste para os microrganismos, assim como a transferência de calor entre o meio de cultura e a camisa ou a serpentina de aquecimento. O nível de agitação deve ser suficiente para atingir níveis satisfatórios para todos estes processos (Nienow, 1990).

O oxigênio é necessário para todas as culturas aeróbias, e manter uma concentração apropriada de oxigênio dissolvido no meio de cultura é importante para a operação eficiente do reator (Fogler, 1992). Contudo, velocidade excessiva de agitação pode ser deletéria ao processo, pois pode danificar os microrganismos ou porque altas concentrações de oxigênio são tóxicas (Nienow, 1990).

Uma expressão para a velocidade de transferência de oxigênio do gás para o líquido é dada pela equação (1):

$$N = k_L a (C^* - C) \quad (1)$$

onde N é a velocidade de transferência de oxigênio por unidade de volume de fluido ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$), k_L é o coeficiente de transferência de massa da fase líquida (m.s^{-1}), a é a área da interface líquido-gás por unidade de volume do fluido ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$), C é a concentração de oxigênio no meio de cultura (mol.m^{-3}), e C^* é a concentração de oxigênio no meio de cultura em equilíbrio com a fase gasosa (mol.m^{-3}), também denominada solubilidade do oxigênio no meio de cultura.

Nas culturas aeróbias, as moléculas de oxigênio devem transpor uma série de resistências à transferência antes de serem utilizadas pela célula. O diagrama da Figura 2.4.1 apresenta oito etapas envolvidas no transporte de oxigênio do interior da bolha de gás até o interior da célula:

- i) transferência do interior da bolha para a interface gás-líquido;
- ii) movimento através da interface gás-líquido;
- iii) difusão através do filme de líquido estagnado em torno da bolha;
- iv) transporte através da massa de líquido;
- v) difusão através do filme de líquido estagnado em torno da célula;
- vi) movimento através da interface líquido-célula;
- vii) se as células estiverem em flocos ou em partículas sólidas, difusão através do sólido até a célula individual;
- viii) transporte através do citoplasma ao sítio de reação.

Se as células estão suspensas individualmente no meio de cultura, o passo (vii) desaparece.

Quando as células estão dispersas no meio de cultura e este possui mistura perfeita, a maior resistência à transferência de oxigênio é o filme líquido em torno da bolha. Conseqüentemente, o transporte de oxigênio da bolha até a célula é controlado pelo passo (iii) e a velocidade de transferência de massa pode ser calculada a partir da Equação (1) (Doran, 1995).

O meio tradicional de aumentar a velocidade de transferência de oxigênio durante os cultivos é aumentar a velocidade de agitação, o que possui algumas limitações como o consumo de energia e danos às células devido à efeitos mecânicos (Pinheiro *et al.*, 2000). Alguns trabalhos têm sido realizados em termos de aumentar a transferência de oxigênio em cultivos de leveduras como o uso de perfluorcarbono, onde o oxigênio é de 10 a 20 vezes mais solúvel que em água (Elibol, 1999) e uso de reatores pressurizados (Pinheiro *et al.*, 2000).

Trabalhos realizados por García-Garibay *et al.* (1987) e Acevedo *et al.* (1996) mostraram que existe uma relação entre a atividade específica de β -galactosidase em *Kluyveromyces marxianus* e a oxigenação no meio de cultura.

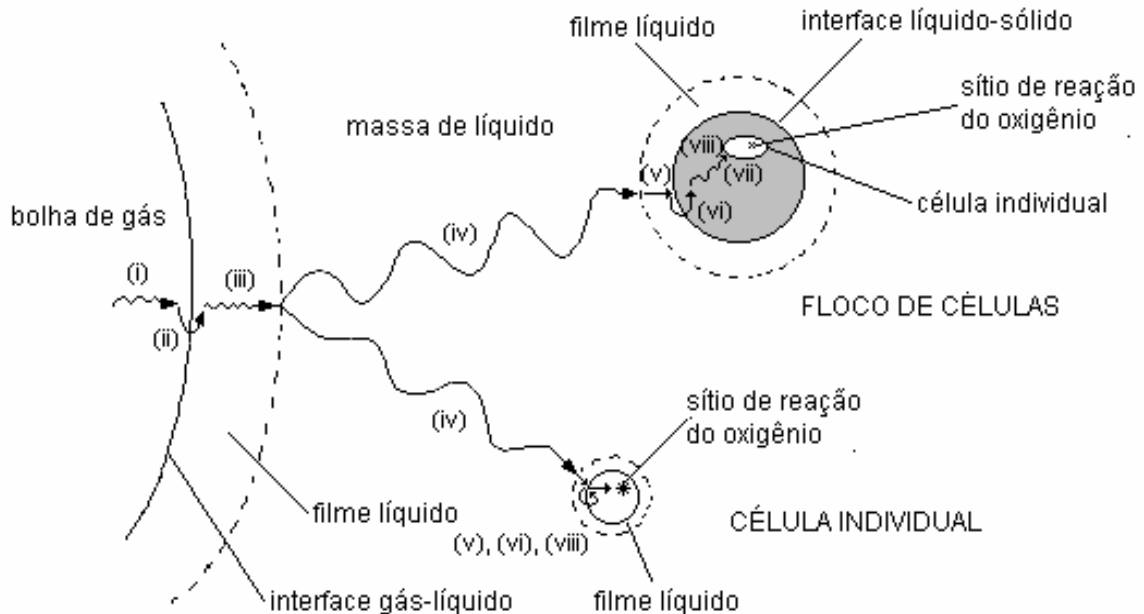


Figura 2.4.1: Etapas da transferência de oxigênio da bolha de ar para a célula
 Fonte: Doran, 1995. p. 200.

2.4.2 Cultivo em batelada alimentada para otimização da produtividade de biorreatores

O principal objetivo da pesquisa em fermentações é o desenvolvimento de métodos melhores para expressar de proteínas de interesse e baratear seu custo de produção (isto é, aumentar a produtividade). Produtividade volumétrica é definida como a quantidade de produto formado por volume e por unidade de tempo. Produtividade específica, a qual é definida como quantidade de produto formado por unidade de massa celular e unidade de tempo, relaciona a formação de produto com a biomassa. O objetivo último da pesquisa em fermentações é maximizar a produtividade volumétrica, ou seja, obter a maior quantidade de produto em um dado volume no menor tempo possível (Kleman e Strohl, 1994).

Os biorreatores podem ser de três tipos: contínuos, batelada alimentada (*fed-batch*) e batelada. Os contínuos ainda podem ser do tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) ou PFR (*Plug-Flow Reactor*) (Cooney, 1983).

Os métodos convencionais de fermentação que utilizam células livres em processos batelada possuem muitas limitações, como baixa produtividade, inibição pelo produto e variação do

produto proveniente de diferentes bateladas. Por outro lado, as fermentações contínuas, apesar de contornar alguns problemas relativos às bateladas, são limitadas pelo arrastamento contínuo das células na corrente da saída do biorreator (Tejayadi & Cheryan, 1995) e pela baixa concentração no produto final (Cooney, 1983).

Para contornar as limitações relacionadas aos cultivos em regime de batelada e contínuos, diferentes tecnologias de cultivos em batelada alimentada foram desenvolvidas a partir da última década. O modo de operação batelada alimentada oferece diversas vantagens, pois proporciona maior controle sobre variações na concentração de substrato com o tempo através da escolha apropriada da velocidade de alimentação. Desta forma a dependência entre o crescimento celular e a formação de produto pode ser mais bem estudada. Pode-se desacoplar a fase de crescimento celular da fase de expressão do gene de interesse, aumentando muitas vezes a produtividade quando comparado com um processo batelada (Patkar e Seo, 1992).

Diversas metodologias de controle da vazão de alimentação têm sido desenvolvidas. Estas metodologias variam das mais simples como a vazão de alimentação constante (Hardjito *et al.*, 1993; Belem e Lee, 1999) e a exponencial, que objetiva manter a velocidade de crescimento do microrganismo constante (Gombert e Kilikian, 1997; Shin *et al.*, 1998) até as que exigem maior instrumentação como a via controle *on-line* da concentração de glicose (Horn *et al.*, 1996) e via controle *on-line* da concentração de etanol (Alberghina *et al.*, 1991). Outras metodologias de alimentação foram desenvolvidas com sucesso por diversos autores como o desenvolvimento de um sistema de alimentação controlado pelo pH (Porro *et al.*, 1991), controlado pela concentração de oxigênio dissolvido (Barberis e Segovia, 1997), via medida *off-line* de glicose (Patkar e Seo, 1992) e baseado na medida de oxigênio dissolvido com o cálculo do MSUR – *Maximum Substrate Uptake Rate* - para *S. cerevisiae* e *K. marxianus* (Oh *et al.*, 1998; Nor *et al.*, 2001).

Os cultivos batelada alimentada têm sido utilizados para obter culturas de alta concentração celular de *E. coli* recombinante, atingindo acima de 100g/L de biomassa para a produção de proteínas recombinantes como enzimas, anticorpos, hormônio de crescimento humano e glucágon humano (Horn *et al.*, 1996; Hellmuth *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1998).

Diversos trabalhos com *S. cerevisiae* recombinante utilizam técnicas de batelada alimentada atingindo em torno de 100g/L de massa celular (Porro *et al.*, 1991; Alberghina *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 1998).

Diferentes técnicas de alimentação também foram aplicadas com sucesso para obtenção de culturas de alta densidade celular de *K. lactis* e *K. marxianus* utilizando glicose ou sacarose como fonte de carbono em meios definidos (Blondeau *et al.*, 1994; Nor *et al.*, 2001; Hensing *et al.*, 1995). Contudo, os cultivos batelada alimentada utilizando soro de queijo como meio de cultura

resultaram em concentrações de biomassa máximas em torno de 20g/L (Barba *et al.*, 2001; Belem e Lee, 1999; Barberis e Segovia, 1997).

2.5 Bibliografia

- Acevedo F, Gentina, JC, Bojorge N, Reyes I, Torres A. 1996 Development of a pilot-plant fermentation process for the production of yeast lactase. *Ann N Y Acad Sci* 12(799): 559-62. 1996.
- Adam AC, Prieto JÁ, Rubio-Teixeira M, Polaina J. Construction of a lactose-assimilating strain of baker's yeast. *Yeast* 15: 1299-1305. 1999.
- Alberghina L, Porro D, Martegani E, Ranzi BM. Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation. *Biotechnol Appl Biochem* 14: 82-92. 1991.
- Bales AS, Castillo FJ. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl Environm Microbiol* 37(6): 1201-1205. 1979.
- Barba D, Beolchini F, Del Re G, Di Giacomo G, Veglió F. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochem* 36: 531-536. 2001.
- Barberis SE, Segovia RF. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate in to *Kluyveromyces fragilis* culture. *Biotechnology Techniques* 11(11): 797-799. 1997.
- Belem MAF, Gibbs BF, Lee BH. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *J Food Sci* 62(4): 851-854. 1997.
- Belem MAF, Lee BH. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochem* 34: 501-509. 1999.
- Blondeau K, Boutur O, Boze H, Jung G, Moulin G, Galzy P. Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 β production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the PHO5 promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 324-329. 1994.
- Breunig KD, Kuger P. Functional homology between the yeast regulatory proteins GAL4 and LAC9: LAC9-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the GAL4 protein-binding site. *Mol Cell Biol* 7(12): 4400-4406. 1987.
- Breunig KD. Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. *Mol Gen Genet* 216(2-3): 422-427. 1989.
- Breunig KD. Multicopy plasmids containing the gene for the transcriptional activator LAC9 are not tolerated by *K. lactis* cells. *Curr Genet* 15(2): 143-148. 1989.

- Chang YD, Dickson RC. Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. Presence of an unusual transcript structure. *J Biol Chem* 263(32): 16696-16703. 1988.
- Chen HC Zall RR. Continuous fermentation of whey into alcohol using an attached film expanded bed reactor. *Process Biochem* 17: 20-25. 1982.
- Colomban A, Roger L, Boyaval P. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration and cell recycling. *Biotechnol Bioeng* 42: 1091-1098. 1993.
- Compagno C, Porro D, Smeraldi C, Ranzi BM. Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 822-825. 1995.
- Cooney CL. Bioreactors: Design and operation. *Science* 219: 728-733. 1983.
- Czyz M, Nagiec MM, Dickson RC. Autoregulation of *GAL4* transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose. *Nucl Acids Res* 21(18):4378-4382. 1993.
- Das S, Breunig KD, Hollenberg CP. A positive regulatory element is involved in the induction of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis*. *EMBO J* 4(3): 793-798. 1985.
- Dickson RC, Gerardot CJ, Martin AK. Genetic evidence for similar negative regulatory domains in the yeast transcription activators *GAL4* and *LAC9*. *Nucl Acids Res* 18(17): 5213-5217. 1990.
- Dickson RC, Sheetz RM, Lacy LR. Genetic regulation: yeast mutants constitutive for beta-galactosidase activity have an increased level of beta-galactosidase messenger ribonucleic acid. *Mol Cell Biol* 1(11): 1048-1056. 1981.
- Dickson RC. Expression of foreign eukaryotic gene in *Saccharomyces cerevisiae*: β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 10: 347-356. 1980.
- Domingues L, Dantas MM, Lima N, Teixeira JA. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol Bioeng* 64(6): 692-697. 1999.
- Domingues L, Lima N, Teixeira JA. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 72(5): 507-514. 2001.
- Domingues L, Onnela ML, Teixeira JA, Lima N, Penttilä M. Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(1): 97-103. 2000.
- Domingues L, Teixeira JA, Lima N. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Appl Microbiol Biotechnol* 51(5): 621-626. 1999.
- Domingues L, Teixeira JA, Penttilä M, Lima N. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting high levels of *Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(5): 645-650. 2002.

- Doran PM. Bioprocess engineering principles, San Diego, Academic Press, 1995. p. 196-278.
- Duran GAO, Angelis RC. Intolerância ou tolerância a produtos lácteos. Rev ILCT 40(241): 17-30. 1985.
- Elibol M. Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of pluronic F-68. Process Biochem 34: 557-561. 1999.
- Ficca AG, Hollenberg, CP. Functional relationship among TATA sequences, gene induction and transcription initiation in the β -galactosidase, *LAC4*, gene from *Kluyveromyces lactis*. Curr Genet 15: 261-269. 1989.
- Floetenmeyer MD, Glatz BA, Hammond EG. Continuous culture fermentation of whey permeate to produce microbial oil. J Dairy Sci 68: 633-637. 1985.
- Fogler HS. Elements of chemical reaction engineering, 2. ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1992. p. 675-698.
- Furlan SA, Carvalho-Jonas MF, Merkle R, Bértoli GB, Jonas R. Aplicação do sistema “microtiter reader” na seleção de microrganismos produtores de β -D-galactosidase. Arq Biol Tecnol 38(4): 1261-1268. 1995.
- García-Caribay M, Gómez-Ruiz L. Usos de beta-galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. Rev Invest Clin, suplemento 48: 51-61. 1996.
- García-Garibay M, Torres J, López-Munguía-Canales A, Casas LT. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol Letters 9(6):417-420. 1987.
- Gekas V, López-Leiva M. Hydrolysis of lactose: a literature review. Process Biochem 20: 2-12. 1985.
- Gödecke A, Zachariae W, Arvanitidis A, Breunig KD. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6kbp divergent promoter. Nucl Acids Res 19(19): 5351-5358. 1991.
- Gombert AK, Kilikian BV. A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. Braz J Chem Eng 14(2). 1997.
- Gomez A, Castillo FJ. Production of biomass and β -D-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. Biotechnol Bioeng 25: 1341-1357. 1983.
- González Siso MI. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technol 57: 1-11. 1996.
- Greenberg NA, Mahoney RR. Production and characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. J Food Sci 47: 1824-1835. 1982.
- Hardjito L, Greenfield PF, Lee PL. Recombinant protein production via fed-batch culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb Technol 15: 120-126. 1993.

