

LYGIA FÁTIMA DA MATA CORREA

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E LONGEVIDADE DE CULTURAS
DE *Kluyveromyces lactis* SOB ESTRESSE POR NITROGÊNIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

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

T

C824c
2007

Correa, Lygia Fátima da Mata, 1982-
Cinética de crescimento e longevidade de culturas de
Kluyveromyces lactis sob estresse por nitrogênio / Lygia
Fátima da Mata Correa. – Viçosa, MG, 2007.
xi, 50f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.
Orientador: Flávia Maria Lopes Passos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 42-47.

1. *Kluyveromyces lactis* . 2. Leveduras (Fungos) -
Fisiologia. 3. Stresss (Fisiologia). 4. Fermentação.
I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 579.56

LYGIA FÁTIMA DA MATA CORREA

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E LONGEVIDADE DE CULTURAS
DE *kluveromyces lactis* SOB ESTRESSE POR NITROGÊNIO**

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

APROVADA: 16 de março de 2007.

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Co-orientador)

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Prof. Frederico José Vieira Passos

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

*Dedico este trabalho à Deus Pai, Deus Filho
e Deus Espírito Santo;*

*Aos meus pais: Dilermando e Maria
Anunciação;*

*Aos meus irmãos: Antônio Henrique e Ana
Flávia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelo seu amor infinito e por todas suas graças e bênçãos.

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

À FAPEMIG, pela concessão das bolsas de estudo.

Aos meus pais, Dilermando e Maria Anunciação, pelo apoio, pelo incentivo, pelo exemplo, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência.

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

Ao meu amado Leandro, pelo amor e cuidado, pelo apoio e ajuda, pela paciência e compreensão, por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Aos meus demais familiares, em especial à minha Tia Lia e à Vovó Ana pelas ajudas incansáveis e pelo amor.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pela sua orientação, pelas oportunidades concedidas desde a graduação e pela amizade.

Aos professores Antônio Galvão Nascimento e Marlene Isabel Vargas Vitoria pela colaboração e sugestões oportunas.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Valdilene, Júlio, Talita, Cássia, Fábio, Agenor, Rafael, Wendel, Otávio, Tatiane, Tatiana, Paula, Janaína, Marcelo, Liliane, Rodrigo, Cláudia e à Dra. Virgínia, pela

amizade, pela descontração, companheirismo, e contribuições para este trabalho.

Aos amigos dos Laboratórios de Genética, Microbiologia Industrial, Micorrizas, Petróleo, Café, Anaeróbios, Alimentos, pela agradável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores e ao professor Patarroyo, pela colaboração com as análises de microscopia de fluorescência.

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

Às companheiras de república: Rejane, Cinthia Tupi, Bia, Tati e Marine, pela paciência, amizade e pela alegre convivência que nos torna quase uma família.

A todos os meus amigos e colegas, pela amizade, pelo carinho e pelas orações.

A todos que, de alguma forma, contribuíram ou colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

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

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

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 16 de março de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	12
3.2. Concentrações de sulfato de amônio – Fonte de Nitrogênio.....	12
3.3. Cultivo em batelada.....	12
3.4. Cinética de crescimento em função da concentração de sulfato de amônio.....	13
3.5. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x.}$) e constante de saturação (K_s).....	13
3.6. Cultivo contínuo.....	13
3.7. Análise de substrato e produtos do metabolismo.....	14
3.8. Efeito da idade de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> na velocidade de crescimento.....	15
3.9. Determinação de quitina na parede celular de <i>Kluyveromyces lactis</i>	15
3.9.1. Coloração Calcoflúor.....	15
3.9.2. Concentração de quitina.....	15
3.10. Determinação das dimensões celulares de <i>Kluyveromyces lactis</i> em função da idade.....	16

3.11. Observação de características morfológicas de morte celular programada em culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> sob estresse por nitrogênio e idade.....	16
3.11.1. Coloração Hoechst 33348.....	17
3.11.1. Coloração DAPI.....	17
3.12. Microscopia de Fluorescência.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Cinética de crescimento de <i>Kluyveromyces lactis</i> em função da concentração de sulfato de amônio.....	19
4.2. Efeito da idade de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i> na velocidade específica inicial de crescimento.....	21
4.3. Efeito da velocidade de crescimento no envelhecimento de culturas de <i>Kluyveromyces lactis</i>	32
5. CONCLUSÃO.....	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
APÊNCICE.....	48
APÊNDICE A.....	49
APÊNDICE B.....	50

RESUMO

CORREA, Lygia Fátima da Mata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Cinética de crescimento e longevidade de culturas de *Kluyveromyces lactis* sob estresse por nitrogênio.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-orientadores: Antônio Galvão do Nascimento e Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Para investigar o estresse imposto por condições limitantes de nitrogênio na cinética de crescimento e na longevidade de culturas de *Kluyveromyces lactis*, determinaram-se as constantes cinéticas do crescimento de culturas de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio, avaliou-se o efeito da idade das culturas na velocidade específica inicial de crescimento e averiguaram-se os sinais de envelhecimento celular em função de diferentes velocidades de crescimento de culturas conduzidas em regime contínuo sob limitação por nitrogênio. Culturas de *K. lactis* foram cultivadas em meio YCB tamponado acrescido de sulfato de amônio, nas concentrações 0,02 a 38,0 mmol.L⁻¹. A cinética de crescimento de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio, obedeceu o modelo cinético proposto por Monod. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x.}$) e a constante de saturação (K_s) foram de 0,44 h⁻¹ e 0,15 mmol.L⁻¹, respectivamente. A velocidade específica inicial de crescimento reduziu com a idade da cultura. Concentrações de quitina na parede celular aumentaram com a idade da cultura e com a concentração de sulfato de amônio. Dimensões celulares aumentaram com a idade independente da concentração de sulfato de amônio. A presença de características morfológicas de apoptose foi verificada a partir do quinto dia de transferência da cultura para meio novo nas concentrações de 0,57 mmol.L⁻¹, 3,80 mmol.L⁻¹, 7,60 mmol.L⁻¹ e a partir do oitavo dia de

repicagem na concentração de 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄. Culturas contínuas sob estresse por nitrogênio foram conduzidas nas velocidades de crescimento de 0,01, 0,06; 0,18 e 0,35 h⁻¹. Culturas com velocidades de crescimento de 0,18 e 0,35 h⁻¹ produziram maior rendimento em etanol e menor rendimento em glicerol. A concentração de quitina na parede celular de culturas de *K. lactis* conduzidas nas velocidades de crescimento de 0,01 h⁻¹ e 0,06 h⁻¹ foi maior (27 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹ de N-acetilglicosamina) comparada com as culturas conduzidas nas velocidades de crescimento de 0,18 h⁻¹ e 0,35 h⁻¹, que apresentaram 6 µg.mL⁻¹ e 5 µg.mL⁻¹ de N-acetilglicosamina, respectivamente. As dimensões das células de *K. lactis* foram maiores na cultura conduzida com velocidade de crescimento de 0,01 h⁻¹, se comparada com as demais velocidades de crescimento avaliadas: 0,06; 0,18 e 0,35 h⁻¹. Apesar desses sinais de envelhecimento terem sido detectados, características morfológicas de apoptose só foram identificadas nas culturas de *K. lactis* conduzidas na velocidade de crescimento de 0,01 h⁻¹. Os resultados mostraram que o estresse por nitrogênio e a idade afetam a cinética de crescimento de culturas de *K. lactis* e sugerem que culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis* sob condições nitrogênio limitantes conduzidas com velocidade de crescimento correspondente a 0,01 h⁻¹ podem ser úteis em estudos sobre sinais de envelhecimento celular.

ABSTRACT

CORREA, Lygia Fátima da Mata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2007. **Growth kinetic and longevity of the *Kluyveromyces lactis* cultures under nitrogen limitation.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Advisers: Antônio Galvão do Nascimento and Marlene Isabel Vargas Vilorio.

In order to investigate the stress condition imposed by nitrogen limitation on kinetic of growth and aging of *Kluyveromyces lactis*, the kinetics constants of *K. lactis* culture as function of ammonium sulfate concentration were determined. The effect of aging of the culture on its specific initial growth rate was evaluated. Signals of aging such as cell wall chitin concentration and apoptosis markers were analyzed as function of growth rate on continuous culture. *K. lactis* was cultured in buffered YCB medium supplemented with ammonium sulfate at concentrations of 0.02 to 38.0 mmol.L⁻¹. The growth kinetic followed the model proposed by Monod. The maximum specific growth rate (μ_{max}) and saturation constant (K_s) were 0.44 h⁻¹ and 0.15 mmol.L⁻¹, respectively. The initial specific growth rates decrease as the aging of the culture increases. The cell wall chitin concentration increased with the ammonium concentrate and the aging of the cultures. The cell dimensions raised with aging in all the ammonium sulfate concentration analyzed. Apoptosis markers were only observed in the older cultures, after five days of recycling of the culture on the concentrations of 0.57 mmol.L⁻¹, 3.80 mmol.L⁻¹ and 7.60 mmol.L⁻¹ and after eight days on the concentrations 38.0 mmol.L⁻¹ of ammonium sulfate. Aging signals were investigated at *K. lactis* cells growing in nitrogen limiting continuous culture at growth rate 0.01, 0.06, 0.18 and 0.35 h⁻¹. Chitin concentration of cell wall of cells growing at 0.01 h⁻¹ and 0.06 h⁻¹ was higher (27 μ g.mL⁻¹ N-acetylglucosamine and 20 μ g.mL⁻¹ N-acetylglucosamine)

than of cells growing at 0.18 h^{-1} and 0.35 h^{-1} ($6\mu\text{g.mL}^{-1}$ and $5\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively). The dimensions of *K. lactis* cells were largest on the growth rate of 0.01 h^{-1} . It was detected apoptosis markers on the continuous culture under the nitrogen limiting growth rate of 0.01 h^{-1} . The results demonstrate that nitrogen limitation and aging affect growth kinetic and suggest that nitrogen limited continuous culture conducted at growth rate 0.01 h^{-1} can still proven useful to investigate aging response of *Kluyveromyces lactis*.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras vêm sendo exploradas pelo homem há milhares de anos na produção de bebidas e alimentos fermentados, sendo importantes agentes biológicos na produção de etanol combustível, enzimas, vitaminas, probióticos, entre outras substâncias de aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

A levedura *Kluyveromyces lactis* é uma alternativa à *Saccharomyces cerevisiae* para fermentações em grande escala, especialmente na produção de biomassa e proteínas, com perspectivas atuais na produção de proteínas heterólogas, por apresentar metabolismo predominantemente oxidativo e baixa repressão por glicose. Além disso, é capaz de assimilar lactose, podendo ser empregada em processos industriais, tendo o soro de queijo como substrato. Recentemente, tem sido reconhecida como um modelo em estudos fisiológicos e genéticos de células eucarióticas (SCHAFFRATH e BREUNING, 2000).

Um fator limitante nas fermentações artesanais e industriais é a necessidade de freqüente renovação da cultura de leveduras, em períodos curtos, de 15 a 20 dias, devido à perda da atividade metabólica, do crescimento e da viabilidade celular (WALKER, 1998). Tanto do ponto de vista biotecnológico quanto do ponto de vista científico, a perda de atividade das culturas com o tempo é de grande interesse.

As leveduras são fungos unicelulares que, geralmente, se reproduzem vegetativamente por brotamento. O número de brotos que uma célula de levedura é capaz de gerar, ao longo de sua vida, é no máximo de 15 a 25. A literatura faz referência ao envelhecimento de células de leveduras, expressando como idade replicativa e idade cronológica (BRANCHAT et al., 2004). O envelhecimento pode ser observado por alterações morfológicas e pelo aumento da concentração de quitina na parede celular, que concentra na cicatriz dos brotos, e atualmente tem sido associado à presença de

características morfológicas de apoptose, o que até poucas décadas atrás não havia sido descrito para organismos unicelulares.

Fatores fisiológicos que afetam a velocidade de crescimento, como o “status” nutricional, parecem influenciar a longevidade. Em leveduras, condições de restrição calórica, imposta por fonte limitante de carbono e energia, demonstraram aumentar a longevidade das células (GUARENTE et al., 2002). Há poucos estudos relacionados à limitação de nitrogênio e longevidade de células de leveduras.

Na conversão do soro de queijo em biomassa, proteína ou metabólitos, por *K. lactis*, é sugerido o uso do subproduto permeado da ultrafiltração, após a remoção das proteínas do soro (SILVEIRA, 2004). O fator limitante no permeado parece ser a fonte de nitrogênio (CAMPOS, 2001). Assim, há o interesse em saber como a limitação por nitrogênio pode influenciar o crescimento e longevidade da *Kluyveromyces lactis*.

Diante dessas considerações e reconhecendo a falta de estudos relativos à limitação por nitrogênio associado à cinética de crescimento e à longevidade de culturas *Kluyveromyces lactis*, esse trabalho teve a finalidade de investigar e relacionar a longevidade e a velocidade de crescimento das culturas com o estresse por nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os produtos fermentados são conhecidos, há milênios. Existem registros de produção de vinho na Síria em 3500 a.C., e de cerveja e pão na quinta dinastia Egípcia, em 2400 a.C., mas a primeira referência data ainda de 7000 a.C. com a produção de cerveja na Suméria (BROCK et al., 1994). Somente no século XIX, foi reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis pelos processos fermentativos, os quais foram identificados como leveduras (WALKER, 1998).

