ATIVIDADE INULINOLÍTICA EXTRACELULAR

EM *Kluyveromyces marxianus*

GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA

Engenheiro-Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Flavio C.A. Tavares

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

P436a Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães
Atividade inulinolítica extracelular em Kluyve-
romyces marxianus. Piracicaba, 1989.
152p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Enzima microbiana 2. Levedura - Atividade en-
zímica 3. Levedura - Genética 4. Levedura - Regula-
ção I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei-
roz, Piracicaba

CDD 576.139

ATIVIDADE INULINOLÍTICA EXTRACELULAR

EM *Kluyveromyces marxianus*

GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA

Aprovado em: 09.02.1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

ESALQ/USP

Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna

AGROCERES

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

Orientador

Aos meus avòs,

Aos meus Pais, Gonçalo e Aglae,

As minhas irmãs,

A Dirce,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A todos os que acreditam na pesquisa básica, e que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, entre eles:

- Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares.
- Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna.
- Eng^a Agr^a Dirce Maria Carraro.
- Professores do Departamento de Genética.
- Sementes Agrocere S.A.
- Colegas e funcionários do Laboratório de Genética de leveduras: Ana, Beto, Chico, Adriana, Ederson e Leninha.
- Funcionários do Departamento de Genética.
- Bibliotecárias do Departamento de Genética.
- Colegas do Curso de Pós-Graduação.
- Funcionários da unidade de pesquisa da Agrocere S.A. em Santa Cruz das Palmeiras.

Agradecimento especial ao Dr. Keneth Shephard, EMBRAPA/CNPMPF, exemplo de Capacidade e Dedicação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O Gênero <i>Kluyveromyces</i>	3
2.2. O Sistema de Secreção em Eucariotos	6
2.3. Regulação da Síntese de Proteínas	13
2.4. A Atividade Inulinolítica em Leveduras	24
2.5. O Sistema "Killer"	29
2.6. Expressão de Peptídeos Heterólogos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Linhagens	37
3.2. Meios de Cultura	37
3.2.1. Meio complexo (YEPD)	37
3.2.2. Meio sintético (SD)	38
3.2.3. Meios para secreção da inulinase	38
3.2.3.1. YNBC	39
3.2.3.2. YNC	39
3.2.4. Meio de "Killer" (K)	39
3.2.5. Meio seletivo de regeneração (SD _{reg})	40
3.2.6. Meio completo de regeneração (YEPD _{reg}) .	40
3.3. Soluções e Tampões	41
3.3.1. Solução salina	41

	Página
3.3.2. Tampão fosfato pH 4,5	41
3.3.3. Tampão citrato fosfato	41
3.3.4. Soluções para fusão de protoplasto	42
3.3.4.1. EDTA	42
3.3.4.2. Tampão sorbitol-fosfato	42
3.3.4.3. Solução de enzima lítica	43
3.3.4.4. Solução fusogênica	43
3.3.4.5. Solução de sorbitol	43
3.3.4.6. Solução de cloreto de cálcio ..	43
3.3.4.7. 2 Mercapto etanol	43
3.3.5. Solução para quantificação de proteínas	43
3.3.6. Reativo de Somogy	44
3.3.7. Reativo de Nelson	44
3.3.8. Solução de inulina	44
3.3.9. Solução padrão de glicose	45
3.3.10. Soluções para eletroforese	45
3.3.10.1. Estoque acrilamida - bisacrilamida	45
3.3.10.2. Estoque do tampão inferior(TI)	45
3.3.10.3. Estoque do tampão superior(TS)	46
3.3.10.4. Estoque de SDS	46
3.3.10.5. Solução de persulfato de amônia (PA)	46
3.3.10.6. Estoque do tampão de corrida (TC)	46

	Página
3.3.10.7. Tampão da amostra (TA)	46
3.3.10.8. Tampão carregador	47
3.3.10.9. Solução desnaturante	47
3.3.10.10. Fixador	47
3.3.10.11. Corante para proteína total ..	47
3.3.11. Solução padrão de albumina	47
3.3.12. Solução de autólise	48
3.4. Procedimentos	48
3.4.1. Esterilização	48
3.4.2. Incubação	48
3.4.3. Multiplicação do inóculo	49
3.4.4. Avaliação do crescimento celular	49
3.4.5. Avaliação da atividade inulinolítica ...	49
3.4.6. Avaliação da estabilidade da enzima	51
3.4.7. Identificação do pH ótimo para atividade	52
3.4.8. Medida da resistência térmica	52
3.4.9. Quantificação de proteínas	52
3.4.10. Eletroforese de proteínas SDS - PAGE e proteínas não desnaturadas	53
3.4.11. Eletroforese bidimensional	56
3.4.12. Localização da enzima no gel	56
3.4.13. Cálculo do peso molecular aparente dos polipeotídeos das amostras	57