- Hellmuth K, Korz DJ, Sanders EA, Deckwer WD. Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J Biotechnol* 32: 289-298. 1994.
- Hensing MCM, Vrouwenfelder JS, Hellinga C, Van Dijken JP, Pronk JT. Use of chemostat data for modelling extracellular-inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high-cell-density fed-batch process. *J Ferment Bioeng* 1: 54-58. 1995.
- Hewitt GM, GrootWassink JWD. Simultaneous production of inulinase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol* 6: 263-270. 1984.
- Holsinger VH. Lactose-modified milk and whey. *Food Technol*: 35-40. 1978.
- Horn U, Strittmatter W, Kreber A, Knüpfer U, Kujau M, Wenderoth R, Müller K, Matzku S, Plückthun A, Reisenberg D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 524-532. 1996.
- Itoh T, Suzuki M, Adachi S. Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric Biol Chem* 46(4): 899-904. 1982.
- Jain DK, Tyagi RD, Kluepfel D, Agbebavi TJ. Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii* in batch process. *Process Biochem* 26: 217-223. 1991.
- Kardel G, Furtado MM, Lourenço Neto JPM. Lactase na indústria de laticínios. *Rev Inst Latic "Cândido Tostes"* 294, 50(4): 15-17. 1995.
- Keesey J. *Biochemica Information*. Ed. Boeringer Mannheim Biochemicals. p. 167. 1987.
- Kleman GL, Strohl WR. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Curr Opin Biotechnol* 5: 180-186. 1994.
- Kumar V, Ramakrishnan S, Teeri TT, Knowles JK, Hartley BS. *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* beta-galactosidase grown on whey permeate. *Biotechnol* 10(1): 82-85. 1992.
- Lacy LR, Dickson RC. Transcriptional regulation of the *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase gene. *Mol Cell Biol* 1(7): 629-634. 1981.
- Leonardo JM, Bhairi SM, Dickson RC. Identification of upstream activator sequences that regulate induction of the β -galactosidase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Cell Biol* 7(12): 4369-4376. 1987.
- Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA. US Dairy Export Council. Arlington. 1997.
- Marwaha SS, Kennedy JF. Alcohol production from whey permeate by immobilized and free cells of *Kluyveromyces marxianus* NCYC179. *Process Biochem* 19(2): 79-80. 1984.

- Mehaia M, Cheryan M. Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates. *Process Biochem* 22(6): 185-188. 1987.
- Moresi M, Orban E, Quaglia GB, Casini I. Effect of some physico-chemical treatments on the kinetics of autolysed yeast extract production from whey. *J Sci Food Agric* 67: 347-357. 1995.
- Nienow AW. Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chem Eng Prog* 86(2): 61-71. 1990.
- Nor ZM, Tamer MI, Scharer JM, Moo-Young, M, Jervis EJ. Automated fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis* based on a novel method for on-line estimation of cell specific growth rate. *Biochem Eng J* 9: 221-231. 2001.
- Oh G, Moo-Young M, Chisti Y. Automated fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* based on on-line monitored maximum substrate uptake rate. *Biochem Eng J* 1: 211-217. 1998.
- Patkar A, Seo JH. Fermentation kinetics of recombinant yeast in batch and fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng* 40: 103-109. 1992.
- Pinheiro R, Belo I, Mota M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. *Enzyme Microb Technol* 26: 756-762. 2000.
- Porro D, Martegani E, Tura A, Ranzi BM. Development of a pH-controlled fed-batch system for budding yeast. *Res Microbiol* 142: 535-539. 1991.
- Ramakrishnan S, Hartley BS. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl Environ Microbiol* 59: 4230-4235. 1993.
- Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAZ. Utilization of protein hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23: 91-96. 1999.
- Riley MI, Hopper JE, Johnston AS, Dickson RC. GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae* activates the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* and creates a new phenotype: glucose repression of the regulon. *Mol Cell Biol* 7(2): 780-786. 1987.
- Riley MI, Sreekrishna K, Bhairi S, Dickson RC. Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol Gen Genet*, 208(1-2): 145-151. 1987.
- Rubio-Teixeira M, Arévalo-Rodríguez M, Lequerica JL, Polaina J. Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. *J Biotechnol* 84: 97-106. 2000.
- Rubio-Teixeira M, Castrillo JI, Adam AC, Ugalde UO, Polania J. Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 827-837. 1998.

- Ruzzi M, Breunig KD, Ficca AG, Hollenberg CP. Positive Regulation of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the *GAL* upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7(3): 991-997. 1987.
- Salmeron JM Jr, Johnston SA. Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene *LAC9* reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Nucl Acids Res* 14(19): 7767-7781. 1986.
- Salmeron JM Jr, Langdon SD, Johnston AS. Interaction between transcriptional activator protein *LAC9* and negative regulatory protein *GAL80*. *Mol Cell Biol* 9(7): 2950-2956. 1989.
- Sheetz RM, Dickson RC. *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 98: 729-745. 1981.
- Sheetz RM, Dickson RC. Mutation affecting synthesis of beta-galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 95(4): 877-890. 1980.
- Shin CS, Hong MS, Kim DY, Shin HC, Lee J. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 364-370. 1998.
- Sreekrishna K, Dickson RC. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(23): 7909-7913. 1985.
- Tejayadi S, Cheryan M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 242-248. 1995.
- Tin CSF, Mawson AJ. Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Process Biochem* 28: 217-221. 1993.
- Tretiak KA, Zakal'ski AE, Gudz' SP. The cloning and expression of the gene for β -galactosidase from *Candida pseudotropicalis* yeast in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Mikrobiologichnyi Zhurnal* 60(4): 57-66. 1998.
- Wierzbicki LE, Kosikowski FV. Lactase potential of various microorganisms grown in whey. *J Dairy Sci* 56(1): 26-32. 1973.
- Wray LV Jr, Witte MM, Dickson RC, Riley MI. Characterization of a positive regulatory gene, *LAC9*, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*: structural and functional relationships to *GAL4* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7(3): 1111-1121. 1987.
- Zachariae W, Kuger P, Breunig KD. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator *LA1C9* (*K1GAL4*). *Nucl Acids Res* 21(1): 69-77. 1993.
- Zadow JG. Lactose: properties and uses. *J Dairy Sci* 67: 2654-2679. 1984.

Zenke FT, Zachariae W, Lunkes A, Breunig KD. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Mol Cell Biol* 13(12): 7566-7576. 1993.

Páginas da internet:

USDA–NASS, 2002: http://www.usda.gov/nass/pubs/agr02/02_ch8.pdf em 26/11/02

<http://www.science-projects.com/Lactase.htm> em 5/11/02.

3 Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos enviados ou a serem enviados para publicação em revistas científicas. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos a seguir:

3.1 Influence of aeration and agitation on the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 – aceito com modificações no *Brazilian Archives of Biology and Technology* em 25 junho de 2002.

3.2 Feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese-whey - submetido ao *Process Biochemistry* em 18 de novembro de 2002.

3.3 Fed-batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using cheese-whey as culture medium – a ser submetido.

O primeiro trabalho, com a levedura selvagem *K. marxianus*, teve por objetivo determinar as condições de aeração e agitação no biorreator que maximizassem a produtividade da β -galactosidase. O estudo mostrou que, a proporção em que aumentava a transferência de oxigênio no cultivo, aumentava-se também o rendimento celular (Y_{XS}), contudo diminuía-se a atividade específica da enzima (U/g cél). Desta forma, uma condição intermediária de aeração/agitação resultou na maior produtividade de β -galactosidase em cultivo em regime de batelada de *K. marxianus*.

Uma vez encontrada a melhor condição para produção de β -galactosidase no cultivo em regime de batelada, o trabalho seguinte utilizou este resultado como ponto de partida para o estudo de cultivos em regime de batelada alimentada utilizando o soro de queijo como meio de cultura. Foram testados dois perfis de alimentação, três tempos de alimentação e três concentrações do meio de alimentação. A alimentação linear crescente, durante 25 horas, utilizando soro de queijo três vezes concentrado como meio de alimentação, mostrou-se a melhor condição, apresentando produtividade da enzima 2,5 vezes maior que o cultivo em regime de batelada.

Os trabalhos acima descritos tiveram por objetivo maximizar o processo em biorreator de produção de β -galactosidase por *K. marxianus*. Paralelamente realizou-se um trabalho de biologia molecular para construir uma levedura com maior produtividade específica da enzima. Para isto construiu-se de uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* produtora de β -galactosidase através da integração dos genes *LAC4* e *LAC12* (β -galactosidase e lactose-permease de *Kluyveromyces lactis*)

no genoma da levedura. Esta cepa foi testada em biorreator em condições de batelada alimentada escolhidas com base nos resultados do trabalho anterior. Embora a atividade específica máxima de β -galactosidase desta cepa recombinante seja 2,8 vezes maior que a atividade específica máxima alcançada com a levedura *K. marxianus*, a produtividade geral do processo desta última é maior devido à maior concentração celular obtida e ao menor tempo de cultivo.

A caracterização da enzima produzida já foi realizada e encontra-se no anexo AII.1.

3.1 Influence of aeration and agitation on the production of β -galactosidase by

Kluyveromyces marxianus CBS6556

3.1.1 Abstract

This work aimed to study the influence of aeration and agitation on the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown in protein hydrolyzed cheese whey. The experiments were carried out on a 3L bench bioreactor under three different conditions of agitation and aeration: (I) 500rpm and 3L.min⁻¹; (II) 600rpm and 6L.min⁻¹; (III) 700rpm and 9L.min⁻¹. This Crabtree negative yeast showed ethanol production, which is higher at low aeration condition. β -galactosidase production was shown to be dependent on aeration rates, with best productivity being achieved at intermediary conditions of agitation and aeration of medium (condition II). In the bench bioreactors used in this work, the combination of air flow and agitation speed, but not the type of turbine, showed to be an important factor influencing the volumetric oxygen transfer (K_La).

Key-words: Cheese whey, β -galactosidase, K_La , *Kluyveromyces marxianus*

3.1.2 Introduction

One of the most important aspects of modern biotechnology is the scaling up of microbial cultures. In this respect, optimal physiological conditions must be studied in bench scale bioreactors previously to transferring them to pilot or industrial scale. Aeration is of fundamental importance to these considerations, since oxygen is poorly scattered in submerged cultures, especially in those where microorganisms present high oxidative physiology. The production of enzymes, such as β -galactosidase by yeast are a typical case where oxygen limitation must be avoided.

The cheesemaking industry generates large quantities of cheese whey (about 83% by volume of total milk utilized). This product contains about 50% of the total solids of original milk utilized (Scott, 1993). Due to its high level of organic substances, mostly lactose (70% of the total solids), cheese whey imposes a high level of biochemical oxygen demand (BOD) to effluent treatment plants, about 30000mg.L⁻¹ to 60000mg.L⁻¹ (Ponsano e Castro-Gómez, 1995). The production of cheese by the Brazilian dairy industry was 310 thousand tons in 1993, with an

estimated increase of 13% per year. From the 440 thousand tons of cheese produced in 1996, approximately 3 million tons whey resulted (Trevisan *et al.*, 1997).

This work is a part of a major project where we investigate the use of protein-hydrolyzed sweet cheese whey as culture medium to produce β -galactosidase (lactase). This enzyme is used in reduced lactose milk production, an outstanding industrial product used by a large lactose intolerant population (Kardel *et al.*, 1995; Pivarnik *et al.*, 1995). In this study, we have examined various aspects of the influence of agitation and aeration of the culture medium over the production of the enzyme during growth in a bench bioreactor.

3.1.3 Materials and methods

All chemicals used were of analytical grade, bought either from Sigma, St. Louis, USA or Merck, Darmstadt, Germany, except were indicated.

3.1.3.1 Yeast strains

The yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS6556, obtained from Centraalbureau voor Schimmelcultures and provided by The Center for Biotechnology Development, Joinville, Brazil was used. The strain was maintained on agar slants at 4°C, as previously described (Furlan *et al.*, 1995).

3.1.3.2 Medium composition

Basic medium composition used was made up with 70g.L⁻¹ of reconstituted sweet cheese whey powder, (composition: 71% lactose, 11.1% soluble protein, 0.7% fat, 3% humidity, 7.2% ashes; Elegê Laticínios S.A., Brazil), 5g.L⁻¹ of yeast extract. It was also used 1mL.L⁻¹ of antifoam polyoxy-ethylene-polyoxypropylene co-polymers (Mazu DF 800 S, Mazer Chemicals Ltd. / England). To avoid protein precipitation during the sterilization process (121°C, 15 min), cheese whey proteins were hydrolyzed with a commercial protease (Alcalase 0.6L, 1mL.L⁻¹, Novo Nordisk A/S / Denmark), pH 8.5 and temperature of 55°C for 3 hours.

3.1.3.3 Pre-culture

Isolated yeast colonies were aseptically transferred to 300mL shake flask containing 50mL of culture medium, and incubated in an orbital shaker (mod. NT711 / Nova Técnica, Brazil) at 200rpm for 15 to 20 hours at 37°C.

3.1.3.4 Bioreactor cultivation

Bioreactor experiments were performed in a 3L stirred tank bioreactor (Biostat B / B.Braun Biotech International / Germany), filled with 1.5L of culture medium at 37°C. All experiments were done in duplicate. Oxygen concentration was measured during experiments using a polarographic oxygen probe (InPro 6000 / Toledo / Germany) and pH was kept at 5.5. The specific growth rate (μ), the doubling time (t_d), the yields ($Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{EtOH/X}$), the productivity (Q_P) and the oxygen uptake rate by cells (Q_O) were calculated as described by Sinclair e Cantero (1990).

3.1.3.5 Enzyme activity assay

The assays were carried out in the cell-free extract (Rech *et al.*, 1999) at 30°C, utilizing ONPG (*o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside) as substrate, and performed as described by Lederberg (1950). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ mol of ONP (*o*-nitrophenol) in one minute at the conditions of the assay.

3.1.3.6 Lactose concentration

The lactose concentration, measured as total sugars, was determined by a phenol-sulfuric acid method described previously (Rech *et al.*, 1999).

3.1.3.7 Ethanol assay

The ethanol concentration was determined by gas chromatography using a HP Gas Chromatograph (Hewlett-Packward 5890A / Canada) with a 50m length and 0.25 mm internal diameter capillary column Simplicity-5 (Supelco Co. / USA). The chromatograph was programmed as follows: injector at 250°C; detector at 250°C; column at 50°C for two minutes, followed by heating to 75°C at a rate of 5°C.min⁻¹. To quantify the amount of ethanol, a calibration curve was constructed by adding a solution of cheese whey (7% w.v⁻¹), varying ethanol concentration, and a fixed amount of *n*-propanol as internal standard.

3.1.3.8 Cell concentration

The cell concentration was estimated by measuring absorbance in a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi / Japan) at $\lambda = 620$ nm, and relating the readings to biomass dry weight with a calibration curve according to the following equation: Biomass = $0.0282e^{1.906(OD)}$. The cells were harvested at 16000 \times g (Eppendorff Bench Centrifuge 5410 / Brinkmann Instruments Inc. / Germany) for 3 min and washed twice with cold distilled water.

3.1.3.9 Oxygen transfer coefficient (K_{La}) determination

The K_{La} determination was performed in water, to test the impeller configuration (conditions: 500rpm, aeration of 6L.min⁻¹, 37°C), and in culture medium at six hours of growth (under the conditions of each experiment) by the dynamic gassing out method described previously by Sinclair e Kristiansen (1987).

3.1.4 Results and discussion

It is well known that K_{La} of cultures is affected by the size and shape of bioreactors, number and types of turbine impellers and baffles, agitation speed, aeration rates, pressure, and content of oxygen in the flowing air. In this work, experiments were performed in order to investigate the effects of the combination of air flow and agitation speed on K_{La} and the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. Batch cultures were run under three different conditions of agitation and aeration: 500rpm and 3L.min⁻¹ (condition I); 600rpm and 6L.min⁻¹ (condition II); 700rpm and 9L.min⁻¹ (condition III). The growth curves are shown in Figures 1, 2 and 3, respectively. Considering biomass formation and substrate consumption, results indicate that there is no appreciable difference among these different conditions. Cultures reach the end of the exponential growth phase about ten hours of cultivation, with a concentration of about 13g cells.L⁻¹(dw). However, when the ethanol production curves are compared, results show that ethanol production is higher at low aeration rates, and, in all conditions, ethanol is produced during exponential growth and, after sugar depletion, ethanol is consumed as carbon source. These results are surprisingly somehow, since *K. marxianus* is considered to be a Crabtree negative yeast and should not produce ethanol under fully aerated culture conditions (Rouwenhorst, 1990). Acevedo *et al.* (1996) also reported production of ethanol by a similar strain of *K. marxianus*. Although their results showed a much higher concentration of ethanol than that obtained in our experiments, their overall enzyme production was about 1000 times lower than values obtained in this research.

The β -galactosidase production curves at the highest oxygenation condition show a different profile when compared with the other two conditions: at the end of exponential growth phase, β -galactosidase activity was much smaller, but at stationary phase and after sugar depletion, β -galactosidase activity continues increasing until the end of the experiment. Growth parameters shown in Table 1 confirm the results discussed above and indicate that the intermediary condition of agitation and aeration (condition II) is the best concerning the production of β -galactosidase by the yeast *K. marxianus*. This condition presents higher $Y_{p/x}$ and higher protein productivity (Q_p). These results are in agreement with those noted by others authors (Acevedo *et al.*, 1996):

β -galactosidase specific activity is higher at low aeration, however, because of differences in cell yields, the volumetric activity is greater at intermediary conditions.