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

Inicialmente, a levedura *Kluyveromyces lactis* foi denominada *Saccharomyces lactis*, mas em 1965 foi agrupada no gênero *Kluyveromyces*, sendo então renomeada *K. lactis*. Em 1984, a classificação da espécie tornou-se *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, membro da família Saccharomycetaceae e subfamília Saccharomycetoideae. Verifica-se, no entanto, que o nome *Kluyveromyces lactis* é geralmente utilizado (BONEKAMP e OOSTEROM, 1994). Trata-se de uma levedura ascomiceta muito próxima evolutivamente da *Saccharomyces cerevisiae*.

A levedura *Kluyveromyces lactis* apresenta grande potencial industrial e tem sido utilizada na produção da enzima β -galactosidase para a hidrólise da lactose no leite e seus derivados (LOUVEL et al., 1996). Além dessa aplicação, *K. lactis* possui a capacidade de crescer em soro de queijo, um substrato de baixo custo que é gerado em grandes volumes pela indústria de queijo

(NUNES et al., 1993). Tal fato estimula a sua utilização para fins biotecnológicos. O soro de queijo é obtido após a precipitação da caseína do leite, durante a fabricação de queijos. Representa cerca de 85-95% do volume do leite e retém cerca de 55% dos seus nutrientes, sendo estes lactose, proteínas solúveis, lipídeos, sais minerais e vitaminas (SISO, 1996). As proteínas contidas no soro possuem valores nutricionais e funcionais significativos para a indústria alimentícia, podendo ser aproveitadas após a separação e a concentração por ultrafiltração. Contudo, a lactose e sais minerais contidos no soro são frequentemente descartados no efluente, o que provoca graves problemas ambientais (SISO, 1996). Assim, o uso do permeado de soro de queijo como meio de cultura microbiana desponta como proposta para o seu aproveitamento e a levedura *Kluyveromyces lactis* destaca-se como microrganismo candidato para sua utilização, uma vez que é uma das poucas espécies de leveduras capazes de assimilar a lactose como única fonte de carbono e energia (SCHAFFRATH e BREUNING, 2000).

Kluyveromyces lactis é reconhecida como microrganismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), pela FDA (*Food and Drug Administration*), o que aumenta o interesse de seu uso em aplicações na alimentação humana e animal. Recentemente, *K. lactis* tem sido estudada como um modelo alternativo de células eucarióticas em estudos fisiológicos e genéticos, da mesma forma que vem se estabelecendo como hospedeira de um sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas (SCHAFFRATH e BREUNING, 2000). Enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta metabolismo oxirredutivo predominante sobre o metabolismo oxidativo, a *Kluyveromyces lactis* possui metabolismo oxidativo mais eficiente. Isso demonstra a vantagem de *K. lactis* em relação a *S. cerevisiae* no que diz respeito à produção de proteínas heterólogas (SCHAFFRATH e BREUNING, 2000).

O genoma da *K. lactis* foi completamente seqüenciado e isso tem permitido estudos sobre a expressão diferencial de genes frente a condições fisiológicas de interesse.

O estado fisiológico de uma cultura microbiana é caracterizado pelo tamanho das células e pela composição macromolecular. Quando a levedura é cultivada sob condições físicas e nutricionais definidas, sob regime de batelada, ela aumenta inicialmente sua população a uma velocidade máxima característica daquelas condições. Porém, em determinado ponto, o

crescimento populacional torna-se restrito por mudanças do meio, impostas tanto pelo próprio crescimento microbiano, quanto por alterações físicas ou químicas (WALKER, 1998). Em função de tais mudanças no meio de cultura durante o cultivo do microrganismo, observa-se uma curva de crescimento típica com propriedades fisiológicas distintas nas fases: lag, exponencial, de desaceleração, estacionária e de morte (GRIFFIN et al., 1994). A fase lag reflete o tempo requerido para que as células se adaptem ao meio ao qual foram inoculadas, a partir da síntese de ribossomos e enzimas necessários para seu crescimento. Na fase log, a população de células se multiplica exponencialmente com uma velocidade específica máxima, cujo valor depende do microrganismo e das condições de crescimento. Antecedendo a fase estacionária, a população de células passa por uma fase intermediária, chamada de desaceleração, onde a velocidade específica do crescimento torna-se intermediária entre zero e próximo de máximo. Monod (1949) foi o primeiro a descrever a velocidade específica de crescimento como função da concentração de substrato, isto é, $\mu = \mu_{\text{máx.}} \cdot S / (K_s + S)$, onde μ é a velocidade específica de crescimento, $[S]$ é a concentração do substrato limitante e K_s , a constante de afinidade da célula pelo substrato limitante (BAILEY & OLLIS, 1986). A fase de desaceleração é caracterizada por um estado fisiológico alterado, onde já foi relatado: declínio da replicação do DNA genômico, indução de proteínas de estresse, aumento no estoque de carboidratos, indução e repressão de genes específicos relacionados à carência nutricional (RIOU et al., 1997). Na fase estacionária, a população de células confere uma biomassa com valor relativamente constante e a velocidade de crescimento específica tende a zero. Após prolongados períodos na fase estacionária, as células morrem e sofrem autólise, caracterizando assim a fase de morte (MOAT & FOSTER, 1995). A condição do crescimento em regime de batelada, portanto, implica variações no meio e na população com o tempo.

O cultivo em regime contínuo funciona na fase de desaceleração do crescimento e mantém condições físico-químicas constantes, sendo útil em estudos de estresse nutricional e diferentes estados fisiológicos da célula. A população de células cresce em diferentes velocidades de crescimento de acordo com o fluxo de alimentação do meio, uma vez que a velocidade específica de crescimento é numericamente igual à taxa de diluição da cultura, isto é, $\mu = D = F/V$ (onde D corresponde à taxa de diluição; F ao fluxo de

alimentação e V ao volume de trabalho no biorreator). A cultura contínua opera nas velocidades específicas de crescimento intermediárias entre zero e uma velocidade específica de crescimento inferior à máxima. A velocidade específica de crescimento pode ser em função de um ou mais fatores nutricionais que limitam o crescimento. Uma vez estabelecido o fluxo, na cultura contínua, são necessárias 8 a 10 gerações para que o regime permanente seja estabelecido. Nas condições de regime permanente, tem-se um sistema em que todos os parâmetros da cultura são constantes, como concentração de substratos/produtos e massa celular. As células estão todas com a mesma idade, o mesmo estágio fisiológico, constituindo uma população tão homogênea quanto possível (WALKER, 1999).

As leveduras constituem modelo de estudo de células eucarióticas, por sua simplicidade e facilidade de manuseio, para estudos relacionados ao ciclo celular, regulação e fisiologia.

O ciclo celular de leveduras (Figura 1) é similar ao de eucariotos superiores. Geralmente, a forma de reprodução vegetativa em leveduras ocorre por brotamento. O ciclo celular divide-se em: intérfase (fase G1, S, G2), caracterizada pelo aumento da massa celular e duplicação do DNA; e fase M (mitose), onde ocorre a segregação do material genético duplicado entre a célula-mãe e a célula-filha, seguida da citocinese. A fase G1, onde a célula irá crescer até atingir tamanho suficiente para entrar no ciclo celular, é o intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA. Na fase S ocorre a duplicação do DNA. A fase G2 é o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose celular. Tais fases são fundamentais para permitir que o sistema de controle do ciclo celular seja regulado por sinais provenientes do meio ambiente. Dependendo das condições ambientais, a célula pode ficar na fase estacionária, geralmente conhecida como G0, reentrando no ciclo celular, quando as condições ambientais se tornam favoráveis. Assim, quando as circunstâncias ambientais impedem a divisão celular, é nesta fase G0 que as células “repousam”, ou seja, não ocorre o seu crescimento (WALKER, 1998).

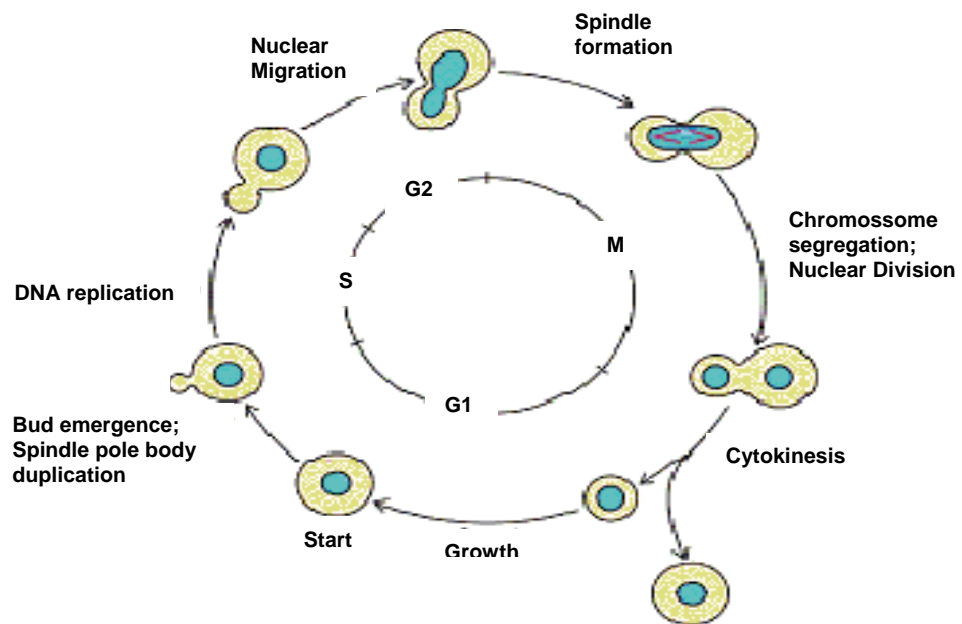


Figura 1: Ciclo celular de leveduras.

O número de brotos gerados por uma célula está entre 15 a 25, sendo que a longevidade de leveduras pode ser expressa de duas formas: idade replicativa e idade cronológica. A idade replicativa é caracterizada pelo número de gerações de uma célula, na fase exponencial, ao longo do seu tempo de vida. Já a idade cronológica é caracterizada pelo tempo que uma população de células permanece viável, após atingir a fase estacionária (JAZWINSKI, 2002; JAZWINSKI, 2004; POWERS, 2006). Algumas alterações morfológicas já foram observadas em células de leveduras ao longo do seu tempo de vida e, assim, caracterizam o seu envelhecimento. As células mais velhas apresentam-se com dimensões maiores do que as células mais jovens (JAZWINSKI, 2005). O número de cicatrizes, que são marcas deixadas na superfície celular a cada broto gerado, é aumentado. Em consequência disso, o conteúdo de quitina na parede celular também é aumentado (KELLER et al., 1971). À medida em que as células vão se tornando mais velhas, há o aumento do tempo para se completar o ciclo celular. Outras características relatadas em células com maior idade são: a presença de superfície celular enrugada e a presença de características morfológicas de apoptose (ZHANG, 2002; WINTER, 2004).

Apoptose é um programa de morte celular, associado ao envelhecimento, altamente coordenado e importante para os metazoários, que até quinze anos atrás não havia sido descrito para organismos unicelulares, como leveduras. Possui relevante importância para doenças neurodegenerativas, autoimunes e câncer, mas poucos detalhes da sua

regulação tem sido elucidados e, portanto, são pouco esclarecidos. Dessa forma, se faz conveniente o estudo em um modelo mais simples de organismo. Então, leveduras têm sido investigadas como organismos promissores para esses estudos, fornecendo um entendimento melhor da fisiologia e genética do processo de apoptose. Durante os últimos anos, cientistas tem identificado reguladores de apoptose em humanos, plantas e fungos filamentosos, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Descobertas de fenótipos apoptóticos, já em protistas, sugerem que a apoptose surgiu em organismos unicelulares durante a evolução (MADEO et al., 2002).

A proteína caspase 1 de leveduras (Yca1) tem sido descrita por estar envolvida no processo de apoptose em leveduras. Trata-se de uma cisteíno-protease de 52 kDa que possui homologia estrutural com caspases de mamíferos, demonstrando atividade enzimática no processamento de proteínas em leveduras. Yca1 auxilia no processo de morte celular programada em culturas replicativa e cronologicamente velhas, possuindo papel fisiológico na eliminação de células velhas em uma população de leveduras (MADEO et al., 2002).

MADEO e colaboradores (2004) relataram que existem vários fatores endógenos e exógenos que desencadeiam a cascata proteolítica mediada pela enzima caspase 1 de leveduras (Yca1). Esses fatores podem ser ativação de fatores pró-apoptóticos, tais como Bax, Dap3, Mec1; estresse oxidativo, causado por peróxido de hidrogênio ou ácido acético; choque térmico; a idade replicativa ou idade cronológica da célula; dentre outros. Tais fatores convergem, em uma via comum, para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ativam a caspase 1. As espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, são notadas por sua alta reatividade, podendo provocar danos às proteínas, lipídeos das membranas e DNA (MADEO et al., 1999). Assim, as características morfológicas de apoptose que são geradas, em consequência da ativação de Yca1 são: externalização da proteína fosfatidilserina na superfície celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (MADEO et al., 1997; LUDOVICO et al., 2001; LAUN et al., 2001; HERKER, et al., 2004).