	Página
3.4.14. Avaliação densitométrica dos geis	57
3.4.15. Avaliação do caráter "Killer"	57
3.4.16. Cruzamentos	58
3.4.16.1. Natural	58
3.4.16.2. Fusão de protoplasto	58
3.4.17. Delineamento experimental e análise estatística	60
3.4.18. Autólise	60
3.4.19. Avaliação da fragilidade da parede	61
4. RESULTADOS	62
4.1. Caracterização das Linhagens Utilizadas	62
4.2. Características da Atividade Inulinolítica	63
4.3. Causas da Variação da Atividade Inulinolítica	80
4.4. Características da Exportação de Proteínas por <i>K. marxianus</i>	97
5. DISCUSSÃO	100
5.1. Características das Linhagens Utilizadas	100
5.2. Características da Atividade Inulinolítica	103
5.3. Causas da Variação da Atividade Inulinolítica	113
5.4. Características da Exportação de Proteínas	129
6. CONCLUSÃO	132
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Características gerais das linhagens de <i>K. marxianus</i> utilizadas no trabalho	63
2	Atividade inulinolítica extracelular das linhagens <i>K. marxianus</i> em diferentes períodos de crescimento	66
3	Cinética de crescimento das linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, e os tempos necessários para alcançar a fase estacionária.	66
4	Taxa de incremento da atividade inulinolítica extracelular das linhagens IZ1339, IZ 619 e IZ 610	66
5	Inativação térmica da enzima extracelular de IZ 619	67
6	Valores da atividade em diferentes pHs, ajustados por tampões em diferentes condições. Enzima extracelular de IZ 619	70
7	Valores das áreas estimadas para as medidas densitométricas das bandas da eletroforese de proteínas do sobrenadante de amostras com e sem atividade	73
8	Peso molecular aparente dos polipeptídeos de 4 amostras de proteína extracelular de IZ 619	77

Tabela

Página

9	Comparação do crescimento e atividade inulínica celular e extracelular entre <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. marxianus</i>	79
10	Avaliação do crescimento celular de IZ 619 em várias concentrações de extrato de levedura..	82
11	Avaliação da atividade hidrolítica celular e de IZ 619, sobre sacarose e inulina, crescida em várias concentrações de extrato de levedura	83
12	Equações da regressão e coeficientes de correlação para atividade total sobre sacarose e inulina, em relação ao aumento da concentração de extrato de levedura no meio para IZ 619	83
13	Efeito das diversas fontes de nitrogênio no crescimento celular e atividade celular e extracelular de IZ 619.	88
14	Atividade total, celular e extracelular para as linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, crescidas em meio com glicose ou inulina.	88
15	Valores de proteína exportada para as linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, crescidas em meio com glicose ou inulina.	89
16	Avaliação do crescimento e tempo de geração de IZ 619 em meio com diversas fontes de carbono.	90

Tabela		Página
17	Avaliação da atividade inulinolítica extracelular de IZ 619 em meio com diversas fontes de carbono	90
18	Relação das medidas de atividade inulinolítica extracelular e crescimento das linhagens IZ 619 em culturas com diversas fontes de carbono.	91
19	Atividade celular e extracelular de IZ 610, sobre sacarose e inulina, em culturas crescidas com diversas fontes de carbono.	93
20	Crescimento celular das linhagens IZ 1339, IZ 619 e AH 22 em culturas isoladas e nos consórcios IZ 1339 + AH 22 e IZ 619 + AH 22..	93
21	Atividade inulinolítica extracelular total e por 10 células das linhagens IZ 1339, IZ 619 e AH 22 em culturas isoladas e nos consórcios IZ 1339 + AH 22 e IZ 619 + AH 22.	94
22	Origem e marcas das linhagens mutantes e dos híbridos	96
23	Medida da atividade inulinolítica extracelular em linhagens parentais e híbridos, crescidos em meio com glicose (G) e inulina (I) ...	96
24	Avaliação da atividade inulinolítica extracelular e exportação de proteínas para IZ 619 crescida em diferentes meios	98