Condition II also presents a higher K_La value calculated at six hours of growth than for condition III, with higher agitation and aeration rates. This apparently contradicting result may be explained by the fact that under intermediate oxidative conditions, cells consumed carbon sources faster and liberated ethanol at higher levels into the medium, significantly changing the rheological properties of medium composition at this time.

Table 3.1.1: Effect of aeration and agitation rates on the growth parameters of *K. marxianus*.

	500rpm 3L.min ⁻¹	600rpm 6L.min ⁻¹	700rpm 9L.min ⁻¹
$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)*	0.36	0.40	0.45
$Y_{P/X}$ (U.g ⁻¹)	0.133	0.135	0.081
$Y_{EtOH/X}$ (g.g ⁻¹)	1.4	0.85	0.49
μ_{max} (h ⁻¹)	0.59	0.57	0.57
Q_P (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)	210	246	110
Q_O (mmolO ₂ .g ⁻¹ .s ⁻¹)	4.5×10^{-4}	5.1×10^{-4}	9.6×10^{-4}
K_La (h ⁻¹)	64.4	130	111

* $Y_{X/S}$ is calculated over the total substrate (lactose+ethanol) consumed during the growth.

According to Nienow (1990), disk turbines (six-bladed flat disc impellers) are often used in stirred tank bioreactors for the reason that they are considered to be good for gas dispersion, although occasionally angled blade agitators are used as the upper agitator because of its high pumping capacity.

To study the influence of different impeller configurations on K_La , three different lay-outs were tested combining three different types of impellers. The experiments were: (1) two six-bladed flat disc impellers; (2) one six-bladed flat disc impeller with one six-bladed inclined disc impeller and (3) one six-bladed flat disc impeller with one scooping marine impeller. Results are described in Table 2 and show that, under the conditions of this work, the use of two six-bladed flat disc impellers and the use of six-bladed flat disc impeller combined with a scooping marine impeller (high-flow, low-power-number impeller) were equally efficient to transfer oxygen to the culture medium.

Table 3.1.2: Effect of different types of impellers over K_{La} in a bioreactor as measured in this work.

Impeller configuration	K_{La}
two six-bladed flat disc impellers	49.8 h ⁻¹
six-bladed flat disc impeller with a six-bladed inclined disc impeller	45.7 h ⁻¹
six-bladed flat disc impeller with a scooping marine impeller	49.1 h ⁻¹

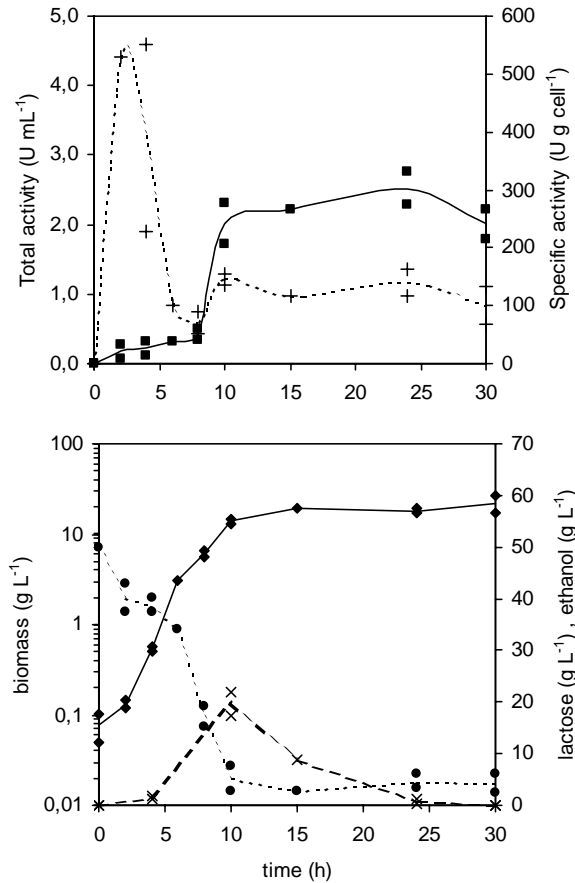


Figure 3.1.1: Growth of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 in bioreactor at agitation of 500rpm and aeration of 3L.min⁻¹ (condition I).

(◆) Biomass; (●) lactose; (×) ethanol; (■) β -galactosidase total activity; (+) β -galactosidase specific activity.

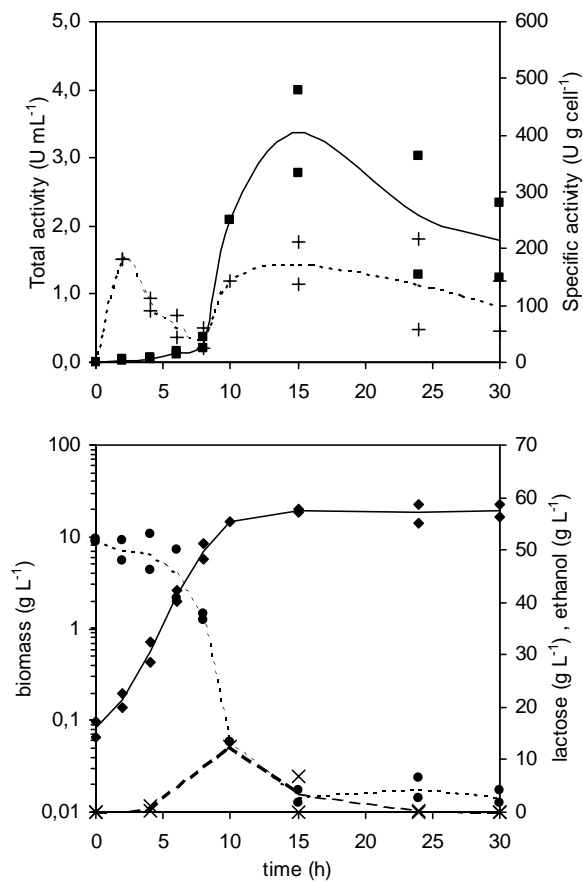


Figure 3.1.2: Growth of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 in bioreactor at agitation of 600rpm and aeration of $6\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (condition II).

(◆) Biomass; (●) lactose; (×) ethanol; (■) β -galactosidase total activity; (+) β -galactosidase specific activity.

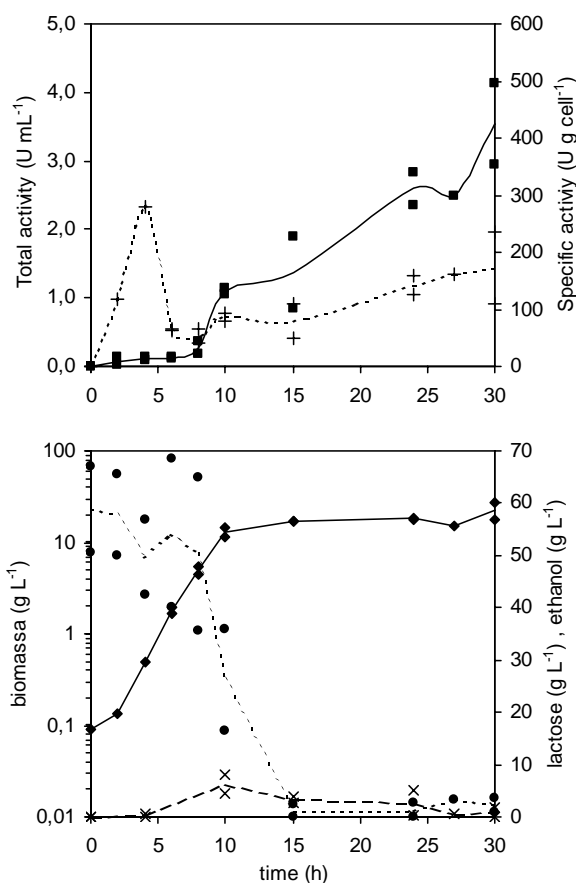


Figure 3.1.3: Growth of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 in bioreactor at agitation of 700rpm and aeration of $9L \cdot min^{-1}$ (condition III).

(◆) Biomass; (●) lactose; (×) ethanol; (■) β -galactosidase total activity; (+) β -galactosidase specific activity.

3.1.5 Conclusions

Conditions of oxygen transfer during submerged batch cultures had influence on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. Higher agitation and aeration increased cell yield but not β -galactosidase specific production by cells. Therefore, intermediary oxygenation condition appears to be the best for the overall productivity of the enzyme and, in our work, we have found that oxygen uptake rate by cells (Q_O) around $5.1 \times 10^{-4} mmol O_2 \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$ might be the best physiological state for β -galactosidase production. Our results also show that, since overall oxygen transfer rate is not a limiting factor in submerged cultures of *K. marxianus* growing in whey, the change of impellers aiming to improve oxygen transfer is unnecessary.

Further studies are under development in our group in order to assess the effects of carbon sources feeding strategies on the production of the enzyme.

3.1.6 Resumo

Este trabalho teve por objetivo determinar a influência das velocidades de aeração e de agitação do biorreator na produção de β -galactosidase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* utilizando soro de queijo como meio de cultura. As condições de agitação e aeração testadas foram: 500rpm e 3L.min⁻¹ (condição I); 600rpm e 6L.min⁻¹ (condição II) e 700rpm e 9L.min⁻¹ (condição III). Os resultados mostram que esta levedura, considerada *Crabtree* negativa, produz etanol, cuja concentração é maior nas condições de menor aeração. A produção de β -galactosidase mostrou-se dependente das velocidades de aeração, sendo menor na condição de maior aeração, e sendo que a maior produtividade da enzima foi atingida na condição intermediária de oxigenação (condição II). Nos biorreatores de bancada, o tipo de turbina utilizada não mostrou ser um fator de influência na velocidade volumétrica de transferência de oxigênio (K_{La}).

3.1.7 References

- Acevedo, F.; Gentina, J. C.; Bojorge, N.; Reyes, I.; Torres, A. (1996), Development of a pilot-plant fermentation process for the production of yeast lactase. *Ann N Y Acad Sci*, **12(799)**, 559-62.
- Furlan, S. A.; Carvalho-Jonas, M. F.; Merkle, R.; Bértoli, G. B.; Jonas, R. (1995), Aplicação do sistema *Microtiter Reader* na seleção de microrganismos produtores de β -galactosidase. *Arq Biol Tecnol* **38**, 1261-1268.
- Kardel, G.; Furtado, M. M.; Neto, J. P. M. L. (1995), Lactase na Indústria de Laticínios (Parte 1). *Rev Inst Latic "Cândido Tostes"* **50(294)**, 15-17.
- Lederberg, J. (1950), The β -galactosidase of *Escherichia coli*, strain K12. *J Bacteriol* **60**, 381-392.
- Nienow, A. W. (1990), Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chem Eng Prog* **86(2)**, 61-71.
- Pivarnik, L. F.; Senegal, A. G.; Rand, A. G. (1995), Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. *Adv Food Nutr Res* **38**, 1-102.
- Ponsano, E. H. G.; Castro-Gómez, R. J. H. (1995), Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa tecnológica para a redução de sua capacidade poluente. *Ciênc Tecnol Aliment* **15**, 170-173.
- Rech, R.; Cassini, C. F.; Secchi, A.; Ayub, M. A. Z. (1999), Utilization of protein hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 91-96.

- Rouwenhorst, R. J. (1990), Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces* yeast. PhD Thesis. Delft, Netherlands: Technische Universiteit Delft, pp. 8-11.
- Scott R (1993) *Fabricación de queso*. Acríbia, Zaragoza, pp. 313-322.
- Sinclair, C. G.; Cantero, D. (1990), Fermentation modelling. In- *Fermentation: a practical approach*. McNeil, B.; Harvey, L. M. Oxford University Press, Oxford, pp. 65-112.
- Sinclair, C. G.; Kristiansen, B. (1987), *Fermentation kinetics and modelling*. Open University Press, Buckingham.
- Trevisan, H. C.; Bergamo, E. P.; Contiero, J.; Hojo, O.; Monti, R. (1997), β -galactosidase immobilization on controlled pore silica. *Braz J Chem Eng* **14(4)**, 115-119.

3.2 Feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese-whey

3.2.1 Abstract

The aim of this work was to study several simple feeding strategies to obtain high-cell-density cultures of *Kluyveromyces marxianus* and to maximize β -galactosidase productivity of the process, using cheese-whey as batch and feeding medium. Two feeding profiles (linear and exponential), three feeding times (20, 25 and 35 hours) and three different feeding media concentrations (cheese-whey concentrated two, three or four times) were tested. Results showed that fed-batch cultures of *K. marxianus* in cheese-whey did not achieve high biomass concentrations. However continuous lactose addition in the culture produced high specific enzyme activity and, consequently, improved the volumetric activity of β -galactosidase when compared to batch cultivations. The best fed-batch strategy, which was the feeding of three times concentrated cheese-whey during 25 hours, resulted in a β -galactosidase productivity of 290.9U/(L.h), which represents over 50% greater productivity of β -galactosidase compared to batch cultivation.

Key-words: *Kluyveromyces marxianus*, cheese-whey, fed-batch, high-cell-density, β -galactosidase

3.2.2 Introduction

According to recent environmental regulations, new technologies have to be developed for the treatment of agro-industrial wastewaters. In fact, there is a large number of such polluting streams, usually coming from many small and medium size manufacturing plants [1]. The cheesemaking industry generates large amounts of cheese-whey (about 83% of the volume of milk utilized) [2]. Whey contains 5% (w/v) lactose [3] and its BOD₅ ranges from 30,000 to 40,000ppm [1].

Fed-batch culture has been successfully used to improve the productivity of both homologous and heterologous proteins in high-cell-density cultures. It is an effective technique for overcoming cellular regulatory mechanisms such as Crabtree effect, catabolite repression and product inhibition [4]. Fed-batch culture has been largely used for *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis* to produce different types of heterologous proteins in high-cell-density cultivations [5, 6, 7, 8]. Nevertheless, most of these cultivations are based on

sophisticated control strategies that demand expensive equipment, which may be a constrain to process development.

The aim of this work was to study different simple feeding strategies to obtain high-cell-density cultures of *Kluyveromyces marxianus* and maximize β -galactosidase productivity of the process, using cheese-whey as batch and feeding medium. Two feeding profiles (linear and exponential), three feeding times (20, 25 and 35 hours) and three different feeding medium concentrations (cheese-whey concentrated two, three or four times) were tested. Many studies have been conducted in fed-batch cultivation, but only a few used complex, non-defined medium, such as agro-industrial wastewater streams. This work shows that cheese-whey can be successfully used in fed-batch cultures to increase process productivities.

3.2.3 Materials and methods

All chemicals used were of analytical grade, bought either from Sigma (St. Louis, USA) or Merck (Darmstadt, Germany), except where indicated.

3.2.3.1 Yeast strain:

The yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS6556, originally obtained from Centraalbureau voor Schimmelcultures (Amsterdam, The Netherlands), was provided by the Center for Biotechnology Development (Joinville, Brazil). The strain was maintained on agar slants at 4°C, as previously described [9].

3.2.3.2 Medium composition

Basic medium composition used was made up with 70g/L of reconstituted sweet cheese-whey powder (Elegê Laticínios S.A., Teotônia, Brazil), 5g/L of yeast extract, and 1mL/L of antifoam polyoxy-ethylenepolyoxypropylene copolymers (Mazu DF 800 S, Mazer Chemicals Ltd., England). To avoid protein precipitation during the sterilization process (121°C, 15 min), cheese-whey proteins were hydrolyzed with a commercial protease (Alcalase 2.4L, Novo Nordisk, Curitiba, Brazil). The feeding medium was composed by the basic medium concentrated twice, thrice or four times, and sterilized for 30 min at 100°C.

3.2.3.3 Pre-culture

Isolated yeast colonies were aseptically transferred to a 300mL shake flask containing 50mL of basic culture medium, and incubated in an orbital shaker (mod. NT711 / Nova Técnica, Brazil) at 200rpm for 15 to 20 hours at 37°C.

3.2.3.4 Bioreactor cultivation

Bioreactor experiments were performed in a 3L stirred tank bioreactor (Biostat B / B.Braun Biotech International / Germany), filled with 1L of culture medium at the following conditions: 37°C, 600rpm, and aeration of 6L air/min. Bioreactor cultivations were composed primarily by a 12-hours batch stage followed by a fed-batch stage of 20, 25 or 35 hours. The final working volume of the bioreactor was 2L. All experiments were done in triplicate. The value of pH was kept constant at 5.5 and oxygen concentration was measured during experiments using a polarographic electrode. Biomass yield (Y_{XS}), ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$) and enzyme productivity (Q_P) were calculated as described by Sinclair & Cantero [10].

3.2.3.5 Feeding profile calculation

Two different feeding profiles were used. Exponential feeding profile has the form: $F = b \exp(\mu t)$, and linear feeding profile has the form: $F = a t + b$, where F is the feeding rate, t is the time and a , b and μ are constants.