Fatores fisiológicos que afetam a velocidade de crescimento, como o “status” nutricional da célula, podem influenciar a longevidade. Estudos realizados por WINTER (2004) demonstraram que leveduras sob baixas taxas

de crescimento, devido à menor disponibilidade de nutrientes, induzem o metabolismo respirativo. O metabolismo respirativo causa acúmulo de NAD^+ no interior celular, o que ativa a enzima Sir2 dependente de NAD^+ (histona desacetilase). A remoção de grupos acetil das histonas pela histona desacetilase, provoca aumento de regiões transcricionalmente inativas do DNA, sendo esse processo denominado silenciamento (GUARENTE, 2006). O aumento do silenciamento aumenta a estabilidade genômica, devido à formação reduzida de círculos de DNA ribossomal, produtos de recombinação homóloga que interrompem o processo de replicação do DNA, impedindo o prosseguimento do ciclo celular. Assim, a longevidade é prolongada (Figura 2).

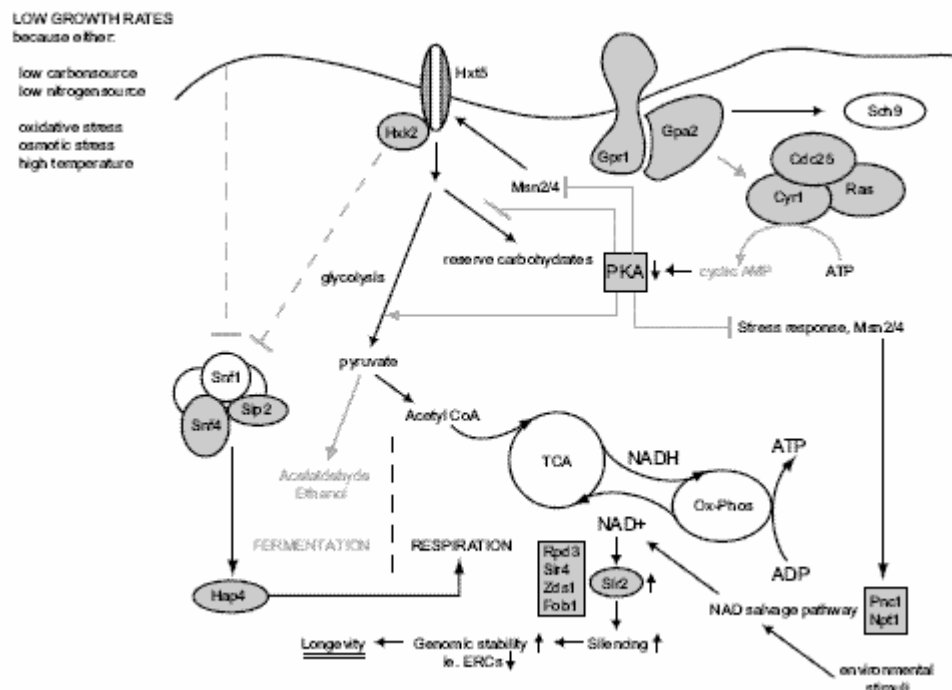


Figura 2: Longevidade de leveduras sob baixas taxas de crescimento.

Por outro lado, em altas taxas de crescimento impostas pela maior disponibilidade de nutrientes, o metabolismo fermentativo é induzido pelas leveduras. Assim, há menor acúmulo de NAD^+ no interior celular, o que reduz a atividade da enzima Sir2 dependente de NAD^+ . Dessa forma, há a redução do processo de silenciamento. Isso diminui a estabilidade genômica, devido à formação de círculos de DNA ribossomal, diminuindo, por sua vez, a longevidade (Figura 3) (BARROS et al., 2004).

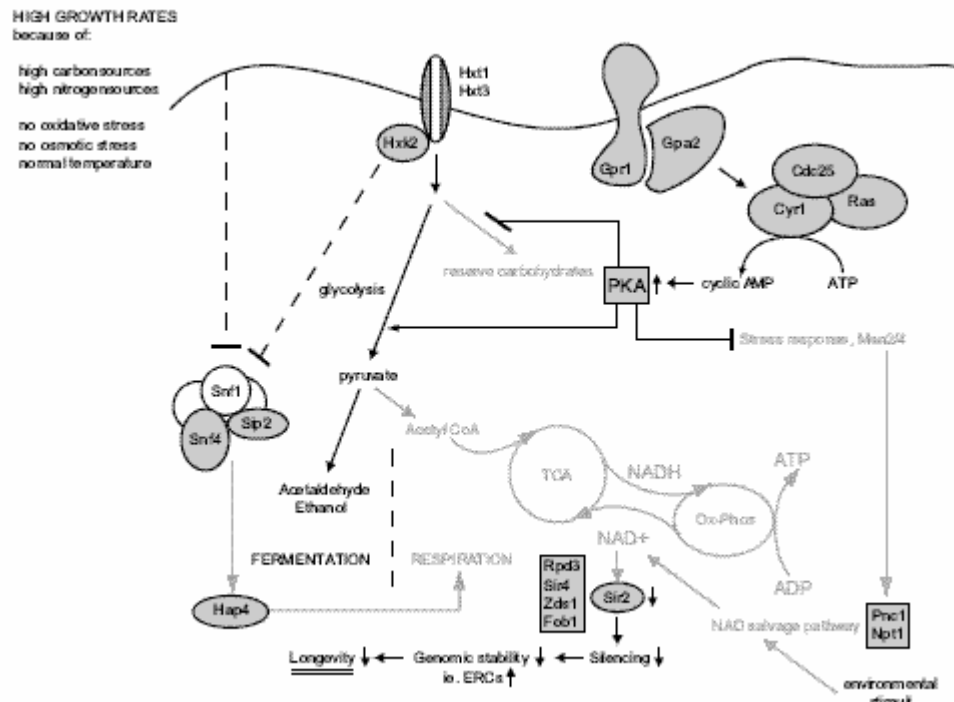


Figura 3: Longevidade de leveduras sob altas taxas de crescimento.

GUARENTE (2005) descreveu que a restrição calórica, por fonte de carbono, aumenta a longevidade de culturas de *Saccharomyces cerevisiae*. Quando as células foram cultivadas na presença de 0,5 % e 2,0 % de glicose, as células apresentaram maior longevidade em 0,5 % de glicose. Porém, ainda não está bem esclarecido como a limitação por nitrogênio poderia afetar a longevidade de leveduras, conforme mencionado por WINTER (2004).

A amônia é considerada a fonte de nitrogênio preferida por *S. cerevisiae*, mas muitas cepas utilizando glutamina alcançam igualmente altas velocidades de crescimento (DICKINSON & SCHWEIZER, 2004). A entrada de amônia na célula é facilitada por três permeases, produtos dos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3* (MAGASANIK & KAISER, 2002), Mep1p é considerada uma permease de afinidade média a íons amônio, Mep3p de menor afinidade, mas com alta capacidade de transporte, e Mep2p é considerada uma permease de alta afinidade, podendo agir como sensor de íons amônio que gera sinais para a indução do crescimento diplóide pseudohifal em fontes de amônia limitante (FORSBERG & LJUNGDHAL, 2001).

Uma vez dentro da célula, a amônia reage com α -cetoglutarato, intermediário do metabolismo de carbono, produzindo glutamato. Este glutamato pode ser convertido em glutamina pela incorporação de um íon

amônio. Do total de nitrogênio celular, 85% é originário do nitrogênio da amina do glutamato e 15% do grupamento amida da glutamina (COOPER, 1982; MAGASANIK & KAISER, 2002).

Em condições nutricionalmente restritivas, a célula inicia um programa de manutenção e entra em um estado não-proliferativo (WERNER-WASHBURNE et al., 1993; WERNER-WASHBURNE et al., 1996), com objetivo final de sobreviver ao período de restrição (WINDERICKX et al., 2003). Situações de estresses influenciam diretamente a expressão, tradução, translocação, processamento e enovelamento no retículo endoplasmático e Golgi, secreção de proteínas como também a reciclagem protéica por proteólise (MATTANOVICH et al., 2004).

Existe o interesse em cultivar *K. lactis* em soro de queijo ultrafiltrado. O permeado resultante da ultrafiltração possui menor concentração de nitrogênio. Alguns esforços já foram realizados, na tentativa de identificar o fator limitante do soro de queijo ultrafiltrado. A sugestão é que nitrogênio seja esse fator (CAMPOS, 2001). Assim, há o interesse em saber como o estresse por nitrogênio pode afetar a cinética de crescimento e a longevidade de *Kluyveromyces lactis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Microrganismo e condições de cultivo

A levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2359, uma linhagem selvagem da coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, foi utilizada neste trabalho. A cultura foi estocada em meio YCB, sem fonte de nitrogênio (Yeast Carbon Base, Laboratórios Difco[®], Detroit, EUA), contendo 50 % de glicerol, a - 80 °C. Antes de ser usada como inóculo, a cultura foi ativada em 50 mL de YCB, acrescido de 0,5 % de sulfato de amônio, e incubada a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 horas.

3.2. Concentrações de Sulfato de Amônio – Fonte de nitrogênio

Para estabelecer a condição de estresse por nitrogênio, as culturas de *Kluyveromyces lactis* previamente ativadas foram inoculadas em YCB nas seguintes concentrações de sulfato de amônio, o qual foi utilizado como fonte de nitrogênio: 0 (controle); 0,02; 0,06; 0,08; 0,15; 0,23; 0,30; 0,38; 0,45; 0,57; 0,95; 1,90; 3,80; 7,6; 19,0; 38,0 mmol.L⁻¹.

3.3. Cultivo em batelada

Culturas de *K. lactis* foram cultivadas em regime de batelada em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo um volume final de 50 mL de meio de cultura (YCB, tamponado com tampão fosfato de potássio, pH 5,5), nas diferentes concentrações de sulfato de amônio citadas no item 3.2. As culturas

foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. A absorvância inicial a 600nm (A_{600}) foi de 0,1 para todas as culturas. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de uma hora até 10 horas de crescimento, com a intenção de obter pelo menos 5 pontos na fase exponencial de crescimento. Uma medida adicional foi retirada com 24 horas de cultivo. Tais amostras foram lidas em espectrofotômetro em absorvância de 600 nm, a fim de acompanhar o crescimento populacional da levedura. As amostras foram diluídas quando a densidade óptica ultrapassou o valor de 0,6.

3.4. Cinética de crescimento em função da concentração de sulfato de amônio

As curvas de cinética de crescimento foram obtidas a partir dos dados do crescimento populacional, nas diferentes concentrações de sulfato de amônio. Os gráficos foram construídos, convertendo-se os valores de densidade óptica em valores logarítmicos neperianos. A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada como o coeficiente angular do melhor ajuste da regressão linear dos dados da fase de crescimento exponencial das culturas.

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

Os parâmetros cinéticos $\mu_{\text{máx}}$ e K_s foram determinados, utilizando o programa Sigma Plot versão 10.0 e os dados obtidos da velocidade específica de crescimento de *K. lactis* para cada concentração de sulfato de amônio, foram ajustados ao modelo cinético descrito por MONOD (1949).

3.6. Cultivo Contínuo

Para verificar se a velocidade de crescimento está associada ao envelhecimento de células de *K. lactis*, foi realizado um experimento em cultura contínua, em fermentador frasco jaquetado Wheaton, ligado por conexões a dois recipientes, sendo um de entrada de meio YCB, tamponado com tampão fosfato de potássio, pH 5,5, acrescido de 0,5 % de sulfato de amônio e outro de saída da cultura. O fermentador, continha um volume de trabalho de 200 mL. A cultura foi homogeneizada e aerada por agitação magnética, mantida a 30 °C. As velocidades de crescimento às quais as culturas foram conduzidas foram $0,01 \text{ h}^{-1}$, $0,06 \text{ h}^{-1}$, $0,18 \text{ h}^{-1}$ e $0,35 \text{ h}^{-1}$. As culturas contínuas foram operadas por

oito a dez gerações, para estabelecer o regime permanente, e então foram coletadas amostras em triplicata, representativas de cada condição, durante 24 horas, para análises de biomassa, metabólitos, pH, tempo de residência e observações microscópicas.

3.7. Análise de substrato e produtos do metabolismo

O consumo da glicose, na cultura contínua, nas quatro velocidades específicas de crescimento, foi avaliada pela medida da concentração do açúcar remanescente. Produtos do metabolismo, como etanol e glicerol foram também analisados nas mesmas amostras. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta “performance” (HPLC), em cromatógrafo modelo Hewlett Packard, série 1050, com detector modelo Hewlett Packard HP 1047A e utilizando a coluna modelo HPX-87H Bio Rad (tamanho da partícula = 8 μm e dimensões de 300 X 7,8 mm). O eluente foi H_2SO_4 0,005 M com fluxo típico de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura de operação foi 60 $^\circ\text{C}$ e a pressão máxima, de 95 bar. As concentrações de glicose e metabólitos foram medidas, mediante a comparação delas com as dos padrões externos preparados nas concentrações de 9,99 mM a 20 mM.