Tabela

Página

25	Medida da atividade inulinolítica e da concentração de proteínas extracelular em <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. marxianus</i>	99
----	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curvas de crescimento e evolução da atividade inulinolítica extracelular das linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610	65
2	Curva da inativação térmica da enzima extracelular de IZ 619	68
3	Curva de atividade em gradiente de pH ajustado por tampão citrato - fosfato com molaridade variável. Enzima extracelular de IZ 619 ..	69
4	Curva de atividade em gradiente de pH ajustado por tampão citrato - fosfato com molaridade constante. Enzima extracelular de IZ 619..	69
5	Eletroforese sem SDS de 2 amostras do sobrenadante de IZ 619. Amostras 1 e 2 sem e com atividade respectivamente	71
6	Medida da atividade inulinolítica ao longo do gel de acrilamida sem SDS. Eletroforese da amostra de IZ 619 com atividade	72
7	Análise densitométrica das amostras sem e com atividade de IZ 619	72
8	Segunda dimensão, com SDS, da amostra de proteína extracelular de IZ 619 apresentando atividade	74
9	Padrão eletroforético de 4 amostras de proteína extracelular de IZ 619.	77

Figura		Página
10	Padrão eletroforético da sobrenadante das culturas IZ 1339, IZ 619 e IZ 610 apresentando atividade extracelular em condições de repressão e não repressão; e das proteínas de <i>S. cerevisiae</i> e de IZ 619	80
11	Representação das curvas de regressão para atividade de hidrolítica total em IZ 619, em relação à concentração de extrato de levedura no meio de cultura	84
12	Representação do comportamento da atividade total, celular e extracelular de IZ 619, submetida à cultura em meio com concentrações crescentes de extrato de levedura.	85

ATIVIDADE INULINOLÍTICA EXTRACELULAR

EM *Kluyveromyces marxianus*

Autor: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Orientador: Prof. Dr. Flavio C.A. Tavares

R E S U M O

O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar a atividade inulinolítica de *K. marxianus*. Para isso foram conduzidos experimentos em linhagens com propriedades contrastantes, tendo sido identificada e caracterizada a enzima envolvida, e determinadas as fontes de modulação do sistema.

A análise eletroforética do sobrenadante das culturas permitiu a identificação da banda relativa a inulinase, sendo constatado a existência de apenas uma enzima no sistema. Essa enzima possui peso molecular aparente de 94 Kd, e a estrutura de sua banda indica a existência de glicosilação. Em cultura, a enzima apresentou-se estável por pelo menos 48 h, com a maior parte da produção pelas células ocorrendo na fase estacionária. A temperatura ótima de atividade situa-se entre 30 e 40°C, havendo forte inativação

após os 50°C, e inativação total a partir dos 60°C. Quanto ao pH, a enzima apresenta atividade hidrolítica entre 2,5 e 8,0, porém o seu pico situa-se em 6,5, sendo observado variações bem acentuadas nas proximidades desse ponto.

Células inteiras apresentam a capacidade de hidrolisar inulina, e por autólise com clorofórmio e tolueno foi possível isolar a enzima da parede, tendo essa apresentado o mesmo padrão eletroforético da extracelular. Devido a fragilidade da parede de *K. marxianus*, chegou-se a conclusão de que a atividade extracelular é consequência de pequena capacidade do envoltório de reter as proteínas no espaço periplasmático, não havendo um sistema específico para a exportação ao meio de cultura.

Variações na atividade inulinolítica foram observadas quando diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas. Nos diferentes ensaios foi demonstrado que na ausência de extrato de levedura, peptona ou uréia não ocorre atividade extracelular. Em linhagens apresentando repressão catabólica, foi verificado que só ocorre atividade extracelular na presença de inulina. Carboidratos relacionados, como a sacarose, não substituem o polímero para esse efeito.

Comparando-se os sistemas Killer e inulinase, verificou-se que em condições de aumento da exportação da toxina Killer, há uma consequente redução da atividade inulinolítica específica. A explicação para tal fato pode estar na competição das duas enzimas pelo sistema celular de secreção.