3.2.3.6 Enzyme activity assay

The enzyme activity assay was carried out in cell free extracts [11], using ONPG (*o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside) as substrate, and performed as described by Lederberg [12]. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ mol of ONP (*o*-nitrophenol) in one minute at the assay conditions.

3.2.3.7 Lactose concentration

The lactose concentration, measured as total sugars, was determined by a phenol sulfuric acid method previously described [11].

3.2.3.8 Ethanol assay

The ethanol concentration was determined by gas chromatography using a gas chromatograph (CG-14B Shimadzu, Tokyo, Japan) with a 12m length and 0.53mm internal diameter capillary column CBP1-W12-300. The chromatograph was programmed as follows: injector at 150°C; detector at 150°C; column at 40°C. To quantify the amount of ethanol, a calibration curve was constructed by adding a solution of cheese-whey (70g/L), varying ethanol concentration, and using a fixed amount of *n*-propanol as internal standard.

3.2.4 Results and discussion

3.2.4.1 Effect of feeding profile and time of feeding

Primarily, we have studied the influence of the feeding profile and time on biomass and β -galactosidase production. Exponential ascending feeding for 20 hours (E20) and 25 hours (E25) and linear ascending feeding for 20 hours (L20), 25 hours (L25) and 35 hours (L35) were tested. Feeding was performed with the basic medium composition concentrated four times (cheese-whey 280g/L; yeast extract 20g/L). A simple batch cultivation was also performed (Figure 1). Results of fed-batch experiments are presented in Figures 2, 3, 4, 5 and 6. Growth curves show that biomass concentration increases during feeding phase, reaching a maximum of 34g/L (L35). Although high when compared to batch cultivations, this value is much lower than the theoretical possible values of 75g/L, when considering the conditions of the run and a value of $Y_{X/S} = 0.4$. It possibly occurred because of an oxygen limitation due the high oxidative metabolism of this yeast: the dissolved oxygen concentration reached a null value at about six hours of growing and remained zero until a few hours after the end of feeding phase (data not shown), even under the strong oxygen mass transfer adopted in our work (6 L air/min; 600 rpm). Lactose curves show that the yeast consumes all lactose that enters in culture medium. Belem & Lee [3] obtained similar results using concentrated cheese-whey in fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus* ATCC28244. In their experiments, biomass did not increase, showing even a decrease during feeding phase. Dissolved oxygen concentration also remained near zero and lactose was consumed. In our experiments, although biomass did not reach high concentration during feeding phase, continuous lactose addition to culture medium resulted in a enhancement of the specific activity and, consequently, of the volumetric activity of β -galactosidase during fed-batch operation of the bioreactor when compared to a batch cultivation. These results contrast with those obtained by Nor *et al.* [4]. In their experiments, they tested different feeding control strategies in fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus* using a synthetic medium with lactose as carbon source. They achieved high biomass concentration (69.1g/L) but the β -galactosidase specific activity remained constant during the culture run. Hensing *et al.* [13] also achieved high biomass concentration (over 120g/L) utilizing *K. marxianus* CBS6556 using a synthetic medium with glucose as carbon source. The fact that these authors both used synthetic media could explain their ability to improve biomass yield. Nevertheless, their specific enzyme activities were similar to those obtained in this work.

Results also showed that feeding profiles during 20 hours (Figures 2 and 3) and 25 hours (Figures 4 and 5) add lactose to culture medium faster than the capacity of metabolization by cells of this substrate. This fact results on lactose accumulation in culture medium during the first 15 hours of feeding and, consequently, the production of ethanol as secondary metabolite, interfering

on biomass production. According to Porro *et al.* [6], ethanol production is the major cause of lowering cellular yield in yeast cultivation. Nevertheless, in the linear ascending feeding profile during 35 hours (Figure 6) there is no lactose accumulation and a smaller ethanol production during feeding phase. For all fed-batch runs, there was a poor conversion of substrate in biomass ($Y_{X/S} = 0.235 \pm 0.02$) during feeding phase, as shown in Table 1, and there was no observable variation for the yields values ($Y_{X/S}$, $Y_{EtOH/S}$) among the different feeding profiles. Table 1 also shows productivity for batch cultivation and for different feeding profiles and times of fed-batch cultivation. Productivity values were calculated considering an interval of 12 hours between cultures and show that fed-batch cultures productivity are almost two times greater when compared with batch culture productivity. Among fed-batch results, cultures L25 and L35 presented the greatest volumetric productivity. After 15 hours of run, there is a shift of metabolism: from this point on, independent of the feeding rate of lactose, the yeast consumes all lactose that is entering in culture medium.

3.2.4.2 Effect of feeding medium concentration

The experiments studying feeding time and profile using feeding medium based on four times concentrated cheese-whey did not result in a high-cell-density culture but stimulated β -galactosidase production. The following experiments aimed to determine the influence of the feeding medium concentration over β -galactosidase production in a fed-batch culture. The feeding strategy L25 was chosen for the following experiments since it presented one of the best productivities. It was tested feeding medium composed by basic medium concentrated two times (cheese-whey 140g/L, yeast extract 10g/L, Figure 7) and three times (cheese-whey 210g/L, yeast extract 15g/L, Figure 8) and results were compared with the feeding medium concentrated four times (Figure 5) and with the batch culture (Figure 1). Results show that biomass and ethanol concentration increase at the end of feeding phase with feeding concentration. Nevertheless, β -galactosidase curves compared at Figure 9 and productivity values at Table 2, show that feeding medium three times concentrated is the most efficient to stimulate β -galactosidase production by the yeast. Values of $Y_{EtOH/S}$ at Table 2 show that ethanol production decreases with feeding medium concentration.

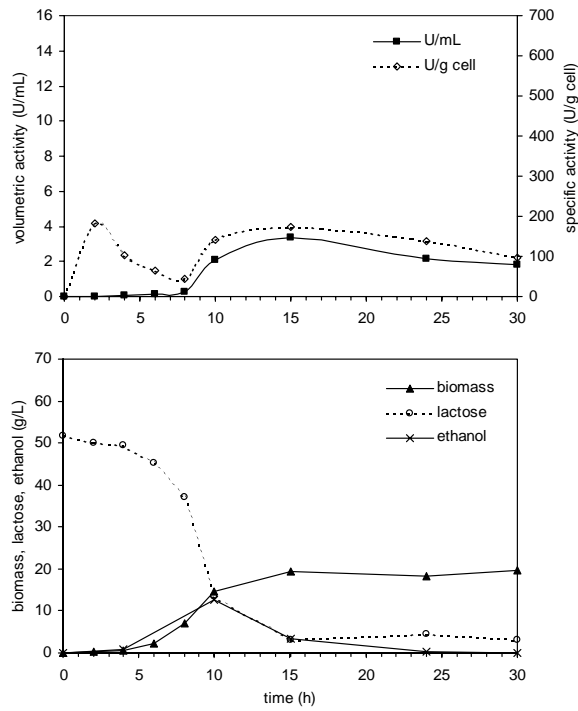


Figure 3.2.1: Batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey.

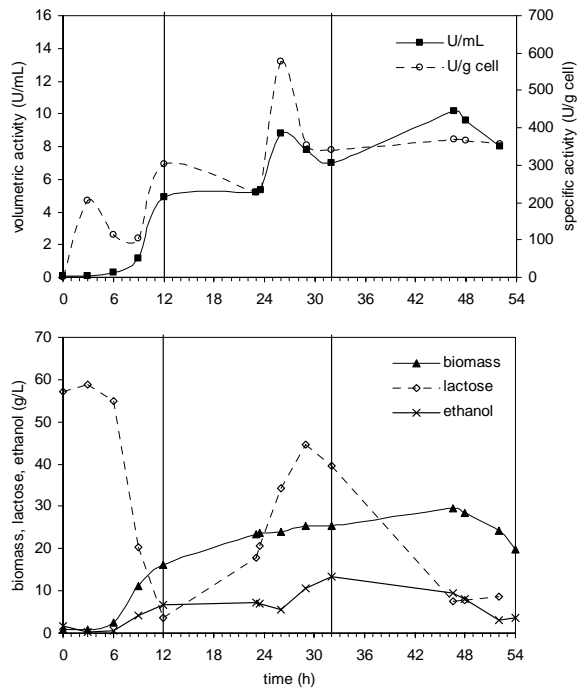


Figure 3.2.2: Fed-batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Exponential ascending feeding profile for 20 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.

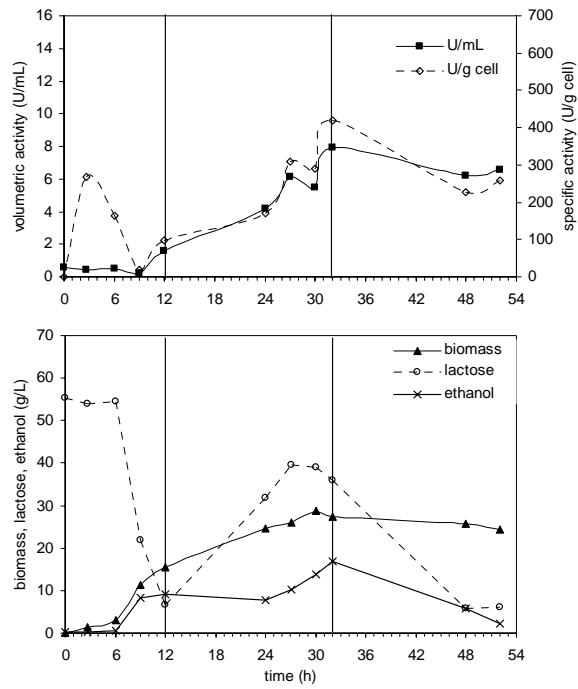


Figure 3.2.3: Batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 20 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.

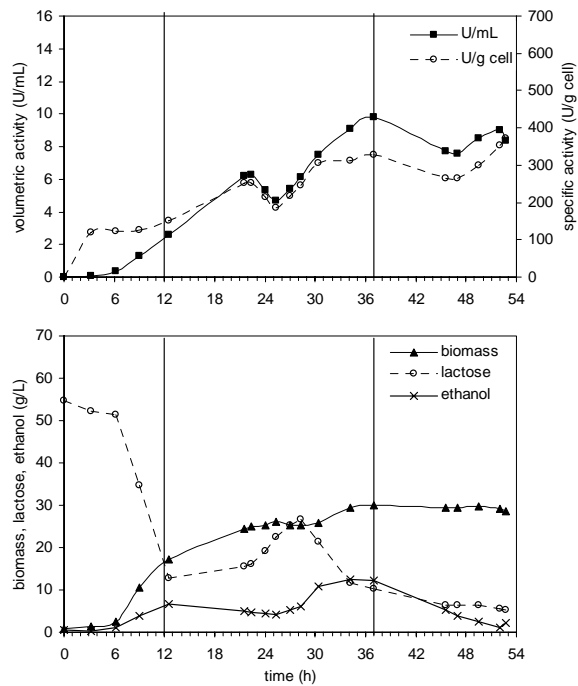


Figure 3.2.4: Fed-batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Exponential ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.

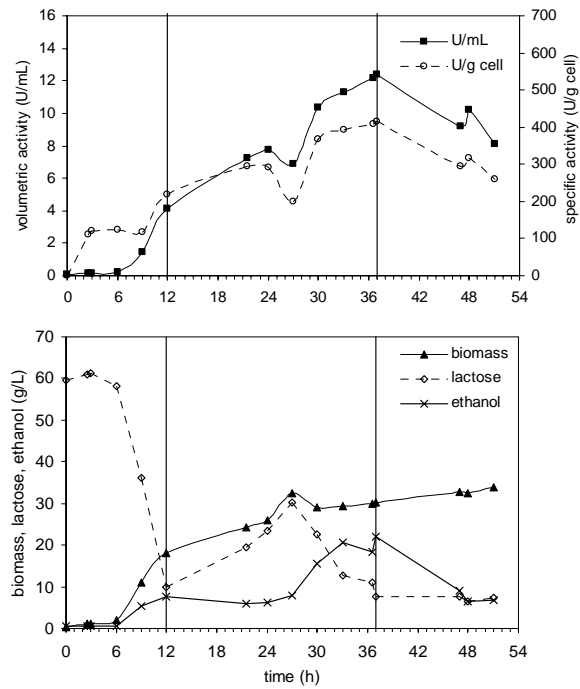


Figure 3.2.5: Fed-batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.

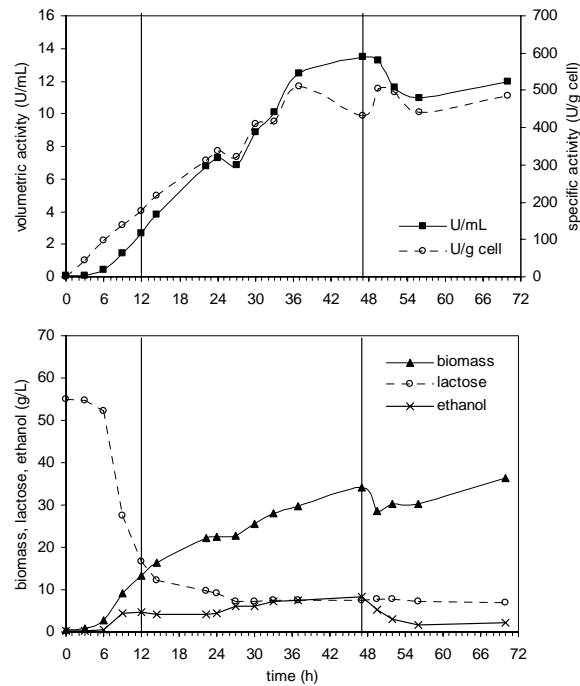


Figure 3.2.6: Fed-batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 35 hours. Feeding medium: four times concentrated cheese-whey.

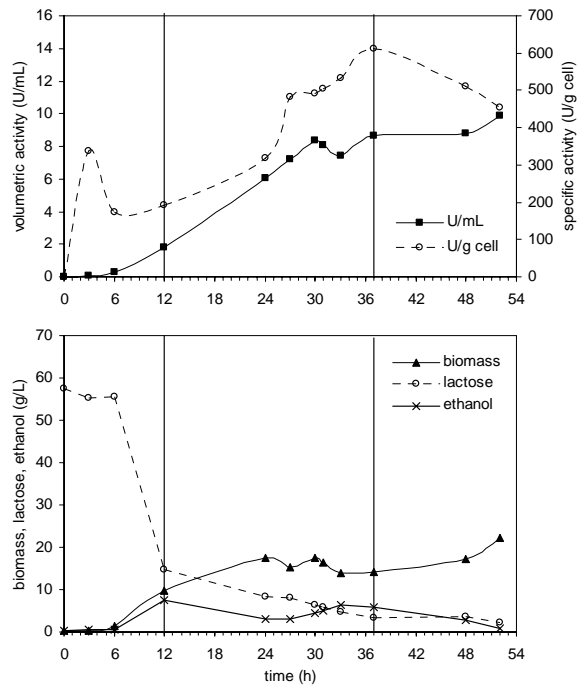


Figure 3.2.7: Fed-batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: two times concentrated cheese-whey.

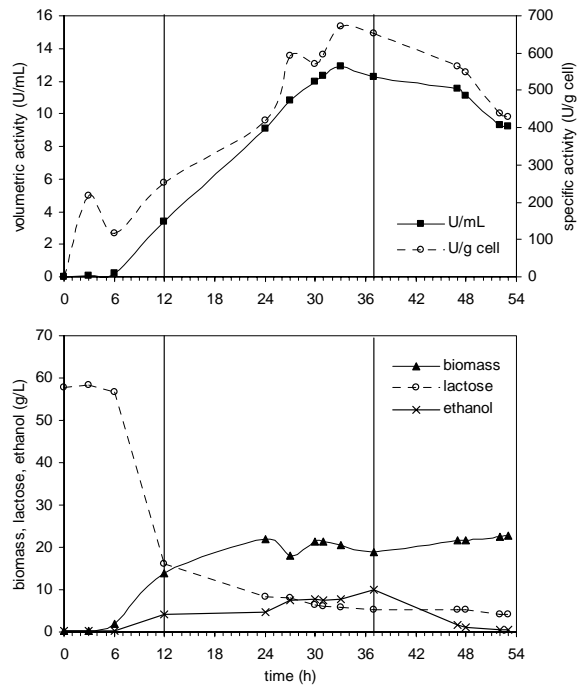


Figure 3.2.8: Fed-batch culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Feeding medium: three times concentrated cheese-whey.