3.8. Efeito da idade de culturas de *Kluyveromyces lactis* na velocidade de crescimento

Para verificar a variação da velocidade específica inicial de crescimento (μ) em função da idade da cultura, foi realizado um experimento em batelada com renovação do meio de cultura, a cada 24 horas, durante 16 dias. Foi utilizado o meio YCB, tamponado com tampão fosfato de potássio, pH 5,5 e as seguintes concentrações de sulfato de amônio: 0; 0,08; 0,57; 3,80; 7,60; 38,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cada cultura (50 mL), em fase log, no meio YCB com sulfato de amônio, foi diariamente centrifugada, após 24 horas, a 6000 rpm, por 10 minutos e metade da massa celular transferida para 50 mL de meio novo, durante 16 dias. A velocidade específica de crescimento inicial (μ), de cada cultura, foi determinada após cada transferência, como o coeficiente angular a partir da regressão linear da relação $\text{LN } A_{600\text{nm}} \times \text{tempo (h)}$. O crescimento da massa celular de *K. lactis* foi verificado pela leitura da absorvância a 600 nm, de amostras de 1 mL que foram retiradas por 6 a 10 horas, durante a fase exponencial de crescimento, para obter no mínimo 5 pontos, e uma medida

adicional retirada com 24 horas de cultivo, para registrar a absorvância 600 nm máxima. As amostras foram diluídas quando a densidade óptica ultrapassou o valor de 0,6. Amostras de 1 mL, em duplicata, também foram retiradas durante a fase exponencial de crescimento das culturas e diariamente, após 24 horas, para análises morfológicas posteriores.

3.9. Determinação de quitina na parede celular de *Kluyveromyces lactis*

Para determinar a presença e a concentração de quitina na parede celular de *K. lactis*, foram utilizadas a técnica de coloração calcoflúor, descrita por STREIBLOVÁ (1984) e a técnica de quantificação de quitina, por isolamento da parede celular e determinação espectrofotométrica de N-acetilglicosamina, descrita por KUMAR & HANSEN (1972) e POPOLO (1997).

3.9.1. Coloração Calcoflúor

Para observar a presença de quitina na parede celular das células de *K. lactis*, foi utilizada a coloração com o corante fluorescente Calcoflúor White. As amostras coletadas do cultivo contínuo (item 3.6) e do cultivo em batelada (item 3.8) foram analisadas.

A suspensão das células de *K. lactis* (5 μ L) foi misturada com 20 μ L de solução do corante Calcoflúor White a 0,1-0,5 μ g.mL⁻¹. Após 5 minutos, as lâminas microscópicas foram preparadas, utilizando 5 μ L da suspensão de células em solução de calcoflúor, e observadas em microscópio de fluorescência.

3.9.2. Concentração de quitina

Para determinar a quitina presente na parede celular das células de *K. lactis* foi realizado o isolamento da parede celular e a determinação espectrofotométrica de N-acetilglicosamina da quitina. As amostras coletadas do cultivo contínuo (item 3.6) e do cultivo em batelada (item 3.8) foram analisadas.

Para o isolamento da parede celular, 0,5 mL da suspensão de células (10⁶ células) foi lavada duas vezes com 0,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) e as células rompidas com 0,2 g de partículas de vidro de 0,5 mm. A parede celular das células foi coletadas por centrifugação a 5000 rpm, durante

5 minutos, e lavada cinco vezes com 1 mL do mesmo tampão, Tris-HCl, três vezes com 1 mL de NaCl 1 % e novamente com 0,5 mL de tampão Tris-HCl.

Para determinar o conteúdo de quitina na parede celular, a suspensão de parede celular previamente obtida foi tratada com 0,1 mL de zimoliase 100T (0,1 mg. mL⁻¹ em tampão Tris-HCl, pH 7,4), por 1 hora a 37 °C. A suspensão de parede celular tratada com zimoliase foi hidrolisada com 0,5 mL de HCl 4 M, por 10 horas a 100 °C e, em seguida, foi ressuspensa em 1 mL de água destilada. O conteúdo de quitina em termos de N-acetilglicosamina nos hidrolisados foi determinado utilizando o reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído). Assim, 0,2 mL da suspensão de parede celular hidrolisada foi adicionada de 0,1 mL de tampão borato (pH 9,1) e essa mistura foi aquecida a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, essa mistura foi resfriada em banho de gelo (4 °C) por 5 minutos e foi adicionada de 0,25 mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído 4 % (diluído em clorofórmio) e 0,45 mL de ácido fórmico. Os tubos contendo essa mistura foram homogeneizados por 1 minuto e, então, incubados a 37 °C por 20 minutos. Ao término desse tempo, a mistura foi resfriada em banho de gelo (2-4 °C), por 10 minutos e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. A absorvância do sobrenadante obtido foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. Assim, N-acetilglicosamina foi quantificada, convertendo-se a absorvância a 545 nm em µg.mL⁻¹ de N-acetilglicosamina, por meio de uma curva padrão utilizando solução aquosa contendo 0-100 µg de N-acetilglicosamina por mililitro.

3.10. Determinação das dimensões celulares de *Kluyveromyces lactis* em função da idade

Para estimar o tamanho das células de *K. lactis* em função da idade das culturas, foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5. As amostras coletadas do cultivo contínuo em diferentes velocidades de crescimento (item 3.6) e do cultivo em batelada em diferentes idades (item 3.8) foram analisadas com 25 medições pra cada amostra.

3.11. Observação de características morfológicas de morte celular programada em culturas de *Kluyveromyces lactis* sob estresse por nitrogênio e avançada idade

Para observar a possível ocorrência de morte celular programada em culturas de *K. lactis*, sob estresse por nitrogênio e avançada idade, foram utilizadas as técnicas de coloração Hoechst 33348, descrita por O'CONNOR (1989) e coloração DAPI, descrita por MADEO (1997).

3.11.1. Coloração Hoechst 33348

Para a observação morfológica de apoptose em células de *K. lactis* foi utilizada a coloração Hoechst 33348. As amostras coletadas do cultivo contínuo (item 3.6) e do cultivo em batelada (item 3.8) foram suspensas em YCB acrescido de 0,5 % de sulfato de amônio. Em seguida, foram feitos esfregaços das suspensões de célula, os quais foram secos à temperatura ambiente. Depois de secas as preparações, as lâminas foram embebidas em etanol 70 % gelado, por 5 minutos, para que ocorresse a fixação das células. Em seguida, o procedimento de coloração das células foi realizado, utilizando 5 µL de solução de coloração de cromatina (Hoechst 33348 – bisbenzimidaz 1 mg.mL⁻¹ em DMSO) e 5 µL de solução de iodeto de propídio – 1 mg.mL⁻¹ em PBS. Após 5 minutos, as lâminas foram lavadas com PBS e então foram observadas por microscopia de fluorescência, usando radiação UV.

3.11.2. Coloração DAPI

Para a observação da condensação da cromatina e fragmentação do DNA das células de *K. lactis* sob estresse por nitrogênio nas mesmas amostras coletadas para a coloração com Hoechst 33348, foi realizada a coloração com DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol). A suspensão de células de *K. lactis* foi misturada com 3 volumes de etanol 70 %. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 20 µL de solução de DAPI 0,1-0,5 µg.mL⁻¹. As lâminas foram montadas, utilizando 5 µL da suspensão de células em solução de DAPI, e observadas em microscópio de fluorescência.

3.12. Microscopia de Fluorescência

As lâminas montadas nos itens 3.10.1, 3.12.1 e 3.12.2 foram observadas em microscópio Nikon E600 com acessórios para epifluorescência Y-FL, utilizando uma faixa de comprimento de onda de excitação de 450-520 nm e aumento de 400 vezes. As imagens foram capturadas com uma câmera digital FUJIX HC-300Z e processadas com os programas Photograb e Eztouch

(Fujifilm), no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (Bioagro).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cinética de crescimento de *Kluyveromyces lactis* em função da concentração de sulfato de amônio

A cinética de crescimento de *Kluyveromyces lactis* em função da concentração de sulfato de amônio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$), como fonte de nitrogênio, está apresentada na Figura 4. Em meio YCB (meio base de carbono utilizado para testar a assimilação de fontes de nitrogênio em leveduras) acrescido de sulfato de amônio, em concentrações de 0 a 38,0 mmol.L⁻¹, *K. lactis* mostrou velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de 0,44 h⁻¹ e constante de saturação (K_s) de 0,15 mmol.L⁻¹ para sulfato de amônio.

Cada ponto da Figura 4A representa o coeficiente angular da relação LN $A_{600\text{nm}}$ versus Tempo (h) apresentada na Figura 4B, para cada concentração de sulfato de amônio utilizada. A velocidade específica de crescimento de *K. lactis* aumentou em função da concentração de sulfato de amônio, obedecendo ao modelo cinético proposto por Monod, com uma correlação de 0,985.

Em geral, os valores de K_s descritos para procariotos são muito baixos, na ordem de 0,002 mmol.L⁻¹ a 0,02 mmol.L⁻¹ para açúcares, como fontes de carbono, e 2×10^{-6} mmol.L⁻¹ para aminoácidos, como fontes de nitrogênio. A constante K_s reflete a afinidade da célula microbiana pelo substrato (DAWES, 1992). Para leveduras, os valores de K_s são maiores, sendo 0,11 mmol.L⁻¹ para glicose (WALKER, 1998). Para fontes de nitrogênio, valores de K_s em leveduras, não tem sido até então descritos. As referências sobre a constante associada à afinidade de transportadores (K_t) de íons amônio estão na ordem de 0,2 mmol.L⁻¹ (WALKER, 1998). O valor de K_s determinado, 0,15 mmol.L⁻¹ para sulfato de amônio (0,075 mmol.L⁻¹ para nitrogênio) indica uma

concentração de sulfato de amônio, para saturação do sistema de assimilação deste substrato na levedura *K. lactis*, que reflete o valor de K_t mencionado.

A dificuldade em estabelecer concentrações limitantes de nitrogênio, devido aos baixos valores de K_s , pode comprometer a investigação sobre estresse por nitrogênio. Entretanto, o número de medidas tomadas (Figura 4) e o valor da correlação do modelo sustentam a confiabilidade dos parâmetros cinéticos determinados. Esses resultados permitem identificar as condições de estresse por nitrogênio.

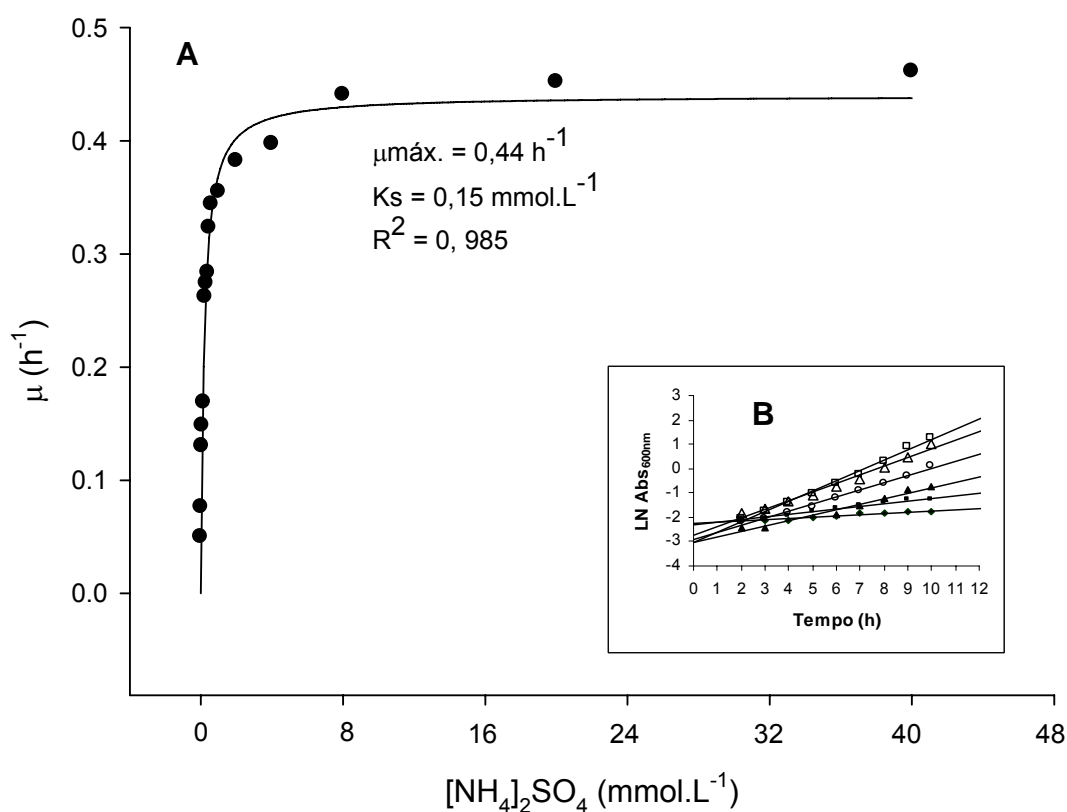


Figura 4: Cinética de crescimento de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$) em meio YCB, ajustada conforme o modelo de Monod: $\mu = \mu_{\text{máx.}} \cdot S / (K_s + S)$ (A). Cada ponto representa o coeficiente angular da relação LN $A_{600\text{nm}}$ versus Tempo (h) (B). (\blacklozenge) 0 mmol.L^{-1} ; (\blacksquare) $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$; (\blacktriangle) $0,38 \text{ mmol.L}^{-1}$; (\circ) $0,95 \text{ mmol.L}^{-1}$; (\triangle) $3,80 \text{ mmol.L}^{-1}$; (\square) $38,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$.

4.2. Efeito da idade de culturas de *Kluyveromyces lactis* na velocidade específica inicial de crescimento

Para avaliar o efeito da idade de culturas de *Kluyveromyces lactis* na cinética de crescimento, a variação da velocidade específica inicial de crescimento em função da idade foi observada. Para conduzir essa avaliação, metade da massa celular da cultura foi transferida, a cada 24 horas, durante 16 dias, para meio YCB novo e a velocidade específica de crescimento inicial determinada, como sendo o coeficiente angular da relação $\ln A_{600nm} \times \text{Tempo (h)}$.