A nível genético, foi constatado que, à semelhança do que é verificado para linhagens de *K. lactis* em relação ao sistema da lactose, para a inulinase de *K. marxianus* muitas linhagens de ocorrência natural não apresentam repressão por glicose. Da análise dos híbridos entre linhagens desreprimadas, parcialmente desreprimadas e reprimadas, chegou-se à conclusão da existência de ao menos dois elementos transnegativos atuando no sistema.

A linhagem IZ 619, apresentando grande atividade inulinolítica extracelular, foi avaliada para a exportação de proteína. Em meio complexo, após 4 dias em cultura a linhagem apresentou, em comparação com uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*, um excedente na produção de 270 mg/l. Considerando-se que cerca de 90% da proteína exportada foi identificada como inulinase, conclui-se pela propriedade do uso de um sistema como esse na produção de peptídeos heterólogos.

EXTRACELULAR INULINOLYTIC ACTIVITY

OF *Kluyveromyces marxianus*

Author: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Adviser: Prof. Dr. Flavio C.A. Tavares

S U M M A R Y

This study was undertaken to characterize of the inulinolytic activity of *K. marxianus*. Strains of contrasting properties were used to determine the factors affecting the enzyme activity.

Using eletrophoretic analysis it was determined the presence of only one enzyme, with apparent molecular weight of 94 Kd. The band pattern indicates the possibility of the enzyme to be glicosilated. When the cells were grown in a liquid medium, the inulinase activity was detected specially toward the end of the log phase and during the stationary phase. The enzyme showed stability for at least 48 h in culture. The optimal temperature to hidrolysis is in the range of 30 e 40°C, with a sharp decrease of activity at 50°C, and total inactivation after 60°C. Enzyme activity is performed in the range of 2.5 to 8.0 pH being the optimum

point at pH 6.5.

Intact cells show ability to hidrolise inulin, and by autolysis with chloroform and toluene it was possible to isolate the wall enzyme, that presents the same eletrophoretic pattern of the extracelular enzyme. The fragileness of the cell wall, associated to the high prodution of the proteins was thought to be the cause of the extracelular activity. The data indicate the absense of any transport system across the cell wall to release the inulinase in the culture medium.

Variation in inulinolytic activity was observed when different nitrogen source were evaluated. When the cells were grown in a liquid medium without urea, peptone or yeast extract, no extracelular activity was detected. In repressible strains, besides the nitrogen source the presence of inulin is necessary to increase inulinase production and to occur the enzyme release into the culture medium.

Comparing the Killer system with the inulinase system. It was found a condition that increases the exportation of the Killer toxin, causing a concomitant decrease of the specific inulinolytic activity. This fact might indicate a competition between two enzymes for the secretory process.

Analogously to the lactose system of *K. lactis*, there are in *K. marxianus* several derepressed strains of natural occurrence. The genetic analysis of the

hybrids between no-repressed, semi-repressed and repressed strains determined the existence of at least two transnegative elements operating in the system.

The strain IZ 619, of high extracellular inulinolytic activity, compared to *Saccharomyces cerevisiae*, industrial strain (Fleischman) produced a relative excess of 270 mg/l of protein after four days growing in complex medium. About 90% of this protein was found to be inulinase which indicates a strong ability of this protein export. In view of this result it might be appropriate to use *K. marxianus* as heterologous protein producer, specially through the inulinase system.

1. INTRODUÇÃO

Entre as estratégias das leveduras para a utilização de substratos, encontra-se a exportação de enzimas hidrolíticas. Por esse processo consegue-se obter, extracelularmente, a degradação de substâncias complexas, que de outra forma não poderiam ser utilizadas.

Uma das enzimas de exportação que tem merecido atenção, principalmente devido às suas aplicações tecnológicas, é a inulinase. A partir do uso de organismos que a produzem, como a levedura *Kluyveromyces marxianus*, é possível o aproveitamento da inulina, um polímero de frutose com uma glicose terminal, para a obtenção de diversos produtos. Desde a década de 60 vários pesquisadores têm trabalhado na viabilização desses processos, considerando-se principalmente a alta concentração de inulina existente em alguns vegetais de fácil cultivo, como o *Helianthus tuberosus*.