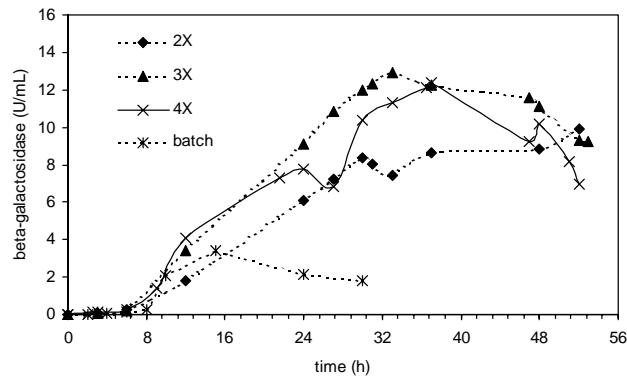


Figure 3.2.9: Influence of the feeding concentration on volumetric activity of β -galactosidase during a fed-batch culture with a linear ascending feeding profile during 25 hours.

Table 3.2.1: Yields and productivity for batch cultivation and for different feeding profile and time of fed-batch cultivation: exponential ascending for 20 hours (E20) and 25 hours (E25) and linear ascending for 20 hours (L20), 25 hours (L25) and 35 hours (L35).

	batch	L20	L25	L35	E20	E25
$Y_{X/S}$ batch	0.40	0.318	0.355	0.332	0.286	0.389
$Y_{X/S}$ feed	-	0.255	0.218	0.240	0.246	0.215
$Y_{X/S}$ global	0.40	0.150	0.207	0.187	0.149	0.177
$Y_{EtOH/S}$ global	0.33	0.128	0.134	0.052	0.097	0.079
Q_P (U/(L.h))	118.5	231.6	242.8	246.9	231.6	195.9

Table 3.2.2: Yields and productivity for batch cultivation and for different feeding medium concentrations of fed-batch cultivation for a linear ascending profile for 25 hours. 4X: cheese-whey 280g/L, yeast extract 20g/L. 3X: cheese-whey 210g/L, yeast extract 15g/L. 2X: cheese-whey 140g/L, yeast extract 10g/L.

	Batch	4X	3X	2X
$Y_{X/S}$ batch	0.40	0.355	0.324	0.221
$Y_{X/S}$ feed	-	0.218	0.174	0.191
$Y_{X/S}$ global	0.40	0.207	0.175	0.229
$Y_{EtOH/S}$ global	0.33	0.134	0.077	0.008
Q_P (U/(L.h))	118.5	242.8	290.9	190.5

3.2.5 Conclusions

This work has shown that fed-batch operation of a bioreactor using cheese-whey as culture medium is an interesting technology to increase the productivity of the process of

production β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. Among the carried out experiments, maximum productivity (290.9U/(L.h)) was achieved with linear ascending feeding profile during 25 hours utilizing three times concentrated cheese-whey as feeding medium.

Results for biomass accumulation were somehow lower than expected. The best explanation that appears from results is the fact that there was an oxygen limitation in all runs, despite the strong aeration and agitation conditions adopted. Indeed, when compared to other yeasts, such as *S. cerevisiae* or *K. lactis*, *K. marxianus* presents a much higher demand for oxygen, which could not be achieved in our bioreactors. Therefore, it should be further investigated the effects of oxygen on biomass concentration and enzyme productivity for these simple strategies of feeding.

3.2.6 References

1. Barba, D., Beolchini, F., Del Re, G., Di Giacomo, G., Veglió, F., Kinetic analysis of *Kluyveromyces marxianus* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochemistry*, 2001, **35** 531-536.
2. Scott, R., *Fabricación de queso*. Acríbia, Zaragoza, 1993, pp. 313-322.
3. Belem, M.A.F., Lee, B.H., Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochemistry*, 1999, **34** 501-509.
4. Nor, Z.M., Tamer, M.I., Scharer, J.M., Moo-Young, M., Jervis, E.J., Automated fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis* based on a novel method for on-line estimation of cell specific growth rate. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, **9** 221-231.
5. Alberguina, L., Porro, D., Martegani, E., Ranzi, B.M., Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991, **14** 82-92.
6. Porro, D., Martegani, E., Tura, A., Ranzi, B.M., Development of a pH-controlled fed-batch system for budding yeast. *Research Microbiology*, 1991, **142** 535-539.
7. Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M., High cell-density fermentation. *Methods in Molecular Biology*, 1998, **103** 107-120.
8. Blondeau, K., Boutur, O., Boze, H., Jung, G., Moulin, G., Galzy, P., Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 β production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the PHO5 promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, **41** 324-329.
9. Furlan, S.A., Carvalho-Jonas, M.F., Merkle, R., Bértoli, G.B., Jonas, R., Aplicação do sistema *Microtiter Reader* na seleção de microrganismos produtores de β galactosidase. *Archives of Biology and Technology*, 1995, **38** 12611268.

10. Sinclair, C.G., Cantero, D., Fermentation modelling. In *Fermentation: a practical approach*. Ed. B. McNeil and L.M. Harvey. Oxford University Press, Oxford, 1990, pp. 65-112.
11. Rech, R., Cassini, C.F., Secchi, A., Ayub, M.A.Z., Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, **23** 91-96.
12. Lederberg, J., The β galactosidase of *Escherichia coli*, strain K12. *Journal of Bacteriology*, 1950, **60** 381392.
13. Hensing, M.C.M, Vrouwenvelder, J.S., Hellinga, C., Van Dijken, J.P, Pronk, J.T., Use of chemostat data for modelling extracellular-inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high-cell-density fed-batch process. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, **1** 54-58.

3.3 Fed-batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using cheese-whey as culture medium

3.3.1 Abstract

Saccharomyces cerevisiae strain W303 was transformed with two yeast integrating plasmids containing *LAC4* and *LAC12* genes that codify β -galactosidase and lactose-permease of *Kluyveromyces lactis* respectively. The BLR030 transformant strain was selected due to its growth and β -galactosidase production capacity. Different culture media based on deproteinized cheese whey (DCW) were tested and the best (DCW, yeast extract 1% and peptone 3% (w/v)) was chosen for bioreactor experiments. Batch and fed-batch experiments with linear ascending feeding profile during 25 (FB25), 35 (FB35) and 50 (FB50) hours, were performed. FB35 and FB50 presented the highest β -galactosidase specific activities (around 1800U/g), and also the best productivities (180U/(L.h)).

Key-words: Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *LAC4*, β -galactosidase, cheese-whey, fed-batch.

3.3.2 Introduction

Recombinant technology applied to cellular systems, which are able to grow in large-scale bioreactors, has given the opportunity to obtain large quantities of protein that would otherwise be difficult or impossible to obtain. For this purpose, the use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a host microorganism for the expression of heterologous proteins has been particularly attractive. This yeast is generally recognized as a safe microorganism (GRAS), lacking endotoxins and lytic viruses, being able to perform many post-translational modifications, including glycosylation, acylation and folding (Alberguina *et al.*, 1991). In this way, *S. cerevisiae* has been used as a host microorganism to produce different types of proteins like β -galactosidase (Cheng *et al.*, 1997), glucoamylase (Hardjito *et al.*, 1993), α 2,6(N)sialyltransferase (Borsig *et al.*, 1995), antithrombotic hirudin (Kim *et al.*, 2003), sporamin (Chen *et al.*, 2002), *Closterium* sex pheromone (Sekimoto, 2002), cutinase (Calado *et al.*, 2002), *Rhizopus oryzae* lipase (Ueda *et al.*, 2002), capsid proteins of human polyomaviruses BK and JC (Hale *et al.*, 2002), human

interleukin-18 (Lim *et al.*, 2002), α_1 -antitrypsin (Tamer and Chisti, 2001), human XPA and XRCC1 DNA repair proteins (Pushnova *et al.*, 2001), *Aspergillus ficuum* endoinulinase (Park *et al.*, 2001).

Many studies for the production of recombinant protein by *S. cerevisiae* use fed-batch cultivation to obtain higher productivity. Different feeding methodologies have been developed, such as constant feeding (Hardjito *et al.*, 1993; Belem and Lee, 1999) or exponential feeding (Gombert and Kilikian, 1997; Shin *et al.*, 1998) to obtain constant specific growth rates, and more sophisticated systems, requiring fine instrumentation, such as on-line glucose concentration control (Horn *et al.*, 1996) and via on-line ethanol concentration control (Alberghina *et al.*, 1991). Other methodologies have been successfully developed based upon pH controlled feeding (Porro *et al.*, 1991); dissolved oxygen controlled feeding for *Kluyveromyces marxianus* (Barberis and Segovia, 1997); off-line glucose measure (Patkar and Seo, 1992); and via dissolved oxygen measure with the MSUR (maximum substrate uptake rate) determination for *S. cerevisiae* and *K. marxianus* (Oh *et al.*, 1998; Nor *et al.*, 2001), some of these obtained high cell concentrations of biomass (100g/L of *S. cerevisiae* or more) (Porro *et al.*, 1991; Alberghina *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 1998).

Cheese-whey is the liquid residue after the casein precipitation during cheese making. It represents 85-95% of the original milk volume and retains 55% of the milk nutrients, mainly lactose (4.5-5%w/v) and proteins (0.6-0.8% w/v). However, due to the fact of its low solids concentration (6-7%w/v), cheese-whey usually is considered an effluent. Despite the many technologies developed for cheese-whey utilization, nearly half of worldwide cheese-whey production is discarded as effluents (González-Siso, 1996). According to USDA, the Brazilian cheese-whey production increases annually, reaching 445,000 tons in 2000 (USDA-NASS, 2002), generating approximately 4 millions tons of cheese-whey.

The fed-batch cultures of *S. cerevisiae* described so far by the literature use defined or selective media, with glucose as carbon source. This work aimed to develop a fed-batch culture of recombinant *S. cerevisiae* using an undefined culture medium base on cheese-whey as carbon source.

3.3.3 Materials and methods

All chemicals used were of analytical grade, bought from Sigma (St. Louis, USA) or Merck (Darmstadt, Germany), except where indicated.

3.3.3.1 Yeast strain:

S. cerevisiae W303 (*Mata ade2-1 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1*) was kindly provided by Prof. JAP Henriques (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) and maintained on agar-plates containing YPD medium (Saffi *et al.*, 2001).

3.3.3.2 Plasmids

Plasmids pMR4 and pMR11 were kindly provided by Dr. J Polaina (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, Spain). These plasmids contain *leu2-d* gene, a rDNA locus sequence and the genes *LAC4* and *LAC12* under the control of a *CYC-GAL* promoter (Figure 1). The genes *LAC4* and *LAC12* code β -galactosidase and lactose-permease of *Kluyveromyces lactis* respectively (Rubio-Teixeira *et al.*, 1998).

3.3.3.3 Yeast transformation

Strain W303 was co-transformed with plasmids pMR4 and pMR11 by a high efficiency lithium-acetate technique (Agatep *et al.*, 1998) and incubated on lactose SD-agar plates at 30°C for 5 days.

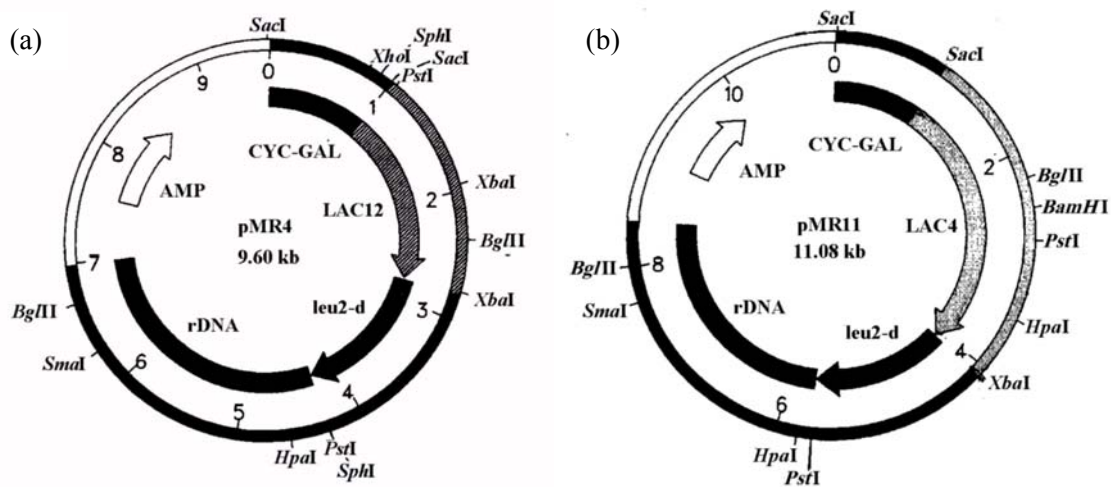


Figure 3.3.1: Plasmids used in this work to co-transform strain W303. (a) Plasmid pMR4 contains *LAC12* gene that codes *K. lactis* lactose-permease; (b) Plasmid pMR11 contains *LAC4* gene that codes *K. lactis* β -galactosidase (Rubio-Teixeira *et al.*, 1998).

3.3.3.4 Culture media

Selective media were made up of lactose, glucose or maltose SD-agar plates supplemented with amino acids (lactose, glucose or galactose 20g/L, yeast nitrogen base without amino acids 6.7g/L, adenine 20mg/L, histidine 20mg/L, tryptophan 20mg/L, uracil 20mg/L).

Complex media were YPD (glucose 20g/L, peptone 20g/L, yeast extract 10g/L) or YPL (lactose 40g/L, peptone 20g/L, yeast extract 10g/L).

To obtain deproteinized cheese-whey (DCW), 70g/L or 210g/L (for concentrated feeding medium) of cheese-whey powder (Elegê Laticínios S.A., Brazil) was dissolved in water, pH adjusted to 4.5 with pure phosphoric acid. This solution was boiled during 10 minutes for protein precipitation and centrifuged at 15,000×g for 10 minutes. The supernatant was then filtered. The permeate is the DCW, with about 50g/L or 150g/L of lactose respectively. Yeast extract and peptone were then added to the desired concentration and pH adjusted to 6.0 with potassium hydroxide. For bioreactor cultivations, 0.5mL/L of antifoam polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers (Mazu DF 800 S, Mazer Chemicals Ltd., England) was added to the final culture medium.

3.3.3.5 Bioreactor cultivation

Bioreactor experiments were performed in a 3L stirred tank bioreactor (Biostat B, B.Braun Biotech International, Germany), filled with 1.5L of culture medium, at 30°C, 500rpm, and aeration of 3L air/min. Bioreactor was inoculated with 100mL of a 30-40-hours pre-culture in YPL.

Fed-batch runs were composed primary by a 24-hours batch stage followed by a fed-batch stage of 25, 35 or 50 hours. Biomass yields (Y_{XS}), ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$) and enzyme productivity (Q_p) were calculated as described by Sinclair & Cantero (1990).

3.3.3.6 Enzyme activity assay

The enzyme activity assay was carried out in cell-free extracts, using ONPG (*o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside) as substrate, and performed as described by Rech *et al.* (1999). A unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ mol of ONP (*o*-nitrophenol) in one minute at the assay conditions.

3.3.3.7 Biomass concentration

The cell concentration was estimated by measuring absorbance in a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi, Japan) at $\lambda = 600\text{nm}$, and relating the readings to biomass dry weight with a calibration curve. The cells were harvested at 16,000×g for 3 min and washed twice with cold distilled water.

3.3.3.8 Lactose concentration

The lactose concentration, measured as total sugars, was determined by a phenol sulfuric acid method as previously described (Rech *et al.* 1999).

3.3.3.9 Ethanol assay

The ethanol concentration was determined by gas chromatography using a gas chromatograph (CG-14B Shimadzu, Japan) with a 12m length and 0.53mm internal diameter capillary column CBP1-W12-300. The chromatograph was programmed as follows: injector at 150°C; detector at 150°C; column at 40°C. To quantify the amount of ethanol, a calibration curve was constructed by adding a solution of cheese-whey (70g/L), varying ethanol concentration, and using a fixed amount of *n*-propanol as internal standard.

3.3.4 Results and discussion

3.3.4.1 Construction and selection of a *S. cerevisiae* strain that produces β -galactosidase

This step of the work aimed to obtain a *S. cerevisiae* strain that was able to grow on lactose and produce β -galactosidase. The strain W303 was co-transformed with the *Sma*I linearized plasmids pMR4 and pMR11. After incubation at 30°C for 5 days, 39 colonies were isolated from lactose SD-agar plates and denominated strains BLR001 to BLR039. These colonies were tested on SD-agar plates containing glucose, maltose or lactose as carbon source. Only 25 colonies maintained the capacity to grow on lactose as the sole carbon source (BLR007-008, BLR012-019, BLR021, BLR023-024, and BLR026-031, BLR033-036, BLR038-039).

The selected strains were submitted to a quantitative test of growth and β -galactosidase production on YPL, using *S. cerevisiae* W303 and *K. marxianus* CBS5665 as negative and positive controls respectively. Results shown in Figure 2b showed that strains BLR013, BLR015, BLR028, BLR035 and BLR036 had poor growth, similar to the wild strain W303. The other strains had a similar growth, around 10 units of optical density, yet inferior to the *K. marxianus* that has grown to 25 units of optical density. The results for β -galactosidase production (Figure 2a) show that poor growers do not have any enzyme activity, while strains BLR029, BLR030, BLR033 and BLR039 presented the highest β -galactosidase production. Considering growth and β -galactosidase production, recombinant strains BLR014, BLR029, BLR030, BLR031, BLR033, BLR038 and BLR039 were selected for the next experiment.