A Figura 5 mostra a variação da velocidade específica de crescimento e a variação da DO inicial da população de células em função da idade da cultura de *K. lactis*, cultivada em meio YCB com diferentes concentrações de sulfato de amônio (Figura 5A - F).

Na ausência e em concentrações muito baixas de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (0 mmol.L^{-1} e $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$), representadas nas Figuras 5A e 5B, respectivamente, a cultura de *K. lactis* não exibiu crescimento aparente, com uma velocidade de crescimento média de aproximadamente $0,06 \text{ h}^{-1}$, que não variou com a idade da cultura.

Quando *K. lactis* foi cultivada em YCB acrescido de $0,57 \text{ mmol.L}^{-1}$, $3,80 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $7,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (Figuras 5C, 5D e 5E, respectivamente) observou-se um perfil semelhante de variação da velocidade de crescimento em função da idade da cultura. Nota-se que as culturas tiveram uma redução de cerca de 50 % na velocidade de crescimento inicial do 1º até o 4º dia. Do 4º dia para o 5º, a velocidade de crescimento reduziu para $0,1 \text{ h}^{-1}$ e a partir desse dia, a cultura não apresentou crescimento aparente.

Porém, observou-se que quando *K. lactis* foi cultivada em meio YCB acrescido de $38,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (Figura 5F), a velocidade específica de crescimento variou de $0,4 \text{ h}^{-1}$ para $0,3 \text{ h}^{-1}$ até o 4º dia. Nota-se que essa variação na velocidade específica de crescimento, durante esses quatro primeiros dias, foi menor se comparada ao cultivo de *K. lactis* em meio YCB, acrescido de $0,57 \text{ mmol.L}^{-1}$, $3,80 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $7,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (Figuras 5C - E). Esse fato pode ser explicado pela maior concentração de sulfato de amônio no meio, que favoreceu a divisão celular. Do 4º para o 5º dia,

a velocidade de crescimento diminuiu para $0,2 \text{ h}^{-1}$. A partir desse dia, a velocidade de crescimento da cultura reduziu até atingir a velocidade de $0,1 \text{ h}^{-1}$ no 8º dia e então, a cultura não apresentou mais crescimento aparente.

Exceto nas culturas de *K. lactis* cultivadas em meio YCB acrescido de 0 mmol.L^{-1} e $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, onde não foi observada variação da velocidade específica de crescimento, devido à própria limitação nutricional por nitrogênio, que afetou o crescimento das células, e na cultura cultivada em meio YCB acrescido de $38,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (Figura 5F), os demais resultados comprovam que a redução da velocidade de crescimento de *K. lactis* foi devido à idade das culturas e não à carência de nitrogênio no meio ou à alta densidade populacional. Esses resultados se baseiam no fato de que a transferência de metade da massa celular, a cada dia, para meio de cultura novo, garantiu que a redução nas velocidades de crescimento fosse devido ao envelhecimento das células. Tal fato evidencia que a estratégia experimental utilizada caracterizou bem as condições fisiológicas propostas. Entretanto, a cultura de células analisadas contava com concentrações de células de várias idades, mesmo que gradativamente aumentava-se a concentração de células mais velhas com os dias de repicagem. Para estudar uma condição fisiológica de envelhecimento, uma alternativa seria uma cultura contínua, em quimiostato, sob limitação por nitrogênio, em velocidades de crescimento próprias de células com mais idade.

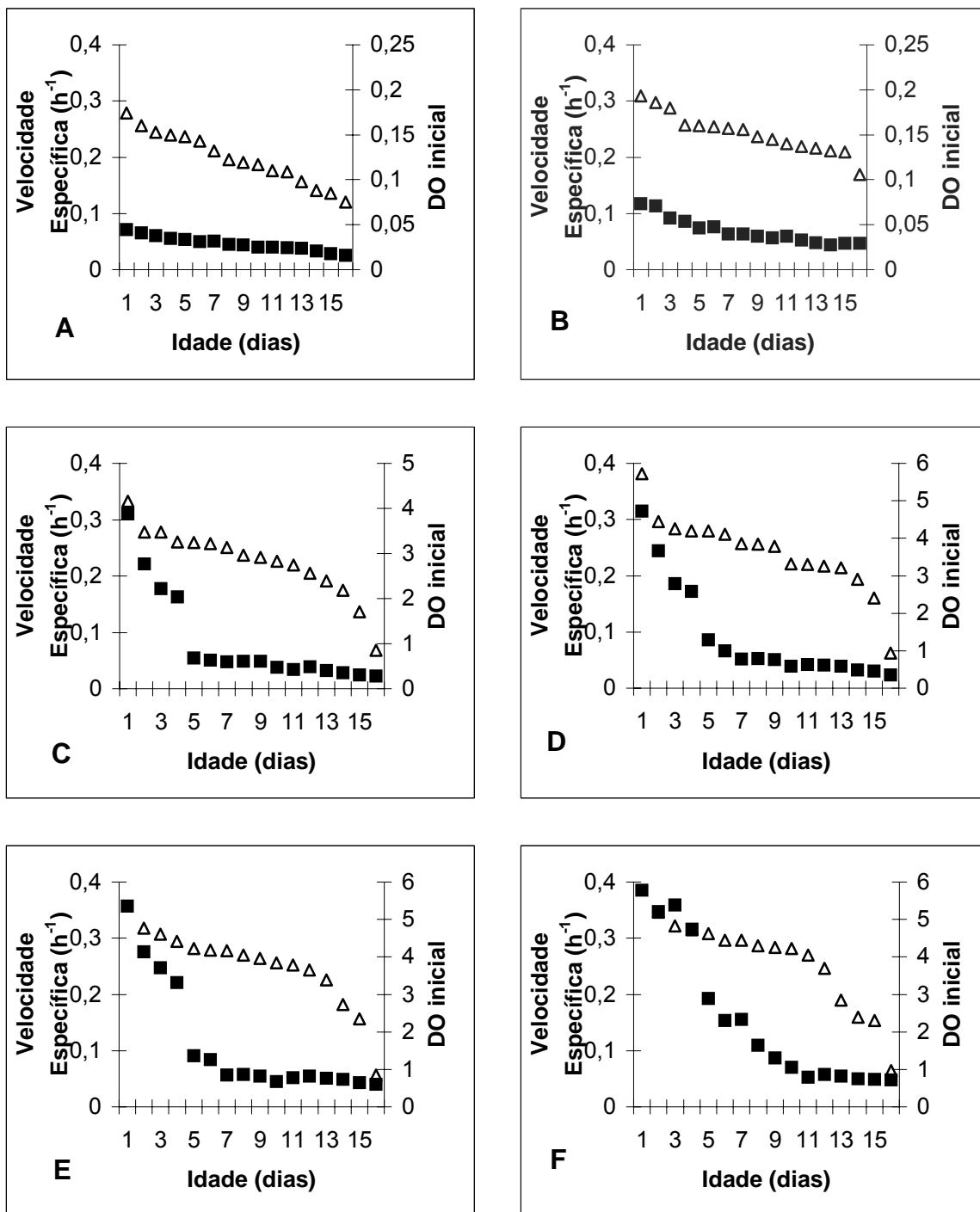


Figura 5: Velocidade específica de crescimento inicial (■) e DO inicial (Δ) em função da idade da cultura. Uma cultura (50 mL), em fase log, no meio YCB com sulfato de amônio, foi a cada 24 horas (durante 16 dias) centrifugada e metade da massa celular transferida para 50 mL de meio novo. A velocidade específica de crescimento inicial é o coeficiente angular da relação $\text{LN } A_{600\text{nm}} \times \text{Tempo (h)}$. (A) 0 mmol.L⁻¹; (B) 0,08 mmol.L⁻¹; (C) 0,57 mmol.L⁻¹; (D) 3,80 mmol.L⁻¹; (E) 7,60 mmol.L⁻¹; (F) 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄.

Células de leveduras que possuem maior idade apresentam alterações típicas na sua estrutura e morfologia, tais como aumento do conteúdo de quitina na parede celular, aumento das dimensões celulares, presença de características morfológicas de apoptose, dentre outras (JAZWINSKI, 2005). Dessa forma, foi avaliada a possível ocorrência de tais mudanças morfológicas nas células de *K. lactis*, nas condições já descritas, uma vez que foi constatada a redução na velocidade de crescimento da levedura em função da idade.

A Figura 6 mostra a presença de quitina na parede celular de *K. lactis*, cultivada em meio YCB, em função da idade. A emissão da fluorescência azul, obtida pela coloração com calcoflúor, indica a presença de quitina na parede celular de *K. lactis* cultivada em meio YCB acrescido de 0 mmol.L⁻¹, 0,08 mmol.L⁻¹, 0,57 mmol.L⁻¹, 3,80 mmol.L⁻¹, 7,60 mmol.L⁻¹ e 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄ e nos dias 0, 5, 10, 15 (Figuras 6A-F). Na Figura 6, apenas as células cultivadas por 5 dias estão representadas, uma vez que não foram observadas diferenças na intensidade da fluorescência das células, nos demais dias analisados. Verificou-se que não foi possível diferenciar a menor ou maior intensidade de fluorescência das células, nas condições avaliadas.

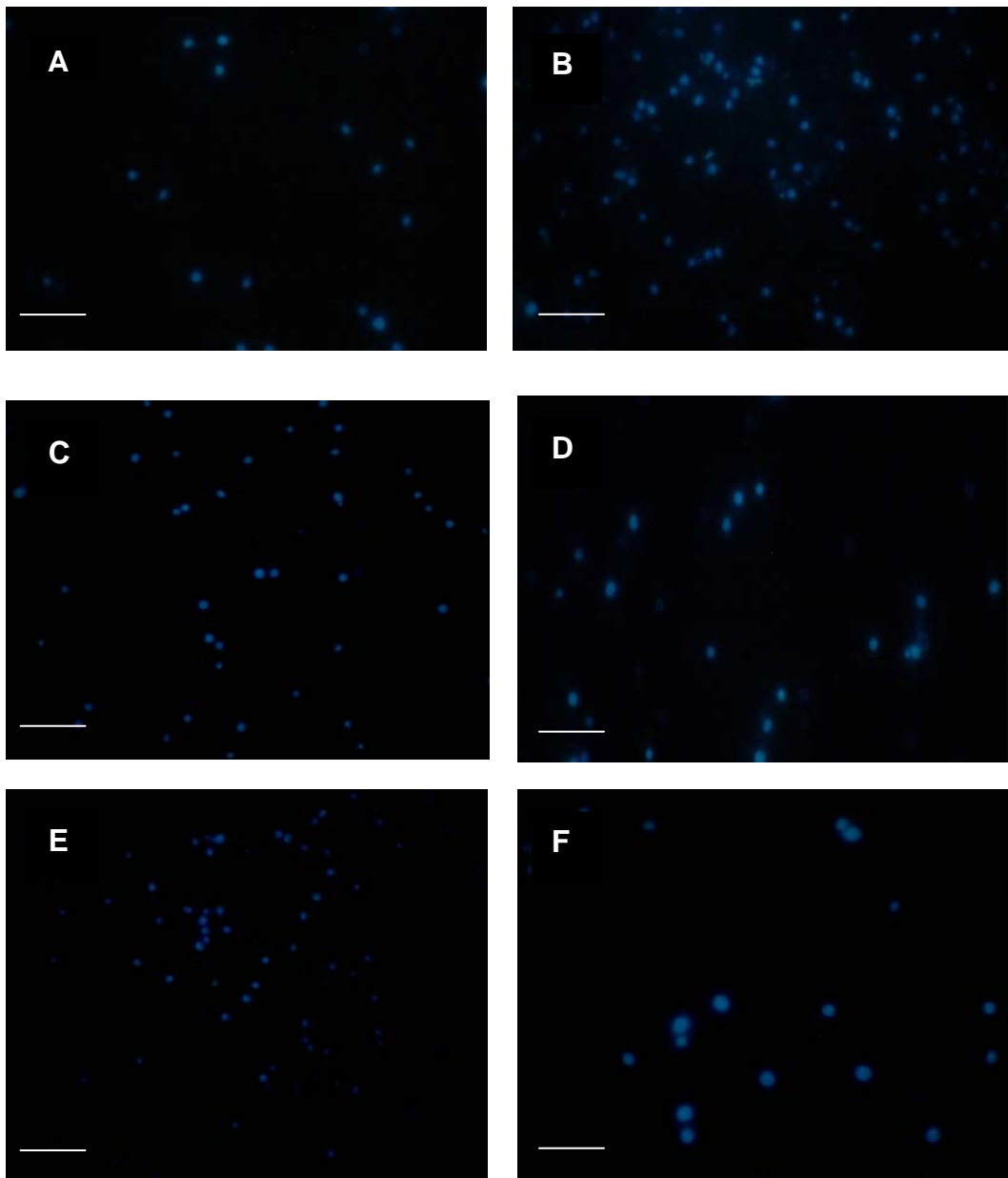


Figura 6: Presença de quitina na parede celular de *K. lactis*, cultivada em meio YCB, acrescido de sulfato de amônio, em função da idade. (A) 0 mmol.L⁻¹; (B) 0,08 mmol.L⁻¹; (C) 0,57 mmol.L⁻¹; (D) 3,80 mmol.L⁻¹; (E) 7,60 mmol.L⁻¹; (F) 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄. Barras = 5 μm.