Apesar do interesse que desperta, observa-se que o sistema de secreção da inulinase, assim como a própria enzima, carecem de informações básicas quanto aos seus aspectos genéticos e bioquímicos, o que reduz o desempenho dos processos tecnológicos. Os conhecimentos a esse respeito acumulados até o momento têm-se mostrado controverso, não

havendo concordância em relação às características da atividade inulinolítica e nem em relação aos fatores que governam a sua variação.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estudar a atividade inulinolítica extracelular de *K. marxianus*, visando determinar a natureza dessa atividade, os fatores relacionados à sua modulação, e, considerando-se tratar-se de um sistema de exportação de proteínas, as potencialidades do seu uso na produção de peptídeos heterólogos. Para tal é necessário a identificação e caracterização das enzimas envolvidas no processo, a determinação dos elementos genéticos e ambientais que o influenciam, e a avaliação da contribuição da inulinase no montante das proteínas exportadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Kluyveromyces*

O termo levedura, embora extensivamente utilizado na literatura científica, não representa uma designação taxonômica rigorosamente definida. De acordo com LODDER (1970), leveduras podem ser conceituadas como "microorganismos nos quais a forma unicelular é conspícua e pertencem ao Reino Fungi". Essa simples definição é talvez a única possível de englobar a grande diversidade de organismos classificados com o termo.

Quanto a sua divisão, esses elementos são classificados em quatro grupos principais: ascomicetos, basidiomicetos, ballistosporogenos e ascosporogenos (MACMILLAN & PHAFF, 1978), cujo critério de enquadramento é basicamente a forma de reprodução.

Dentro desses quatro grupos o mais importante é, sem dúvida, o ascomiceto, caracterizado pela capacidade de formar esporos em asco, sendo considerado uma forma primitiva da classe ascomiceto. Com essa classificação encontramos o gênero *Saccharomyces*, atualmente um dos principais sistemas experimentais da biologia, e o gênero *Kluyveromyces*.

Quanto aos aspectos morfológicos, o gênero *Kluyveromyces* possui as seguintes características: células com forma esferoidal, elipsoidal, cilíndrica ou alongada; brotamento multilateral; a maioria das espécies produz pseudomicélio; ascosporos do tipo oblongo, crecentiforme, reniforme, esferoidal ou elipsoidal; e número de ascosporos no asco variável, indo de um a mais de dezesseis. Em relação às características fisiológicas, todas as espécies têm grande capacidade fermentativa, não utilizam nitrato como fonte de nitrogênio, não crescem na ausência de vitamina, a maioria das espécies é resistente a cicloexamida, ao menos metade das espécies consegue fermentar em meio com mais de 50% de glicose, e diversas espécies produzem pigmento vermelho (KREGER VAN RIJ, 1969; MACMILLAN & PHAFF, 1978).

A partir desses parâmetros, VAN DER WALT (1970) agrupou nesse gênero 18 espécies, construindo uma chave para identificação dessas dentro do gênero, baseado principalmente em aspectos da morfologia dos ascos e ascosporos e na capacidade de assimilar e fermentar carboidratos. Posteriormente JOHANSEN (1980), com base em resultados de hibridização celular, determinou a incorporação de diversas espécies do gênero na espécie *K. marxianus*, entre elas a *K. lactis* e a *K. fragilis*.

Outra linha utilizada para a classificação de espécies dentro desse gênero é a molecular, e os principais parâmetros avaliados são a homologia de bases e o padrão eletroforético de fragmentos de DNA ou cromossomos inteiros.

Entre os primeiros trabalhos na área, temos o de BICNELL & DOUGLAS (1970), avaliando relação da composição de bases guanina/citosina (G/C), hibridização de DNA inteiro e hibridização com rRNA entre diversas espécies do gênero *Saccharomyces*. Nessa investigação os autores encontraram estreita relação entre as espécies *S. lactis*, *S. marxianus*, *S. fragilis* e *S. wickerhami*, apoiando a proposta de VAN DER WALT de agrupá-las no gênero *Kluyveromyces*. O surgimento de novas técnicas, como a eletroforese de campo pulsado ou eletroforese com alternância ortogonal de campo (OFAGE), trouxe a possibilidade de separação de cromossomos, o que determinou um aumento no poder de identificação do relacionamento entre espécies (CARLE & OLSOW, 1984; CARLE & OLSOW, 1985). Com base nessas técnicas, SOR & FUKUHARA (1989) analisaram os padrões de migração de DNA cromossomal de espécies do gênero *Kluyveromyces*, comparando-o com o sistema clássico de taxonomia. O resultado desse trabalho mostrou grandes diferenças nos padrões, tanto entre as variedades de *K. marxianus*, como entre linhagens dentro de uma mesma variedade, o que aparentemente discorda dos resultados de hibridização obtidos por JOHANSEN (1980). Nessa divergência, os parâmetros moleculares, devido à grande dificuldade de caracterização fisiológica e morfológica em leveduras, mostram-se os mais adequados para identificações precisas nesses organismos.