Further selection was carried out in YPL shaker cultures. Results shown in Figure 3a and 3b demonstrated that although recombinant strains have smaller biomass formation when compared to *K. marxianus*, their β -galactosidase production is higher. This can be explained by the expected multi-integration of the *LAC4* gene in the genome of recombinant strains, causing β -galactosidase overproduction. Strain BLR030 was finally chosen for bioreactor work.

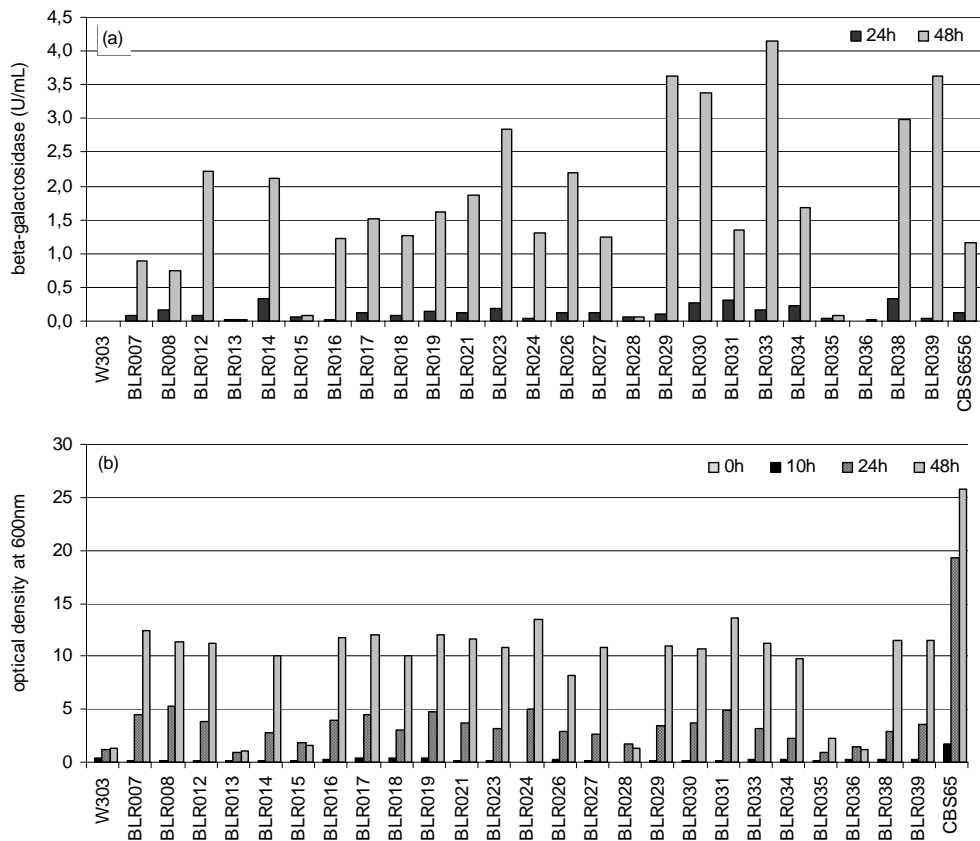


Figure 3.3.2: Growth and β -galactosidase production of transformed *S. cerevisiae* strains (BLR) compared with the wild strain (W303) and with *K. marxianus* CBS6556 in YPL.

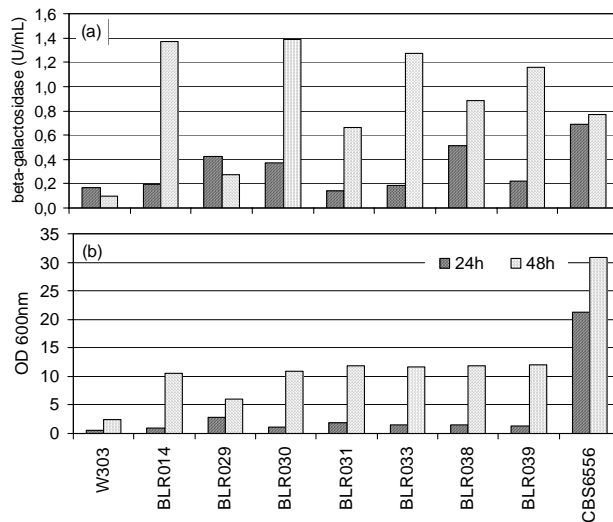


Figure 3.3.3: Growth and β -galactosidase production of transformed *S. cerevisiae* strains (BLR) compared with the wild strain (W303) and with *K. marxianus* CBS6556 in YPL. Data represent the mean of two experiments.

3.3.4.2 Selection of a culture medium for fed-batch bioreactor cultures

This experiment aimed to determine an efficient culture medium based on DCW for growth and production of β -galactosidase by *S. cerevisiae* BLR030. Batch cultures of DCW containing about 50g/L of lactose was supplemented with 10g/L of yeast extract and 10, 20 or 30g/L of peptone. Biomass, β -galactosidase activity and sugar consumption were followed during 56 hours, as presented in Figures 4a, 4b, 4c. This set of experiments was necessary to establish the amount of nitrogen source ideal to support growth and enzyme production. Results show that medium III is the best for biomass and β -galactosidase production, being chosen for bioreactor experiments.

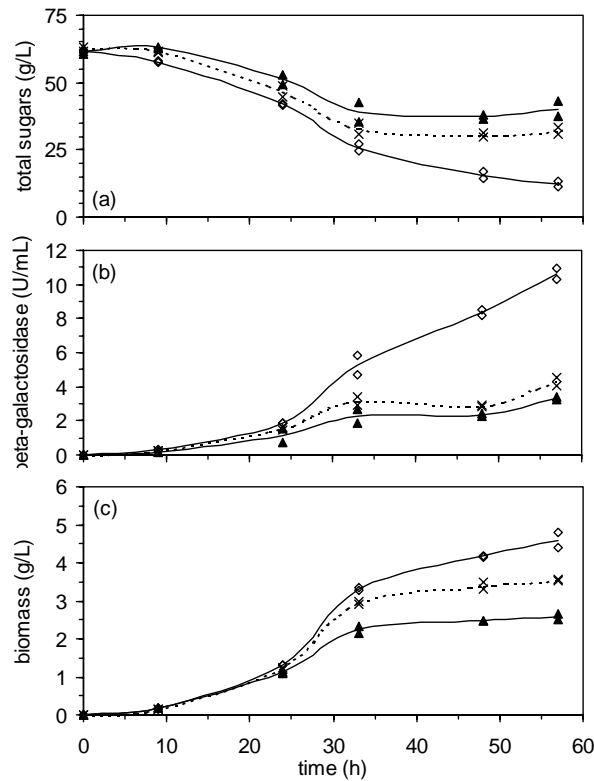


Figure 3.3.4: Biomass, β -galactosidase activity and sugar consumption of *S. cerevisiae* BLR030 in orbital shaker at 30°C.

(\blacktriangle) medium I (DCW, yeast extract 10g/L, peptone 10g/L); (\times) medium II (DCW, yeast extract 10g/L, peptone 20g/L); (\diamond) medium III (DCW, yeast extract 10g/L, peptone 30g/L). Data represent the mean of two experiments.

3.3.4.3 Bioreactor cultures

This step of the work studied the influence of feeding time on fed-batch cultivations of a recombinant *S. cerevisiae*. Fed-batch cultures with linear ascending feeding profile during 25, 35

and 50 hours were performed and the results were compared to batch cultivation. Culture and feeding media are based on DCW enriched with yeast extract and peptone. Results of batch culture is shown in Figure 5, whilst the fed-batch cultivations during 25 (FB25), 35 (FB35) and 50 (FB50) hours are presented in Figures 6, 7, 8. Table 1 compares values obtained for biomass and product yields of all cultures.

Poor yields of biomass ($Y_{X/S}$) resulted in low biomass concentration at the end of the culture, despite the fact that the $Y_{X/S}$ showed a slight increase when the feeding time increases. Similar results were observed by Ramakrishnan and Hartley (1993) when aerobically growing *S. cerevisiae* GRF167 in lactose. Domingues *et al.* (1999) obtained even smaller $Y_{X/S}$ values in cultures of *S. cerevisiae* T1 in lactose minimal media, suggesting that lactose is not a suitable substrate to obtain high cell density cultures. Works in where high cell densities of *S. cerevisiae* were achieved, always used defined media with glucose or glucose and galactose combinations as carbon source and some kind of strategy to control de substrate addition according to the variations of cells metabolism during the fed-batch phase (Porro *et al.*, 1991; Alberghina *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 1998). It was also observed a small amount of ethanol production during the cultivations, about 10g/L, indicating that, even under growth control, *S. cerevisiae* BLR030 was showing catabolic repression by lactose, a fermentative sugar, although oxygen was never depleted form medium.

Table 3.3.1: Yields and productivity for batch cultivation and for different feeding time of fed-batch cultivation: during 25 hours (FB25), during 35 hours (FB35) and during 50 hours (FB50).

	batch	FB25	FB35	FB50
$Y_{X/S}$	0.18	0.16	0.23	0.26
$Y_{EtOH/S}$		0.05	0.05	0.06
Q_P (U/(L.h))	120	125	180	185

Lactose consumption curve of the batch culture (Figure 5c) shows a quasi-linear lactose consumption over the 50 hours of fermentation. The work of Rubio-Teixeira *et al.* (2000) also shows batch cultures with about 50 to 70 hours of fermentation using cheese-whey as culture medium. In our fed-batch runs, feeding initiates at 24 hours of fermentation, when lactose concentration in culture media is around 40g/L. Time of feeding initiation was chosen based on dissolved oxygen concentration (data not shown) when there was an increase on dissolved oxygen concentration, indicating a shift in cellular metabolism. Data shows that for FB25 (Figure 6c) and FB35 (Figure 7c) lactose accumulates in culture medium during the feeding period, while for FB50

(Figure 8c) there was no lactose accumulation during the feeding period, suggesting that this is a better feeding interval for this yeast.

The β -galactosidase specific activity curves (Figures 5a, 6a, 7a, 8a,) show that there is an increase in the specific activity during the firsts 30 hours of cultivation for the batch and the FB25 runs, and during the firsts 50 hours of cultivation for the FB35 and FB50 runs, showing that lactose feeding induces β -galactosidase activity, even when lactose is already presented in culture medium. Similar results were obtained for *K. marxianus* CBS6556 in previous work (Rech and Ayub, data not published). The maximum specific activity were obtained at 49 hours of cultivation in FB35 and FB50 runs with 1,778U/(g cell) and 1,934U/(g cell). This specific activity is 2.8 times higher to that obtained with a fed-batch culture of *K. marxianus* CBS6556 using cheese-whey as culture medium (Rech and Ayub, data not published) and two times greater than obtained by Rubio-Teixeira *et al.* (1998) with *S. cerevisiae* MRY276 (W303-1A transformed with pMR4 and pMR11 plasmids), a similar strain to that used in this work. However, when this authors crossed MRY276 and the S288C wild *S. cerevisiae* strain, the specific β -galactosidase activity of the diploid strain raised 4 folds. These experiments were carried out in batch cultures, in defined medium containing lactose as the carbon source.

The β -galactosidase volumetric activity (Figures 5b, 6b, 7b, 8b) and productivity values (Table 1) show that runs FB35 and FB50 have quite similar β -galactosidase production profiles and also similar productivity: 180 and 185U/(L.h) respectively. Comparing these results with that obtained with *K. marxianus* (Rech and Ayub, data not published), it can be noticed that volumetric activity of FB35 and FB50 runs are higher than those observed for *K. marxianus* fed-batch cultivations. However, *S. cerevisiae* productivities are about 35% lower. This fact can be explained by the slower growth rates of *S. cerevisiae* cultures, consequently imposing longer cultivation times. It is interesting, however, to note that *S. cerevisiae* and *K. marxianus* batch cultivations have similar productivities: 120 and 118U/(L.h).

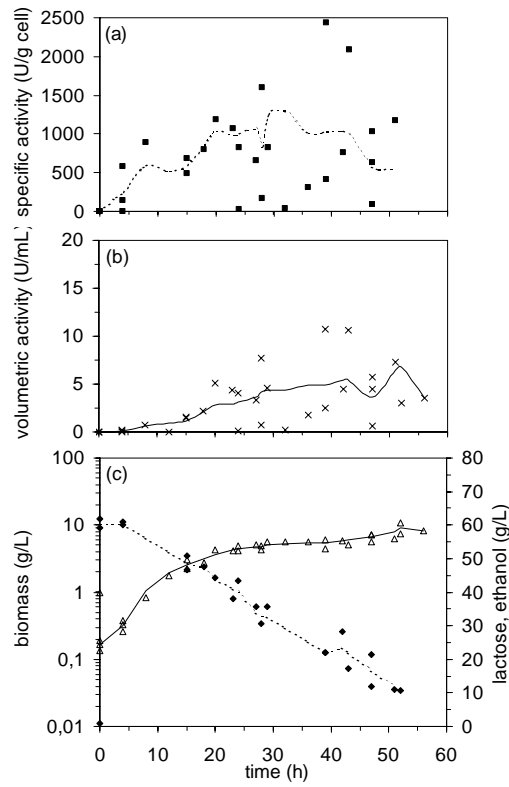


Figure 3.3.5: Batch culture of *S. cerevisiae* BLR030 grown on cheese-whey. Data represent the mean of two experiments. (Δ) biomass, (\blacklozenge) lactose, (+) ethanol, (\times) β -galactosidase volumetric activity, (\blacksquare) β -galactosidase specific activity.

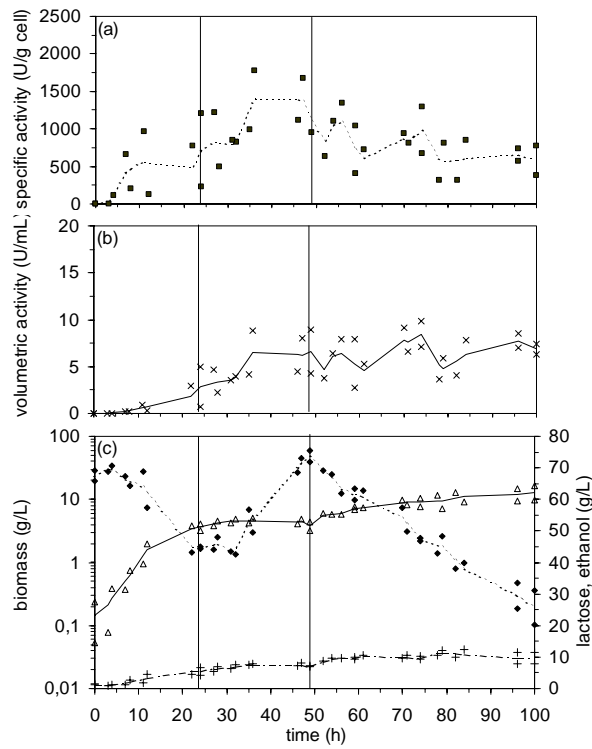


Figure 3.3.6: Fed-batch culture of *S. cerevisiae* BLR030 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 25 hours. Data represent the mean of two experiments. (Δ) biomass, (◆) lactose, (+) ethanol, (×) β-galactosidase volumetric activity, (■) β-galactosidase specific activity.

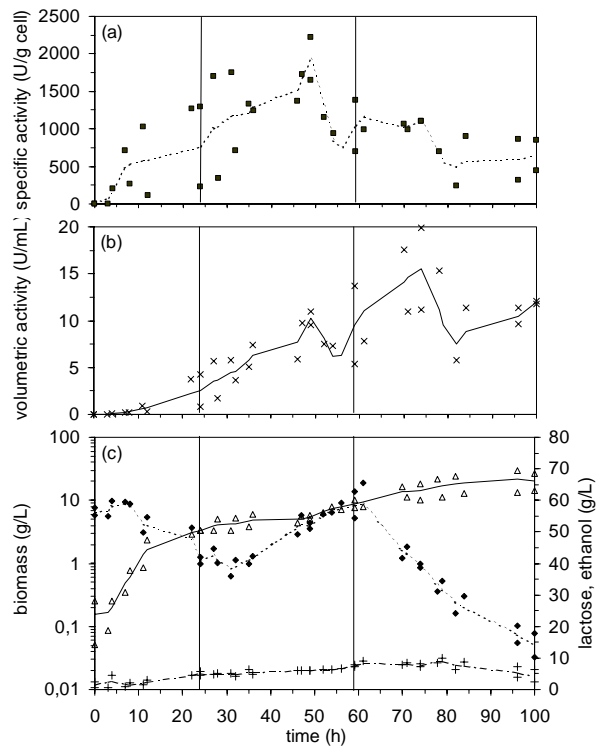


Figure 3.3.7: Fed-batch culture of *S. cerevisiae* BLR030 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 35 hours. Data represent the mean of two experiments. (Δ) biomass, (\blacklozenge) lactose, (+) ethanol, (\times) β -galactosidase volumetric activity, (\blacksquare) β -galactosidase specific activity.