Como a verificação da presença de quitina por coloração com calcoflúor é uma técnica qualitativa, a determinação quantitativa de quitina foi realizada. O conteúdo de quitina na parede celular pode ser quantificado pela determinação espectrofotométrica de N-acetilglicosamina, uma vez que quitina é um polímero de N-acetilglicosamina. N-acetilglicosamina sob calor e solução alcalina é convertida em compostos heterocíclicos que reagem com *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DMAB), produzindo uma coloração rosa (KUMAR & HANSEN, 1972). A intensidade dessa cor é proporcional à concentração de N-acetilglicosamina e pode ser determinada por espectrofotometria, por se tratar de um método colorimétrico. A Figura 7 apresenta a concentração de N-acetilglicosamina na parede celular de *K. lactis* em função da idade, nos dias 0, 5, 10 e 15, nas concentrações de sulfato de amônio: 0 mmol.L⁻¹; 0,08 mmol.L⁻¹; 0,57 mmol.L⁻¹; 3,80 mmol.L⁻¹; 7,60 mmol.L⁻¹ e 38,0 mmol.L⁻¹ em meio YCB. Nas concentrações de 0 mmol.L⁻¹ e 0,08 mmol.L⁻¹ (Figura 7A e 7B), foi determinada baixa concentração de N-acetilglicosamina em todos os dias analisados, quando esses dados foram comparados com o cultivo de *K. lactis* nas demais concentrações de sulfato de amônio, nos respectivos dias. Observou-se que com o tempo e com o aumento da concentração de [NH₄]₂SO₄ no meio (Figuras 7C-E), a concentração de N-acetilglicosamina aumentou.

Ao longo do tempo de vida das leveduras, o número de cicatrizes que são deixadas na superfície das células, a cada ciclo celular, é aumentado em decorrência da formação dos brotos (KELLER et al., 1971). Dessa forma, o conteúdo de quitina na parede celular aumenta proporcionalmente, o que explica os resultados obtidos, demonstrando que células mais velhas apresentam maior conteúdo de N-acetilglicosamina.

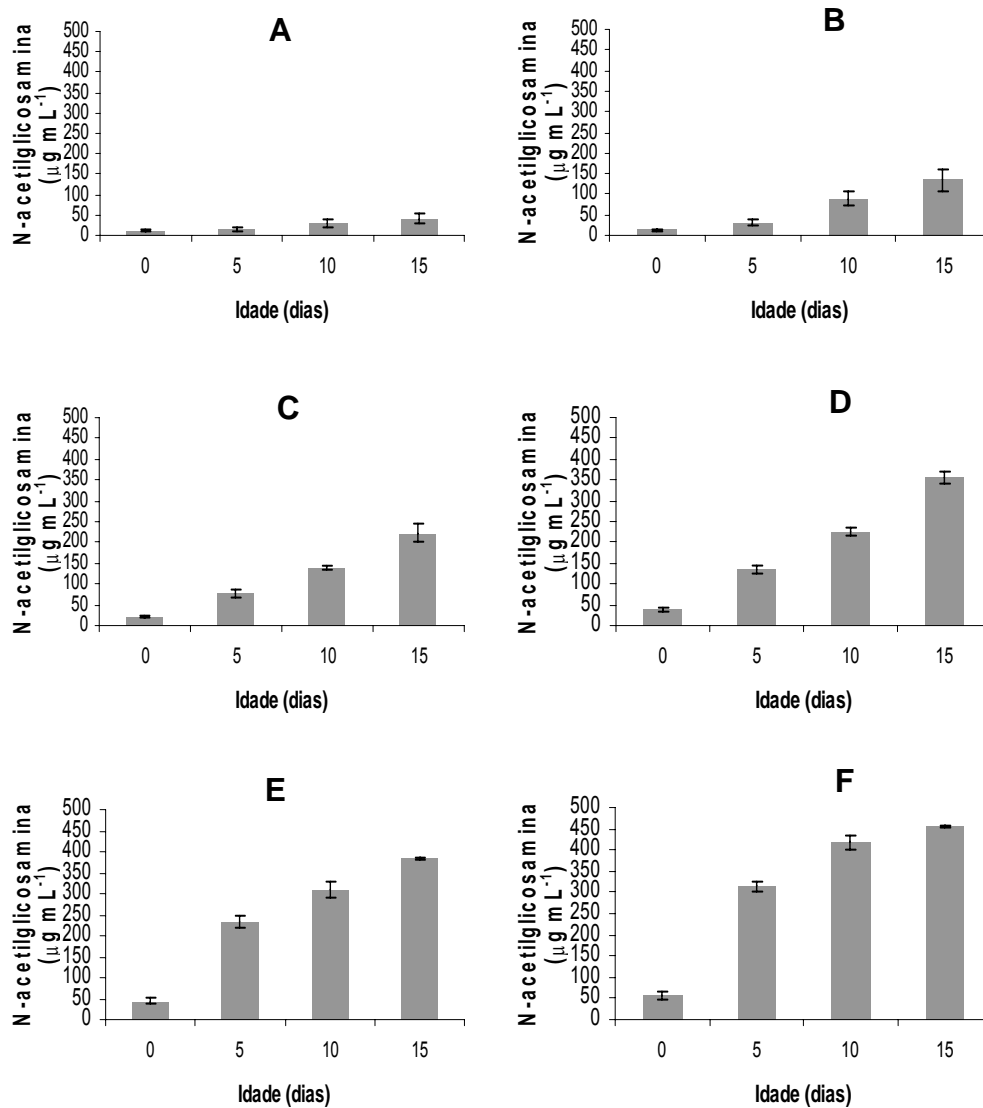


Figura 7: Concentração de N-acetilglicosamina na parede celular de *K. lactis* em função da idade (em dias), em diferentes concentrações de sulfato de amônio em meio YCB. (A) 0 mmol.L^{-1} ; (B) 0,08 mmol.L^{-1} ; (C) 0,57 mmol.L^{-1} ; (D) 3,80 mmol.L^{-1} ; (E) 7,60 mmol.L^{-1} ; (F) 38,0 mmol.L^{-1} de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão da média de três repetições.

Para avaliar se as dimensões celulares de *K. lactis* foram alteradas nas referidas condições, o tamanho das células foi medido. A Tabela 1 mostra que com a idade, em dias, as dimensões celulares de *K. lactis* aumentaram com a idade independente da concentração de sulfato de amônio. Segundo JAZWINSKI (2005), células mais velhas apresentam dimensões maiores do que células mais jovens, o que confirma os resultados apresentados.

Para detectar a presença de características morfológicas de apoptose nas células nas mesmas condições analisadas para as outras alterações morfológicas, foram realizadas as colorações de DAPI e HOECHST, que são colorações específicas para DNA. A Figura 8 mostra a fragmentação da cromatina em células de *K. lactis* com maior idade. Essa característica só foi verificada para culturas com maior idade, a partir do quinto dia de repicagem nas concentrações de 0,57 mmol.L⁻¹, 3,80 mmol.L⁻¹ e 7,60 mmol.L⁻¹; e a partir do oitavo dia de repicagem na concentração de 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄. LAUN e colaboradores (2001), trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, também observaram características morfológicas de apoptose, tais como fragmentação da cromatina e exposição da proteína fosfatidilserina, em células mais velhas da referida levedura, sob estresse oxidativo. No entanto, a observação dessas mesmas características morfológicas de apoptose em células de leveduras, sob limitação por nitrogênio, ainda não foi relatada na literatura.

Tabela 1: Dimensões de células de *K. lactis* em função da idade (dias) em YCB. Os resultados representam as médias aritméticas \pm o desvio padrão de 3 repetições.

		Dimensões (μm)					
[] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		0	0.08	0.57	3.8	7.6	38
Idade (dias)	0	2.46 \pm 0,045	2.51 \pm 0,075	2.55 \pm 0,027	2.58 \pm 0,022	2.49 \pm 0,037	2.63 \pm 0,036
	5	3.05 \pm 0,039	3.21 \pm 0,043	3.33 \pm 0,025	3.58 \pm 0,015	3.42 \pm 0,045	3.57 \pm 0,012
	10	3.24 \pm 0,012	3.53 \pm 0,039	3.6 \pm 0,037	3.71 \pm 0,028	3.32 \pm 0,031	3.49 \pm 0,057
	15	4.06 \pm 0,024	4.16 \pm 0,054	4.27 \pm 0,031	4.11 \pm 0,035	4.05 \pm 0,052	4.42 \pm 0,024

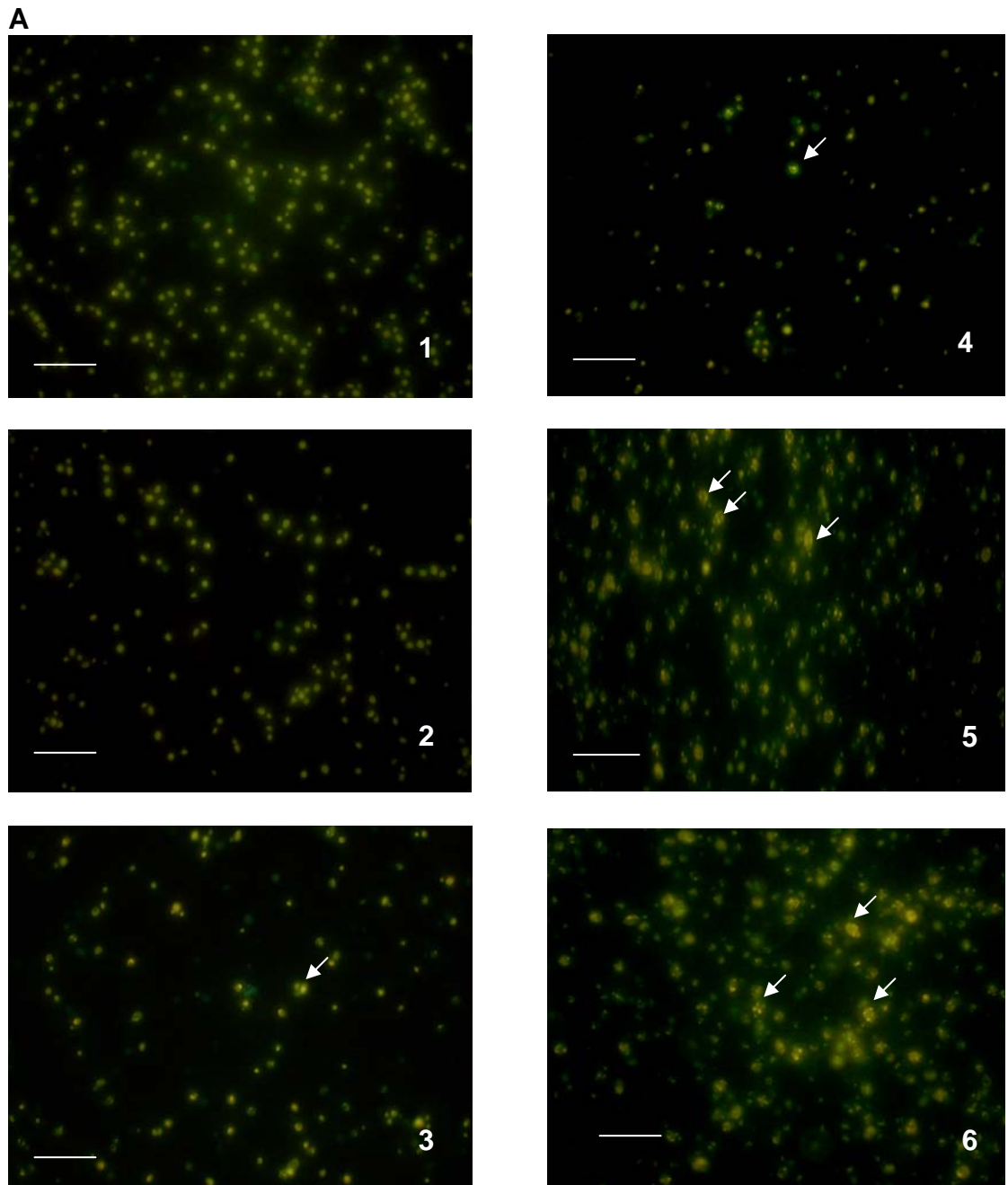
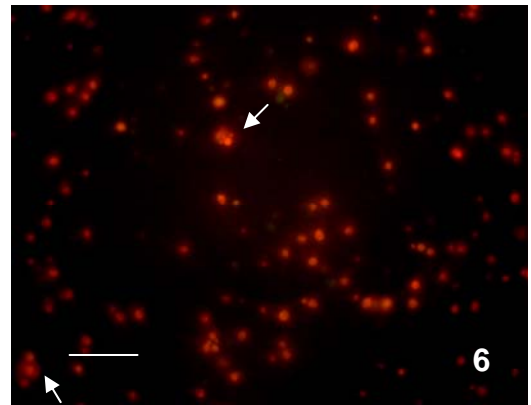
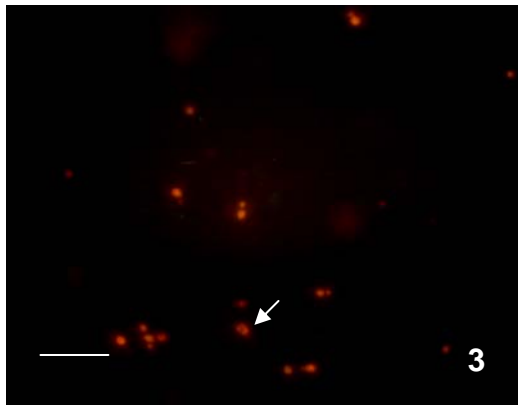
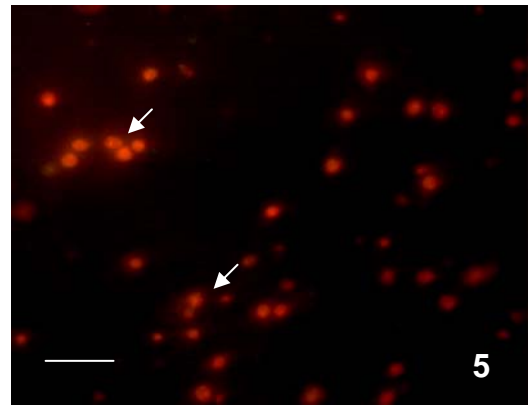
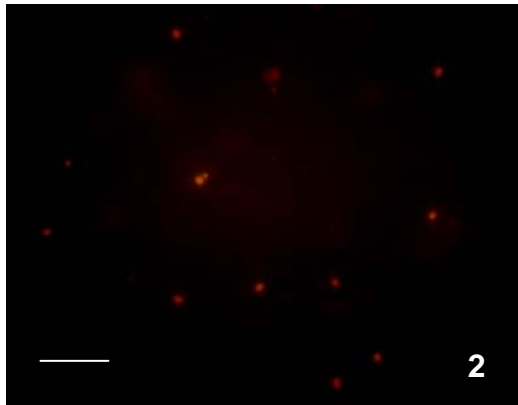
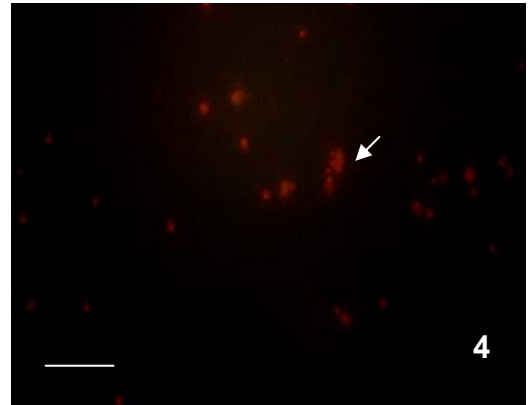
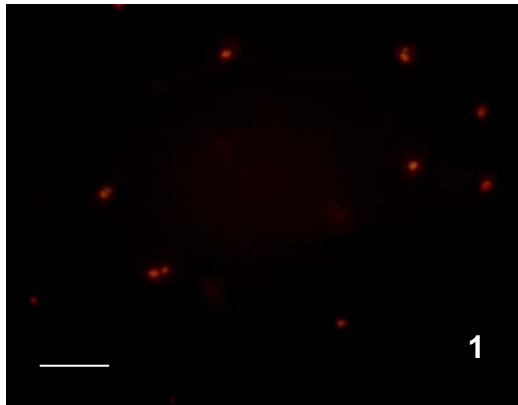