2.2. O Sistema de Secreção em Eucariotos

A translocação de polipeptídeos específicos logo após a sua síntese, através de membranas biológicas, é um processo comum à secreção por eucariotos, à biogênese de organelas e à exportação de proteínas por procariotos. Embora existam diferenças óbvias entre esses sistemas, os princípios gerais e os mecanismos moleculares são bastante semelhantes (RANDALL *et alii*, 1987).

Em procariotos, o processo de exportação pode ocorrer durante a tradução (cotraducional) ou posterior a ela (pós traducional). Em ambos os casos o mecanismo geral parece ser o da união do polipeptídeo nascente, através de uma região denominada peptídeo sinal, com proteínas que evitam o dobramento desse polipeptídeo (RANDALL *et alii*, 1987; COLLIER *et alii*, 1988). Essa etapa é fundamental para que ocorra a translocação, porém a localização final da proteína (para parede ou exportada para o meio) deve ser função da sua estrutura espacial (BECKWITH & FERRO-NOVICK, 1986). Quanto ao peptídeo sinal, eles são de natureza extremamente variável, sendo clivados da proteína logo após os passos iniciais da exportação (RANDALL *et alii*, 1987). Essa clivagem, porém, não é essencial à translocação (KUHN & WICKNER, 1985). Devido à existência desse sistema específico para secreção, muitas vezes enzimas com mesma função e características bioquímicas semelhantes, como as lipolíticas de *Lysobacter enzymogenes*, ficam localizadas em diferentes pontos (VON TIGERSTROM & STELMASCHVEK, 1989).

Em células de eucariotos, como as das leveduras, existem, em relação aos procariotos, diferenças fundamentais nos mecanismos de localização de proteínas. Inicialmente, nas leveduras existem três principais alvos para as proteínas produzidas: o núcleo, a mitocôndria e o sistema secretor. O direcionamento para esses é função de sinais especiais existentes na sequência da proteína traduzida, especialmente nos resíduos próximos à extremidade N-terminal (SCHECKMAN, 1985). A principal distinção entre a síntese das proteínas para a secreção e a síntese das outras proteínas, está no fato do sítio de tradução estar localizado nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático (SCHECKMAN & NOVICK, 1982). O processo é apresentado a seguir.

Segundo HANSEN *et alii* (1986), a tradução de proteínas a serem secretadas inicia-se nos ribossomos citoplasmáticos. Após a tradução da sequência do polipeptídeo correspondente ao peptídeo sinal, partículas de reconhecimento desse peptídeo (SRP) ligam-se a ele, e conduzem a proteína que está sendo formada, juntamente com o aparato de tradução, até receptores do SRP. Essa proteína nascente, ou mesmo totalmente formada (HANSEN *et alii*, 1986), é inserida no retículo endoplasmático e submetida a uma bateria de modificações pós traducionais, incluindo clivagem do peptídeo sinal e glicosilação (DESHAIES *et alii*, 1988). Posteriormente, essas proteínas são conduzidas ao aparelho de Golgi, onde recebem novas cadeias polissacarídicas, e daí para vesículas transportadoras, que as conduzem ao destino final

(SCHEKMAN & NOVICK, 1982).

A identificação dessas etapas da secreção vieram principalmente do estudo de mutantes temperatura sensíveis para o processo, sendo os genes relacionados denominados SEC. Posteriormente, com o avanço da biologia molecular, foi possível a realização de procedimentos, tais como a construção de genes quiméricos e deleções controladas, capazes de localizar as sequências responsáveis pelas diferentes funções.

Quanto ao peptídeo sinal, sua remoção pode ser bloqueada tanto por substituição de aminoácidos no sítio de clivagem, quanto por pequenas deleções nesse ponto. A consequência do bloqueio desse processo é a acumulação dos precursores da proteína (pré-proteína), já inicialmente glicosilados, no retículo endoplasmático. (CHAGUENAUER-TSAPIS & HINNEN, 1984). O transporte posterior desse polipeptídeo para outros compartimentos ocorre, porém é dramaticamente retardado (DESHAIES *et alii*, 1989). Além disso, proteínas quiméricas, como a formada pela reunião do peptídeo sinal do gene do fator α com o gene SUC 2, da invertase, produz essa última enzima em sua forma ativa e normalmente secretada (EMR *et alii*, 1984). Dessa forma, observamos que apesar da analogia funcional entre os peptídeos sinais de eucariotos e procariotos, nos primeiros eles possuem um papel bem menos específico no direcionamento da proteína, e sua clivagem no momento correto é de grande importância ao funcionamento normal do sistema.