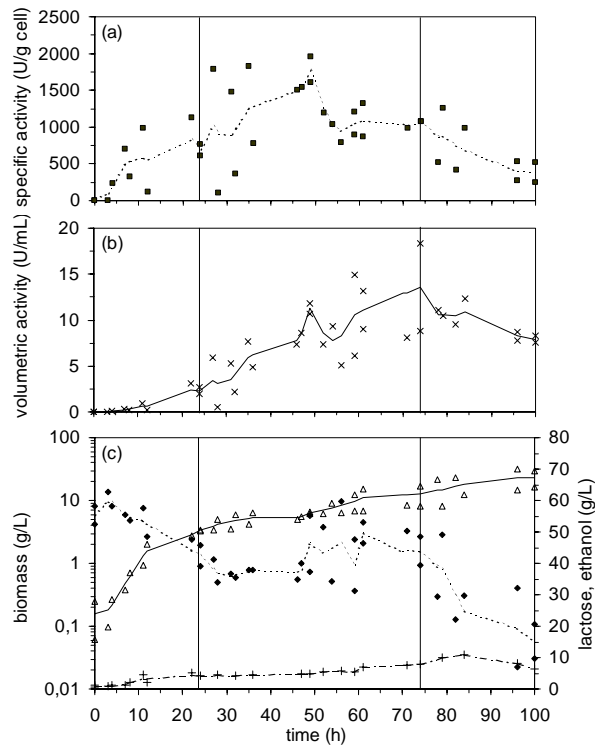


Figure 3.3.8: Fed-batch culture of *S. cerevisiae* BLR030 grown on cheese-whey. Linear ascending feeding profile for 50 hours. Data represent the mean of two experiments. (Δ) biomass, (\blacklozenge) lactose, (+) ethanol, (\times) β -galactosidase volumetric activity, (\blacksquare) β -galactosidase specific activity.

3.3.5 Conclusions

The construction of recombinant strains of *S. cerevisiae* as host for heterologous protein expression has been widely used in research and industry. In this way, the insertion of *LAC4* and *LAC12* into the genome of *S. cerevisiae*, under the control of a strong promoter such as the one used in this work (*CYC-GAL*) is a new strategy to allow the use of this well known yeast in cultures based on lactose, a sugar that is not metabolized by it. Yet, large amounts of cheese whey, a by-product of dairy industry, can then be used as inexpensive carbon source for cell cultivation. In this work we attempted the use of this complex, undefined medium in fed-batch cultivation as a way to reduce costs in enzyme production. Moreover, we developed simple feeding strategy, not relying on sophisticated control systems. The results, although far from ideal, showed promising perspectives for further development, if we consider that we obtained higher volumetric and specific enzyme activity compared to *K. marxianus*.

3.3.6 References

- Agatep R, Kirkpatrick RD, Parchaliuk DL, Woods RA, Gietz RD. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>). 1998.
- Alberghina L, Porro D, Martegani E, Ranzi BM. Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 14: 82-92. 1991.
- Barberis SE, Segovia RF. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate in to *Kluyveromyces fragilis* culture. *Biotechnology Techniques* 11(11): 797-799. 1997.
- Belem MAF, Lee BH. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochemistry* 34: 501-509. 1999.
- Borsig L, Ianov SX, Herrmann GF, Kragl U, WanUdrey C, Berger EG. Scaled-up expression of human α 2,6(N)sialyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 210(1): 14-20. 1995.
- Calado CRC, Taipa MÂ, Cabral JMS, Fonseca LP. Optimisation of culture conditions and characterisation of cutinase produced by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 31(1-2): 161-170. 2002
- Chen CW, Lei BC, Yeh KW, Duan KJ. Recombinant sweet potato sporamin production via glucose/pH control in fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, *In Press, Corrected Proof, Available online 13 December 2002*.
- Cheng C, Hunag YL, Yang ST. A novel feeding strategy for enhanced plasmid stability and protein production in recombinant yeast fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 56(1):25-31. 1997.
- Domigues L, Teixeira JA, Lima N. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 621-626. 1999.
- González-Siso MI. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57: 1-11. 1996.
- Gombert AK, Kilikian BV. A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 14(2). 1997.
- Hale AD, Bartkevičiūtė D, Dargevičiūtė A, Jin L, Knowles W, Staniulis J, Brown DWG, Sasnauskas K. Expression and antigenic characterization of the major capsid proteins of human polyomaviruses BK and JC in *Saccharomyces cerevisiae* *Journal of Virological Methods* 104(1): 93-98. 2002.

- Hardjito L, Greenfield PF, Lee PL. Recombinant protein production via fed-batch culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 120-126. 1993.
- Horn U, Strittmatter W, Kreber A, Knüpfer U, Kujau M, Wenderoth R, Müller K, Matzku S, Plückthun A, Reisenberg D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46: 524-532. 1996.
- Kim MD, Han KC, Kang HA, Rhee SK, Seo JH. Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 101(1): 81-87. 2003.
- Lim YY, Lee MY, Chung BW, Park SM, Park SG, Jang YS, Yang MS, Kim DH. Expression of a functional human interleukin-18 in yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 30(6): 703-709. 2002.
- Nor ZM, Tamer MI, Schärer JM, Moo-Young M, Jervis EJ. Automated fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis* based on a novel method for on-line estimation of cell specific growth rate. *Biochemical Engineering Journal* 9: 221-231. 2001.
- Oh G, Moo-Young M, Chisti Y. Automated fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* based on on-line monitored maximum substrate uptake rate. *Biochemical Engineering Journal* 1: 211-217. 1998.
- Park S, Jeong HY, Kim HS, Yang MS, Chae KS. Enhanced production of *Aspergillus ficuum* endoinulinase in *Saccharomyces cerevisiae* by using the *SUC2*-deletion mutation. *Enzyme and Microbial Technology* 29(2-3): 107-110. 2001.
- Patkar A, Seo JH. Fermentation kinetics of recombinant yeast in batch and fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 103-109. 1992.
- Porro D, Martegani E, Tura A, Ranzi BM. Development of a pH-controlled fed-batch system for budding yeast. *Research Microbiology* 142: 535-539. 1991.
- Pushnova EA, Ostanin K, Thelen MP. Human XPA and XRCC1 DNA Repair Proteins Expressed in Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Metabolism* 74(3): 380-384. 2001.
- Ramakrishnan S, Hartley BS. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4230-4235. 1993.
- Rech R, Ayub MAZ. Feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese-whey. *Process Biochemistry* *submitted*
- Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAZ. Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 91-96. 1999

- Rubio-Teixeira M, Arévalo-Rodríguez M, Lequerica JL, Polaina J. Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. *Journal of Biotechnology* 84: 97-106. 2000.
- Rubio-Teixeira M, Castrillo JI, Adam AC, Ugalde UO, Polaina J. Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 827-837. 1998.
- Saffi J, Feldmann H, Winnacker EL, Henriques JAP. Interaction of the yeast Pso5/Rad16 and Sgs1 proteins: influences on DNA repair and aging. *Mutation Research* 486: 195-206. 2001.
- Sekimoto H. Production and secretion of a biologically active Closterium sex pheromone by *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40(9): 789-794. 2002.
- Shin CS, Hong MS, Kim DY, Shin HC, Lee J. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 364-370. 1998.
- Sinclair CG, Cantero D, Fermentation modeling. In *Fermentation: a practical approach*. Ed. B. McNeil and L.M. Harvey. Oxford University Press, Oxford, 1990, pp. 65-112.
- Tamer IM, Chisti Y. Production and recovery of recombinant protease inhibitor α_1 -antitrypsin, *Enzyme and Microbial Technology* 29(10): 611-620. 2001.
- Ueda M, Takahashi S, Washida M, Shiraga S, Tanaka A. Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17(3-5): 113-124. 2002.
- USDA–NASS, 2002 - http://www.usda.gov/nass/pubs/agr02/02_ch8.pdf in 26/11/02.

4 Discussão Geral

Com o objetivo de obter um processo que maximizasse a produtividade da enzima β -galactosidase, neste trabalho foram realizados cultivos em biorreator em regime batelada e batelada alimentada com a levedura selvagem *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 e com a levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* BLR030, utilizando soro de queijo como meio de cultivo. Nos cultivos em regime de batelada alimentada foram testados dois perfis de alimentação, exponencial e linear, e três tempos de duração da alimentação, 20, 25 e 35 horas para a levedura *K. marxianus* e 25, 35 e 50 horas para a levedura *S. cerevisiae*.

A Figura 4.1 mostra a biomassa formada ao longo do tempo nos cultivos realizados. Nesta figura percebe-se claramente a grande diferença na produção de biomassa entre as leveduras testadas. Em 35 horas de cultivo, enquanto a levedura *K. marxianus* atinge entre até 35g/L de células, os cultivos com a levedura *S. cerevisiae* possuem em torno de 5g/L de células, chegando a um máximo de 23g/L ao final de 100 horas de cultivo.

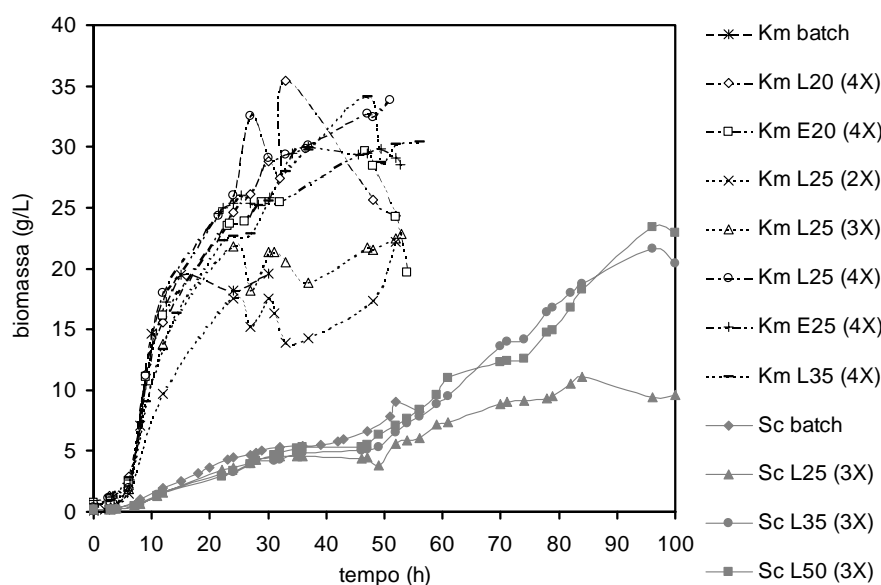


Figura 4.1: Comparação das curvas de crescimento das leveduras *K. marxianus* CBS6556 (Km) e *S. cerevisiae* BLR030 (Sc) de cultivos em regime batelada (batch) e batelada alimentada com alimentação linear (L) e exponencial (E) durante 20 horas (20), 25 horas (25), 35 horas (35) e 50 horas (50), com meio de alimentação concentrado duas (2X), três (3X) ou quatro vezes (4X).

Já em termos de atividade específica da enzima, este resultado se inverte. Observando-se a Figura 4.2, que mostra as curvas de atividade específica de β -galactosidase ao longo do cultivo,

vê-se que a atividade específica máxima de β -galactosidase nos cultivos de *K. marxianus* é em torno de 700U/(mg cél) e ocorre entre 35 e 40 horas de cultivo, coincidindo com a máxima concentração celular. Já a levedura *S. cerevisiae* possui atividade específica de β -galactosidase aproximadamente 1900U/(mg cél) em 50 horas de cultivo, uma atividade 2,7 vezes maior que a da levedura selvagem *K. marxianus*. Este resultado mostra que o objetivo da construção de uma levedura recombinante para a produção de β -galactosidase, que é obter uma linhagem de levedura com grande atividade específica da enzima, foi atingido.

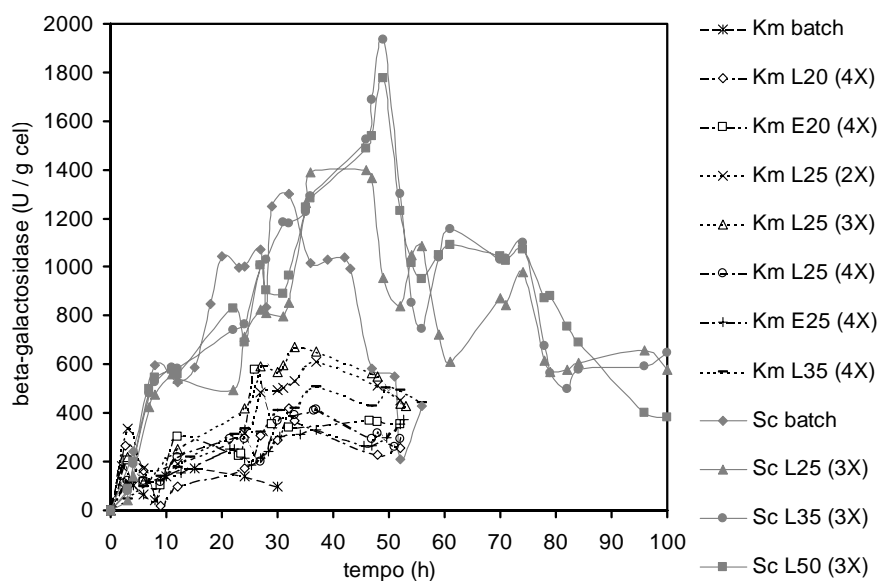


Figura 4.2: Comparação da produção específica de β -galactosidase das leveduras *K. marxianus* CBS6556 (Km) e *S. cerevisiae* BLR030 (Sc) de cultivos em regime batelada (batch) e batelada alimentada com alimentação linear (L) e exponencial (E) durante 20 horas (20), 25 horas (25), 35 horas (35) e 50 horas (50), com meio de alimentação concentrado duas (2X), três (3X) ou quatro vezes (4X).

Contudo, este ótimo resultado de atividade específica de β -galactosidase é prejudicado quando combinado com o baixo rendimento celular da levedura recombinante. A Figura 4.3 mostra as curvas de atividade volumétrica de β -galactosidase dos cultivos realizados. Neste gráfico observa-se que a levedura *S. cerevisiae* atinge máxima atividade volumétrica, 16U/mL, após 70 horas de cultivo, enquanto que a levedura selvagem *K. marxianus* atinge 13,5U/mL de atividade volumétrica de β -galactosidase após 30 horas de cultivo. Apesar de concentrações similares de atividade volumétrica, a diferença no tempo de cultivo faz com que a produtividade enzimática máxima obtida nos cultivos de *S. cerevisiae* seja 185U/(L.h), no regime de batelada alimentada com alimentação linear crescente durante 50 horas (ver Tabela 3.3.1), enquanto no cultivo de *K. marxianus*, em regime de batelada alimentada, com alimentação linear crescente durante 25 horas e

soro de queijo três vezes concentrado, obteve-se uma produtividade enzimática de 290,9U/(L.h) (ver Tabela 3.2.2).

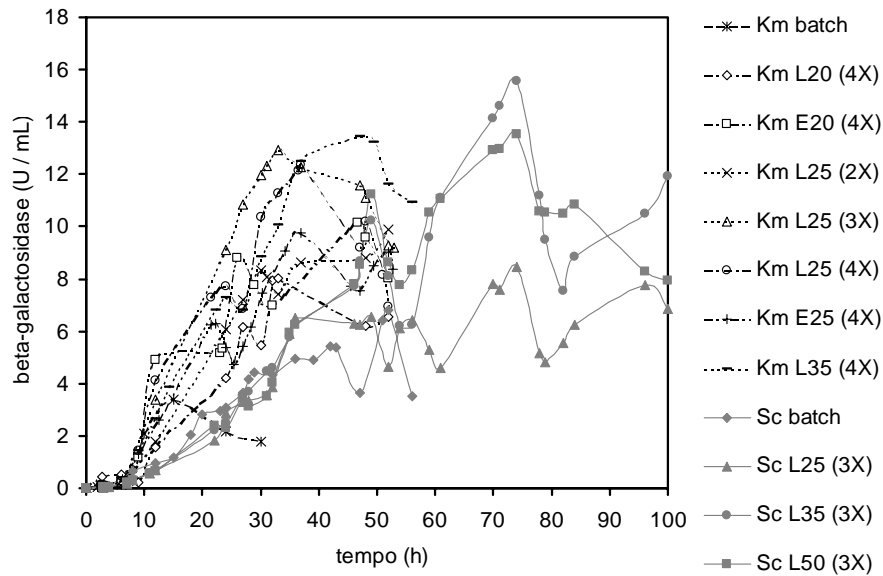


Figura 4.3: Comparação da concentração volumétrica de β -galactosidase das leveduras *K. marxianus* CBS6556 (Km) e *S. cerevisiae* BLR030 (Sc) de cultivos em regime batelada (batch) e batelada alimentada com alimentação linear (L) e exponencial (E) durante 20 horas (20), 25 horas (25), 35 horas (35) e 50 horas (50), com meio de alimentação concentrado duas (2X), três (3X) ou quatro vezes (4X).