Figura 8: Características morfológicas de apoptose (fragmentação da cromatina - setas) em células de *K. lactis* mais velhas. (A) DAPI. (B) HOECHST. (1) 0 mmol.L⁻¹; (2) 0,08 mmol.L⁻¹; (3) 0,57 mmol.L⁻¹; (4) 3,80 mmol.L⁻¹; (5) 7,60 mmol.L⁻¹; (6) 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄. Barras = 5 µm.

B



4.3. Efeito da velocidade de crescimento no envelhecimento de culturas de *Kluyveromyces lactis*

Para determinar a velocidade de crescimento associada a sinais de envelhecimento em culturas de *K. lactis*, foram realizados experimentos em cultura contínua. Estabelecida a condição de estresse por nitrogênio e determinada a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de $0,44 \text{ h}^{-1}$, culturas de *K. lactis* foram conduzidas em quatro velocidades de crescimento, entre zero e inferior à máxima: $0,01 \text{ h}^{-1}$, $0,06 \text{ h}^{-1}$, $0,18 \text{ h}^{-1}$ e $0,35 \text{ h}^{-1}$.

A Tabela 2 apresenta alguns parâmetros da cultura contínua de *K. lactis* em regime permanente sob limitação por nitrogênio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$). Nestas condições, o aumento do fluxo e, conseqüentemente, da velocidade específica de crescimento foi acompanhada pela redução do tempo de geração, redução do tempo de residência (tempo médio de permanência da cultura no biorreator - F / V) e diminuição da massa celular. O pH se manteve constante durante o crescimento nas quatro velocidades de crescimento analisadas.

Com relação ao consumo de glicose e aos produtos do metabolismo, como etanol e glicerol, nas quatro velocidades de crescimento, verifica-se que o aumento da velocidade de crescimento diminuiu o consumo de glicose por *K. lactis*. Esses dados foram avaliados pela medida da concentração do açúcar remanescente no meio. O aumento da velocidade de crescimento diminuiu a produção de etanol e glicerol encontrados no meio de cultura, mas o rendimento desses metabólitos por mg de células ($Y_{(P/X)}$) foi aumentado para etanol e diminuído para glicerol.

Apesar de *K. lactis* apresentar metabolismo predominantemente oxidativo, ou seja, metabolismo respirativo caracterizado pela oxidação completa do açúcar a CO_2 , os resultados mostraram que a levedura apresentou metabolismo oxidorreduutivo, isto é, metabolismo fermentativo, com o aumento da velocidade de crescimento. No metabolismo fermentativo, o açúcar é parcialmente oxidado a piruvato e este reduzido a etanol. Porém, pode haver simultaneamente metabolismo fermentativo e o respirativo, caracterizando o metabolismo respirofermentativo (SISO et al., 2000), quando

a repressão do metabolismo oxidativo pelo fermentativo, bem conhecido em *S. cerevisiae*, não se verifica. Na avaliação das vias metabólicas adotadas por leveduras, a análise deve ser global, pois o metabolismo de oxidorredução, por exemplo, é estreitamente conectado a reações periféricas e centrais do metabolismo de carbono e nitrogênio (BAKKER et al., 2001).

Diferentes velocidades de crescimento geram diferentes estados fisiológicos da célula, isto é, metabolismo, composição e morfologia celular diferentes (HOEK et al., 1998). Diante dessa consideração, as alterações morfológicas relacionadas ao aumento do conteúdo de quitina na parede celular, aumento das dimensões celulares e presença de características morfológicas de apoptose, características do envelhecimento de células de leveduras também foram avaliadas para cada velocidade de crescimento analisada.

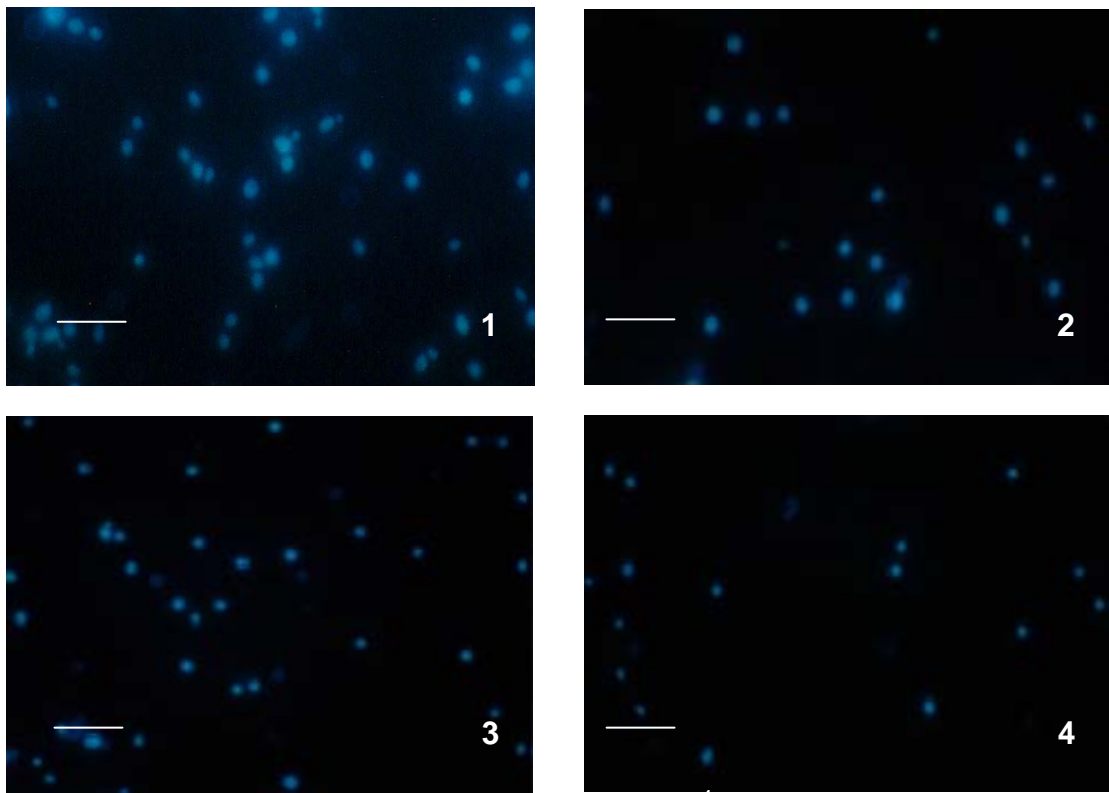
Tabela 2: Parâmetros da cultura de *K. lactis* conduzida em regime contínuo sob limitação de nitrogênio.

Fluxo (mL min ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)	DO ₆₀₀	Biomassa (mg L ⁻¹)	pH	τ ^b	glicose residual (mmol L ⁻¹)	metabólitos (mmol L ⁻¹)		Y _(P/X) ^a	
								etanol	glicerol	etanol	glicerol
0.05	0.01	69	5,5	2,884	5,5	100	5,21	25,37	1,8	390	0,057
0.3	0.06	12	5,3	2,780	5,5	16,7	12,95	21,22	1,3	370	0,043
0.67	0.18	4	3,7	1,930	5,5	5,5	28,40	18,67	0,54	440	0,025
1.16	0.35	2	2,6	1,350	5,4	2,8	42,60	12,85	0,36	430	0,022

^a Rendimento de etanol e glicerol por massa celular em mg.mg⁻¹.

^b Tempo de residência em horas.

A Figura 9 mostra a presença de quitina e a concentração de N-acetilglicosamina na parede celular de *K. lactis* em função da velocidade de crescimento em cultura contínua sob limitação de nitrogênio. Na Figura 9A, a emissão da fluorescência azul, obtida pela coloração com calcoflúor, indica a presença de quitina na parede celular de *K. lactis* cultivada nas velocidades de crescimento de: $0,01 \text{ h}^{-1}$, $0,06 \text{ h}^{-1}$, $0,18 \text{ h}^{-1}$ e $0,35 \text{ h}^{-1}$. Observou-se que a intensidade da fluorescência não alterou nas respectivas velocidades de crescimento analisadas. No entanto, quando a concentração de N-acetilglicosamina presente na parede celular de *K. lactis* foi quantificada (Figura 9B), observou-se que as culturas conduzidas em velocidades de crescimento de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e $0,06 \text{ h}^{-1}$ apresentaram maior concentração de N-acetilglicosamina ($27 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) comparada com as culturas conduzidas nas velocidades de crescimento de $0,18 \text{ h}^{-1}$ e $0,35 \text{ h}^{-1}$. Nessas velocidades de crescimento (de $0,18 \text{ h}^{-1}$ e $0,35 \text{ h}^{-1}$), a concentração de N-acetilglicosamina praticamente não variou de uma para a outra, sendo que os valores encontrados foram $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.



B

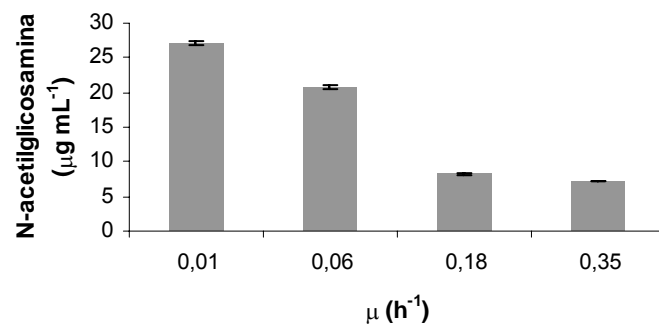


Figura 9: Presença de quitina na parede celular de *K. lactis*, detectada pela fluorescência azul. (1) 0,01 h⁻¹, (2) 0,06 h⁻¹, (3) 0,18 h⁻¹, (4) 0,35 h⁻¹. Barras = 5 µm (A). Concentração de N-acetilglicosamina (µg.mL⁻¹) na parede celular de *K. lactis* em função da velocidade de crescimento, em cultura contínua, sob limitação de nitrogênio. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão da média de três repetições (B).

A Tabela 3 apresenta os resultados das dimensões celulares de *K. lactis* em função da velocidade de crescimento. As dimensões das células de *K. lactis* nas culturas conduzidas em velocidades de crescimento de 0,01, 0,06, 0,18 e 0,35 h⁻¹ foram na ordem de 2-3 μm, o que confere com a literatura, (KURTZMAN, 1998). Entre as velocidades analisadas, a menor velocidade de crescimento (0,01 h⁻¹) resultou em células, aproximadamente, 0,6 μm maiores que células de *K. lactis* cultivadas nas demais velocidades.

Tabela 3: Dimensões de células de *K. lactis* em função da velocidade de crescimento. Os resultados representam as médias aritméticas ± o desvio padrão.

μ (h ⁻¹)	Dimensões (μm)
0,01	3,1 ± 0,002
0,06	2,6 ± 0,002
0,18	2,16 ± 0,001
0,35	2,08 ± 0,001

Para verificar a presença de características morfológicas de apoptose nas culturas contínuas de *K. lactis* em diferentes velocidades de crescimento, as colorações de DAPI E HOECHST foram realizadas. Características morfológicas de apoptose somente foram observadas nas células de culturas de *K. lactis* conduzidas na velocidade de crescimento de 0,01 h⁻¹ (Figura 10).

No cultivo em batelada, onde foi proposto avaliar o efeito da idade de culturas de *K. lactis* na velocidade específica inicial de crescimento, as características morfológicas de apoptose foram detectadas para culturas com maior idade, isto é, a partir do quinto dia de transferência da cultura para meio novo, nas concentrações de 0,57 mmol.L⁻¹, 3,80 mmol.L⁻¹, 7,60 mmol.L⁻¹ e a partir do oitavo dia de repicagem, na concentração de 38,0 mmol.L⁻¹ de [NH₄]₂SO₄. Naquelas condições, a velocidade específica de crescimento determinada foi de 0,1 h⁻¹, superior a menor velocidade de crescimento avaliada na cultura contínua (0,01 h⁻¹). Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que na cultura em batelada, células de todas as idades constituíam

a população analisada, inclusive células em processo de envelhecimento com características morfológicas de apoptose. Considerando que sinais de envelhecimento, como concentração de quitina, dimensão de células e características morfológicas de apoptose, foram observados nas culturas contínuas conduzidas com velocidade de crescimento de $0,01 \text{ h}^{-1}$, é possível que culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis* sob condições de nitrogênio limitantes conduzidas nessa velocidade de crescimento possam ser úteis em estudos sobre sinais de envelhecimento celular.

Em *S. cerevisiae* já foi reconhecido que em uma população sob estresse, seja nutricional ou oxidativo, o processo de morte celular programada é desencadeado, o que caracteriza um comportamento “altruístico” entre as células da população, ou seja, umas células morrem em detrimento das outras, como forma de sobrevivência (MADEO et al., 2000).

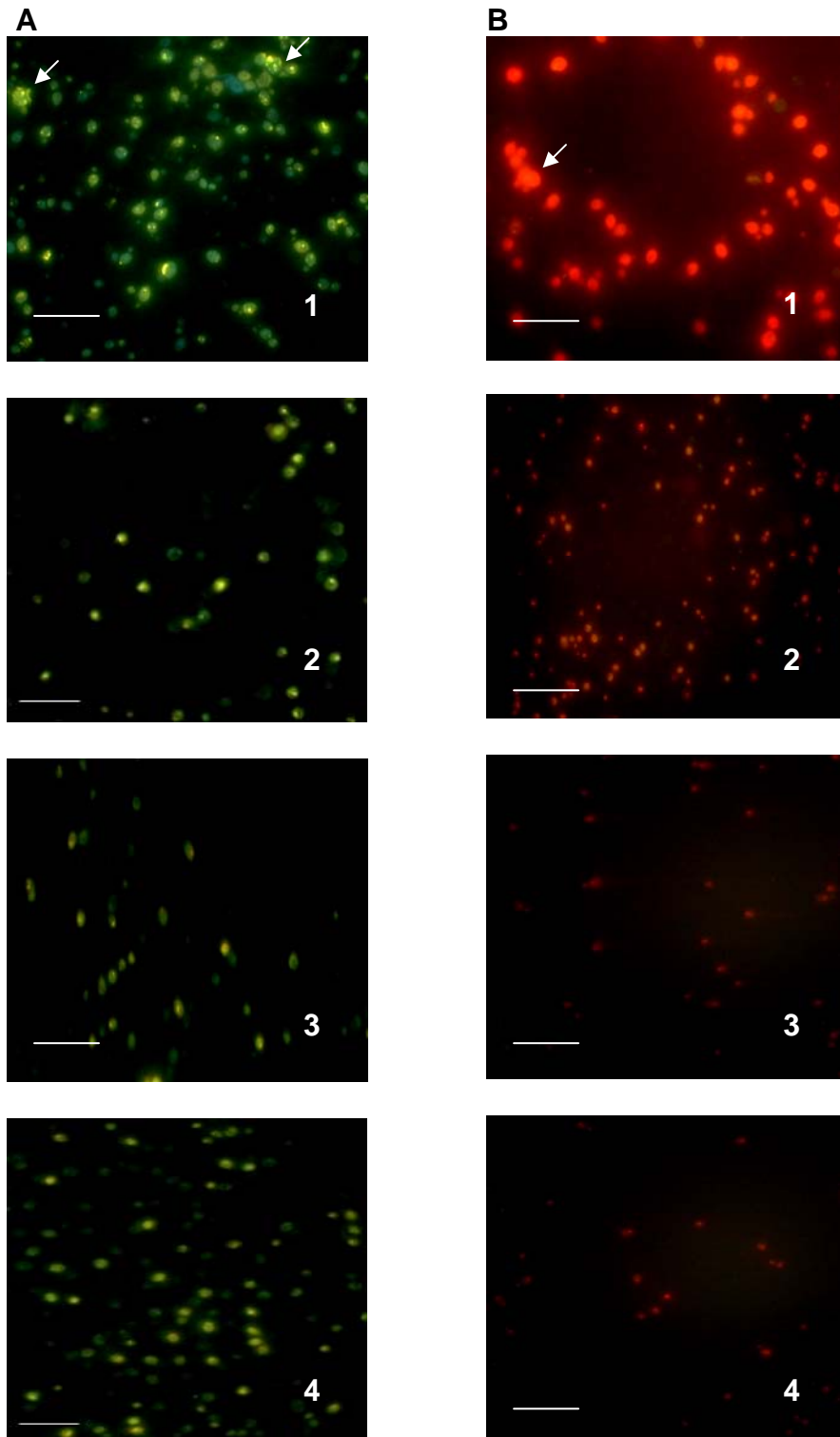


Figura 10: Características morfológicas de apoptose (fragmentação da cromatina - setas), em células de *K. lactis* cultivadas nas velocidades de crescimento de (1) 0,01 h⁻¹, (2) 0,06 h⁻¹, (3) 0,18 h⁻¹ e (4) 0,35 h⁻¹. (A) DAPI. (B) HOECHST. Barras = 5 μm.

5. CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho foram:

- A cinética de crescimento de *Kluyveromyces lactis* em função da concentração de sulfato de amônio, obedeceu o modelo cinético proposto por Monod, com uma correlação de 0,985, uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de $0,44 \text{ h}^{-1}$ e uma constante de saturação (K_s) de $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$.
- A velocidade específica inicial de crescimento foi reduzida com a idade da cultura.
- Concentrações de quitina na parede celular aumentaram com a idade da cultura e com a concentração de sulfato de amônio.
- Dimensões celulares aumentaram com a idade independente da concentração de sulfato de amônio.
- A presença de características morfológicas de apoptose foi verificada a partir do quinto dia de transferência da cultura para meio novo nas concentrações de $0,57 \text{ mmol.L}^{-1}$, $3,80 \text{ mmol.L}^{-1}$, $7,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ e a partir do oitavo dia de repicagem na concentração de $38,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$.

- Culturas com velocidades de crescimento de 0,18 e 0,35 h⁻¹ produziram maior rendimento em etanol e menor rendimento em glicerol.
- A concentração de quitina na parede celular de culturas de *K. lactis* conduzidas nas velocidades de crescimento de 0,01 h⁻¹ e 0,06 h⁻¹ foi maior (27 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹ de N-acetilglicosamina), comparada com as culturas conduzidas nas velocidades de crescimento de 0,18 h⁻¹ (6 mg.mL⁻¹) e 0,35 h⁻¹ (5 mg.mL⁻¹).
- As dimensões das células de *K. lactis* foram maiores na cultura conduzida com velocidade de crescimento de 0,01 h⁻¹, se comparada com as demais velocidades de crescimento avaliadas: 0,06; 0,18 e 0,35 h⁻¹.
- Características morfológicas de apoptose só foram identificadas nas culturas de *K. lactis* conduzidas na velocidade de crescimento de 0,01 h⁻¹.
- O estresse por nitrogênio e a idade afetam a cinética de crescimento de culturas de *K. lactis*.
- Culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis* sob condições de nitrogênio limitantes conduzidas com velocidade de crescimento correspondente a 0,01 h⁻¹ podem ser úteis em estudos sobre sinais de envelhecimento celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. New York: **McGraw Hill Book Company**, 2^a ed., 1986.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTIK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, T. J. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p. 15-37, 2001.

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

BRANCHAT, G. R.; CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31983-31989, 2004.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. Industrial Microbiology In: **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice-hall, 7^a ed., p. 361-396, 1994.

CAMPOS, L. L. Obtenção e caracterização de mutantes de *Kluyveromyces lactis* selecionados em cultura contínua utilizando soro de queijo ultrafiltrado. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 59p., 2001 (Tese de Mestrado).

COOPER, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERM, J.N.; JONES. E.W.; BROACH, J.R. (Eds). The Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolism and gene expression. **Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY**, p. 39-99, 1982.

DAWES, I. W.; SUTHERLAND, I. W. Microbial Physiology. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 2^a ed., 1992.

DICKINSON, J.; SCHWEIZER, R. The metabolism and Molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. **CRC Press LLC**, NY, 2^a ed., 2004.

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

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

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

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

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

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

HOEK, P. V.; DIJKEN, J. P. V; PRONK, J. T. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 724-736, 2000.

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

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

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

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

KUMAR, S. & HANSEN, P. M. T. New reaction mixture for spectrophotometric determination of N-acetylhexoxamines. **Analytical Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 398-400, 1972.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts, A taxonomic study. The Netherlands: **Elsevier science**, 4^a ed., 1998.

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

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

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

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

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

MADEO, F. & FRÖHLICH, K. Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. **FEBS Letters**, v. 473, p.6-9, 2000.

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

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

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

MATTANOVICH, D.; GASSER, B.; HOHENBLUM, H.; SAUER, M. Stress in recombinant protein producing yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 121-135, 2004.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W. Microbial Physiology. New York: **Wiley-Liss**, 3^a ed., 1995.

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

NUNES, M.F.A.; MASSAGUER, S.; ALEGRE, R.M. Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 1993.

O'CONNOR, J. E. Observacion morfológica de apoptosis por microscopia de fluorescência. **The Journal of Cell Biology**, v. 78, p. 112-116, 1989.

POPOLO, L.; GILARDELLI, D; BONFANTE, P.; VAI, MARINA. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of the cell wall polymers in the *gcp1* Δ mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 463-469, 1997.

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

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

SILVEIRA, W. B. Produção de etanol em permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces lactis* UFV-3. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 56 p., 2004 (Tese de Mestrado).

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

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

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

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

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

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

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

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

WINDERICKX, J., HOLSBEEKS, I., LAGATIE, O., THEVELEIN, J., DE WINDE, H. 7 From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. **Topics in Current Genetics**, v 1, p 305-386, 2003.

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

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

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1A: Velocidades específicas de crescimento (μ) de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$) no meio YCB.

$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (mmol.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	0,0498
0,02	0,0762
0,06	0,1303
0,08	0,1483
0,15	0,1688
0,23	0,2619
0,30	0,2741
0,38	0,2835
0,45	0,3232
0,57	0,3438
0,95	0,3549
1,90	0,3821
3,80	0,3974
7,60	0,4407
19,0	0,4519
38,0	0,4612

APÊNDICE B

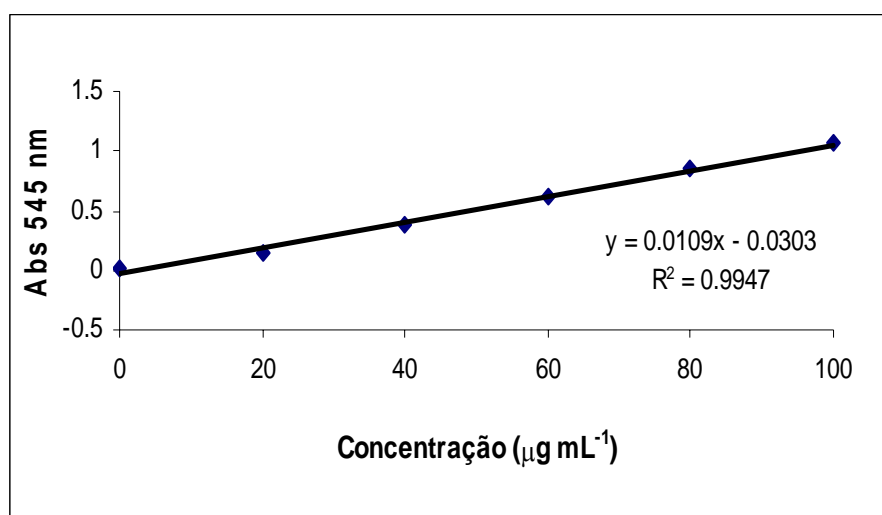


Figura 1B: Curva padrão de N-acetilglicosamina.