Desta forma, apesar da grande atividade específica de β -galactosidase da levedura recombinante *S. cerevisiae*, seu baixo rendimento celular é prejudicial ao processo como um todo, tornando o cultivo da levedura selvagem *K. marxianus* mais eficiente em termos de produtividade geral.

5 Conclusões e Perspectivas

A transferência de oxigênio em biorreatores constitui um fator importante a ser estudado devido à sua influência sobre a velocidade de crescimento dos microrganismos, a conversão da fonte de carbono em biomassa e a produção de metabólitos secundários como o etanol. Desta maneira, a transferência de oxigênio se relaciona de modo tão importante com a produtividade de biorreatores, que muitas vezes a velocidade de transferência de oxigênio é utilizada como parâmetro para o escalonamento de processos. Este estudo mostrou que as condições de transferência de oxigênio durante cultivos em batelada possuem influência sobre a atividade específica de β -galactosidase em *Kluyveromyces marxianus*. Maiores velocidades de aeração e agitação aumentaram o rendimento celular, contudo tiveram influência negativa na atividade específica de β -galactosidase. Sendo esta uma enzima que não participa diretamente do metabolismo de oxidação de substratos, esta relação não é óbvia. Este trabalho mostra a importância do estudo da operação de biorreatores, onde uma simples otimização de variáveis de operação pode ocasionar um ganho na produtividade do processo.

O regime batelada alimentada, utilizando soro de queijo como meio de cultura e meio de alimentação, revelou-se uma tecnologia promissora. Mesmo com as limitações ocorridas neste trabalho, como a dificuldade de transferência de oxigênio para a levedura *K. marxianus* e a falta de uma instrumentação mais sofisticada que permitisse, por exemplo, medidas *on-line* de lactose ou etanol, todos os cultivos em batelada alimentada realizados resultaram em um aumento da produtividade do biorreator quando comparados aos cultivos em batelada, tanto para a levedura *K. marxianus* quanto para a cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*.

Controles de alimentação mais sofisticados, em cascata com medidas de oxigênio, substrato ou etanol, talvez tragam ainda maiores ganhos de produtividade aos cultivos em batelada alimentada, contudo trazem consigo também maiores custos de instalação e manutenção. Apenas um estudo detalhado será capaz de realizar um balanço entre o aumento de custo de um processo e o seu respectivo ganho de produtividade.

Quanto à levedura *K. marxianus*, será interessante estudar qual o resultado de uma batelada alimentada com soro de queijo e sem limitação de oxigênio. Mesmo o oxigênio tendo uma influência negativa na atividade específica de β -galactosidase, um cultivo onde se conseguisse manter um suprimento adequado de oxigênio para que a concentração deste não fique nula pode gerar uma concentração de biomassa significativamente maior que as alcançadas neste trabalho, aumentando, assim, a produtividade geral do processo. A adição de substâncias carreadores de

oxigênio ao meio de cultivo apresenta-se como uma alternativa a ser estudada com vistas à contornar a dificuldade de uma transferência adequada de oxigênio para as células.

A levedura *S. cerevisiae* constitui-se na primeira escolha quando se fala em produção de proteínas recombinantes em eucariotos. É considerada um microrganismo GRAS e seu código genético já é conhecido. A construção de uma levedura *S. cerevisiae* produtora de β -galactosidase mostrou-se um método eficiente para o aumento da atividade específica da enzima. Esta maior atividade deveu-se, sobretudo à integração dos genes de interesse no genoma da levedura sob um promotor forte (*CYC-GAL*). Contudo, o *background* genético da levedura escolhida foi o principal responsável pela obtenção de culturas com baixa concentração de células, prejudicando o processo como um todo. A construção de uma nova cepa recombinante de *S. cerevisiae* à partir de uma cepa selvagem mais adequada é uma alternativa viável para contornar as dificuldades encontradas neste trabalho.

Desta forma, como perspectivas de novos estudos baseados neste trabalho, podemos citar:

- Realizar cultivos em regime batelada alimentada de *K. marxianus* sem limitação de oxigênio através do uso de instrumentação e controle adequados e do uso substâncias carreadoras de oxigênio;
- Construir uma nova levedura recombinante com melhores características e testá-la em cultivos batelada-alimentada;
- Realizar o escalonamento dos processos.

Abstract

This study was divided in three main laboratory work. Primary, the work aimed at studying the influence of aeration and agitation on the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 grown in protein hydrolyzed cheese whey. The experiments were carried out on a 3L bench bioreactor under three different conditions of agitation and aeration: (I) 500rpm and 3L.min⁻¹; (II) 600rpm and 6L.min⁻¹; (III) 700rpm and 9L.min⁻¹. This Crabtree negative yeast showed ethanol production, which is higher at low aeration condition. β -galactosidase production was shown to be dependent on aeration rates, with best productivity being achieved at intermediary conditions of agitation and aeration of medium (condition II). In the bench bioreactors used in this work, the combination of air flow and agitation speed, but not the type of turbine, showed to be an important factor influencing the volumetric oxygen transfer (K_La).

The next work was to develop simple feeding strategies to obtain high-cell-density cultures of *Kluyveromyces marxianus* and to maximize β -galactosidase productivity of the process, using cheese-whey as batch and feeding medium. Two feeding profiles (linear and exponential), three feeding times (20, 25 and 35 hours) and three different feeding media concentrations (cheese-whey concentrated two, three or four times) were tested. Results showed that fed-batch cultures of *K. marxianus* in cheese-whey did not achieve high biomass concentrations. However continuous lactose addition in the culture produced high specific enzyme activity and, consequently, improved the volumetric activity of β -galactosidase when compared to batch cultivations. The best fed-batch strategy, which was the feeding of three times concentrated cheese-whey during 25 hours, resulted in a β -galactosidase productivity of 290.9U/(L.h), which represents over 50% greater productivity of β -galactosidase compared to batch cultivation.

In order to improve the specific β -galactosidase productivity of the yeast, a *Saccharomyces cerevisiae* strain W303 was transformed with two yeast integrating plasmids containing *LAC4* and *LAC12* genes that codify β -galactosidase and lactose-permease of *Kluyveromyces lactis* respectively. The BLR030 transformant strain was selected due to its growth and β -galactosidase production capacity. Different culture media based on DCW were tested and the best (deproteinized cheese whey, yeast extract 1% and peptone 3% (w/v)) was chosen for bioreactor experiments. Batch and fed-batch experiments with linear ascending feeding profile during 25 (FB25), 35 (FB35) and 50 (FB50) hours, were performed. FB35 and FB50 presented the highest β -galactosidase specific activities (around 1800U/g), and also the best productivities (180U/(L.h)).

Anexo I

R Rech

Curriculum Vitae resumido

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rosane Rech

Sexo: feminino

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Departamento de Tecnologia dos Alimentos - UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500 - prédio 43212 - sala 117
Agronomia - Porto Alegre
91505-970, RS - Brasil
Telefone: 51 3166683
E-mail: rrech@ufrgs.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 1998 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Estudo da produção de beta-galactosidase por leveduras a partir de soro de queijo
Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub
- 1996 - 1998 Mestrado em Engenharia Química.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*, Ano de obtenção: 1998
Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub
- 1991 - 1995 Graduação em Engenharia Química.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

3. ESTÁGIOS

3.1 Bolsas de Iniciação Científica

- 1993 Projeto: Otimização do Processo de Redução Direta de Minério de Ferro com Redutor Sólido (Carvão) Através da Injeção de Vapor d'Água na Carga - Parte III
Local: Depto. de Eng. Metalúrgica - UFRGS - POA - RS
Orientador: Antônio C. F. Vilela
Entidade patrocinadora: FAPERGS

- 1993-1994 Projeto: Desfosforação Oxidante de Aço Inox com Desenvolvimento de Técnicas Micrográficas das Escórias
Local: Depto. de Eng. Metalúrgica - UFRGS - POA - RS
Orientador: Antônio C. F. Vilela
Entidade patrocinadora: CNPq / PROPESQ
- 1994 Projeto: Transferência de Calor e Massa em Meios Porosos Não-Saturados - Aplicação a Solos que Envolvem Cabos de Potência Aterrados
Local: Depto. de Eng. Química - UFRGS - POA - RS
Orientador: Lígia S. D. Ferreira
Entidade patrocinadora: CNPq

3.2 Estágios em Empresas

- 1991 Bioensaios - Análise e Consultoria Ambiental Ltda.
- 1995 Petroflex - Indústria e Comércio S.A.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- 1993 Menção Honrosa do Concurso Jovem Pesquisador, CNPq

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR:

5.1. Experiência didática

- 2000 – Atual Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Ensino de Graduação, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos,
Departamento de Tecnologia dos Alimentos.
Disciplinas Ministradas
1. Operações Unitárias da Eng de Alimentos II
 2. Operações Unitárias da Eng de Alimentos III
 3. Instrumentação e Controle da Indústria de Alimentos
 4. Modelagem e Simulação de Processos da Indústria de Alimentos
- 1998 Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Ensino de Graduação, Instituto de Química, Departamento de Físico-Química.
Disciplinas ministradas:
1. Físico-Química II
 2. Físico-Química Experimental II

5.2. Orientações concluídas

- 1 Ana Fabrícia de Oliveira Brugos. O Uso de Produtos de Soro de Leite na Indústria de Alimentos e das Diversas Aplicações. 2001. Curso Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- 2 Thaís Ferreira Falcão. Alternativas Tecnológicas para a Produção de Nhoque. 2000. Curso Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

- 3 Daniela Loguercio Cánepa. Avaliação da Utilização de Aditivos nas Propriedades Funcionais da Proteína Texturizada de Soja. 2000. Curso Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 1 RECH, R., CASSINI, C. F., SECCHI, A., AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology & biotechnology*, v.23, n.2, p.91 - 96, 1999.
- 2 RECH R, AYUB MAZ. Influence of aeration and agitation rates on the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. *Brasiliana Archives of Biology and Technology* aceito com modificações em 25 de junho de 2002.
- 3 RECH R, AYUB MAZ. Feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese-whey. Submetido ao *Process Biochemistry* em 18 de novembro de 2002.
- 4 LONGHI LCS, BARRERA PR, RECH R, AYUB MAZ, SECCHI A. A kinetic model for the *Kluyveromyces marxianus* growth using cheese whey as substrate. Submetido ao *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* em 2002.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

7.1. Trabalhos completos publicados em anais de evento

- 1 SECCHI A, LONGHI LCS, BARRERA PR, TRIERWEILER JO, RECH R, AYUB MAZ, FERREIRA LS, SOUZA JR MB. Lactase production from cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* yeast. Part II: kinetic modeling. *Proceedings of ENPROMER 2001* Volume III (2001), 1843-1848.
- 2 BARRERA, P. R., LONGHI, L. G. S., RECH, R., AYUB, M. A. Z., SECCHI, A. Modelo matemático não isotérmico de um biorreator experimental para a produção de lactase In: IV Congresso Latino-Americano de Estudantes de Engenharia Química, 2000, Mendoza. 2000.
- 3 RECH, R., CASSINI, C. F., SECCHI, A., AYUB, M. A. Z. Aproveitamento de Soro de Queijo para a Produção de Lactase por *Kluyveromyces marxianus* In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1998, Porto Alegre. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 1998.

7.2. Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

- 1 TELES, C. D., FRANKEN, N., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Estudo da concentração da alimentação em cultivos tipo batelada alimentada utilizando soro de queijo como meio de cultura In: XIV Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre. Anais do XIV Salão de Iniciação Científica. 2002.
- 2 FRANKEN, N., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Estudo de fermentações tipo batelada alimentada utilizando soro de queijo como meio de cultura In: XIII Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre. Anais do XIII Salão de Iniciação Científica. 2002.

- 3 ROSA, D. R., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Clonagem do gene *LAC4* em *Kluyveromyces marxianus* para otimizar a produtividade da enzima beta-galactosidase In: XIII Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre. Anais do XIII Salão de Iniciação Científica. 2002.
- 4 FRANKEN, N., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Otimização da produtividade da enzima β -galactosidase a partir da seleção do meio de cultura adequado para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante In: XIV Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre. Anais do XIV Salão de Iniciação Científica. 2002.
- 5 RECH, R., FRANKEN, N., ROSA, D. R., AYUB, M. A. Z. Estudo da fermentação tipo batelada alimentada para a produção de beta-galactosidase In: III Reunião Anual do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2001, Porto Alegre. III Reunião Anual do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular - Livro de Resumos. 2001.
- 6 SCHILLING, A., FRANKEN, N., ROSA, D. R., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Estudo da fermentação tipo batelada alimentada para a produção de beta-galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* In: XII Salão de Iniciação Científica, 2000, Porto Alegre. Anais do XII Salão de Iniciação Científica. 2000.
- 7 RECH, R., FRAZZON, J., AYUB, M. A. Z. Estudo da produção em biorreator de β -galactosidase recombinante em *Kluyveromyces marxianus* In: II Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, 2000, Porto Alegre. Livro de Resumos. 2000.
- 8 BARRERA, P. R., LONGHI, L. G. S., SECCHI, A., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Modelo cinético de biorreator para produção de lactase a partir de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus* In: V Congresso Regional de Estudantes de Engenharia Química e IV Seminário de Estudantes de Engenharia Química do Mercosul, 2000, Porto Alegre. 2000.
- 9 SCHILLING, A., RECH, R., AYUB, M. A. Z. Estudo da produção de β -galactosidase recombinante em *Kluyveromyces marxianus* In: XI Salão de Iniciação Científica, 1999, Porto Alegre. Anais do XI Salão de Iniciação Científica. 1999.
- 10 SCHILLING, A., RECH, R., SECCHI, A., AYUB, M. A. Z. Estudo das Condições de Oxigenação do Meio de Cultura na Produção de Lactase por *Kluyveromyces marxianus* In: X Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre. Anais do X Salão de Iniciação Científica. 1998.
- 11 CASSINI, C. F., RECH, R., SECCHI, A., AYUB, M. A. Z. Aproveitamento de Soro de Queijo para a Produção de Lactase por *Kluyveromyces marxianus* para a Indústria de Alimentos In: XIII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia, 1997, Porto Alegre. Anais do XIII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia. 1997.
- 12 RECH, R., CASSINI, C. F., SECCHI, A., AYUB, M. A. Z. Aproveitamento de Soro de Queijo para a Produção de Lactase por *Kluyveromyces marxianus* para a Indústria de Alimentos In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1997, Rio de Janeiro. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1997.

- 13 CASSINI, C. F., RECH, R., SECCHI, A., AYUB, M. A. Z. Otimização do Uso de Moinho Coloidal para a Obtenção de Extrato de Leveduras In: IX Salão de Iniciação Científica, 1997, Porto Alegre. Anais do IX Salão de Iniciação Científica. 1997.
- 14 RECH, R., CALDASSO, L. L., WEBER, J. V. V., VILELA, A. C. F. Otimização do Tratamento do Resíduo Químico Contendo Mercúrio Obtido na Determinação de Ferro Total em Ferro-Esponja In: Otimização do Tratamento do Resíduo Químico Contendo Mercúrio Obtido na Determinação de Ferro Total em Ferro-Esponja, 1993, Porto Alegre. Anais do V SIC. 1993.

Anexo II

Cartas de aceite e trabalhos publicados em periódicos durante o período do doutorado:

AII.1 Artigo publicado em periódico internacional:

Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAZ. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1999) 23, 91-96.

AII.2 Trabalho publicado em Anais de Congresso Internacional:

Secchi A, Longhi LCS, Barrera PR, Trierweiler JO, Rech R, Ayub MAZ, Ferreira LS, Souza Jr MB. Lactase production from cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* yeast. Part II: kinetic modeling. *Proceedings of ENPROMER 2001* Volume III (2001), 1843-1848.

AII.3 Carta de aceite parcial do artigo em periódico internacional:

Rech R, Ayub MAZ. Influence of aeration and agitation rates on the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. *Brazilian Archives of Biology and Technology* aceite com modificações em 25 de junho de 2002.

AII.4 Carta de envio do artigo para periódico internacional:

Rech R, Ayub MAZ. Feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese-whey. Submetido ao *Process Biochemistry* em 18 de novembro de 2002.