Uma interessante observação sobre a ligação da pré-proteínas ao retículo endoplasmático foi feita por CHIRICO *et alii* (1988). Esses autores observaram que o precursor do fator α de levedura *in vitro*, tendo como substrato lisado de germen de trigo, tem capacidade de se reunir em vesículas do retículo endoplasmático. Quando esse substrato é substituído por extrato de levedura, essa ligação ao retículo é estimulado em cerca de cinco vezes. Com a purificação dos fatores relacionados a essa atividade, determinou-se ser o efeito gerado por dois polipeptídeos de PMA 70 Kd, que por reação imunológica foram caracterizados como pertencentes ao grupo de proteínas do choque térmico (SSA 1 e SSA 2). Intrigantemente, esse efeito é também verificado quando a pré-proteína α é tratada com uréia antes de ser adicionada ao substrato com a membrana (CHIRICO *et alii*, 1988). A conclusão que se pode obter desses dados é que os fatores SSA 1 e SSA 2, assim como a uréia, devem ter algum papel na manutenção da estrutura espacial do polipeptídeo, de forma a permitir que ocorra o processo de translocação. No caso da uréia, as vias de utilização de amidas "*in vitro*", por leveduras, são pouco conhecidas, sendo as informações existentes incompletas e fragmentadas (LARGE, 1986). Quanto aos genes para a produção da proteína SSA 1, sabe-se que mutações para esse resultam em defeitos pleiotrópicos no transporte de diversas proteínas através da membrana plasmática (DESHAIES *et alii*, 1989).

Um mecanismo indispensável ao sistema de secreção em células de eucariotos é a glicosilação, processo pelo qual cadeias de carboidratos são enzimaticamente ligadas às proteínas. Essas cadeias de carboidratos são basicamente de dois tipos: N-ligadas e as O-ligadas. As N-ligadas são as que um oligossacarídeo, com estrutura $\text{Glc}_3 \text{Man}_9 \text{GlcNAc}_2$, é transferido de um intermediário lipídico, o Dolicol, para uma asparagina situada na sequência Aln-X-Thr/Ser da cadeia polipeptídica (X representa qualquer aminoácido). O processo de formação do oligossacarídeo transferido é bastante complexo e dispendioso energeticamente, sendo basicamente igual entre leveduras e células animais (KUKURUZINSKA *et alii*, 1987). As cadeias O-ligadas são bem mais simples, sendo formadas a partir da transferência de uma manose inicial do complexo Dolicol-P-man para um resíduo de serina ou treonina do esqueleto polipeptídico. (KUKURUZINSKA, *et alii*, 1987). Ambos os processos ocorrem a nível de retículo endoplasmático. Posteriormente, essas moléculas encaminham-se para o complexo de Golgi onde vários resíduos de manose são adicionados por ação de diversas manosil-transferases. Essa etapa é que constitui a principal diferença entre os sistemas de glicosilação de animais e leveduras (DESHAIES *et alii*, 1989), e o número de resíduos adicionados está diretamente ligado à localização final da proteína. Nas glicoproteínas da parede celular, o número de manoses está em torno de 100 à 200. Para as localizadas em estruturas membranosas internas, como os vacúolos, o número é bem pequeno, normal-

mente em torno de 10. Finalmente, para as glicoproteínas secretadas o número é intermediário, ficando entre 50 e 100 manoses (KUKURUZIWSKA *et alii*, 1987). Em leveduras, a localização final dessas glicoproteínas secretadas é basicamente o espaço periplasmático (entre a membrana plasmática e a parede celular). O motivo principal para essa localização parece ser não a existência de um sistema específico, mas o fato de que grande parte das proteínas secretadas são volumosas demais para poderem ultrapassar a barreira da parede celular. (EMR *et alii*, 1983). Esse raciocínio pode ser discutido comparando-se a estrutura da invertase com a do ferormônio α . A invertase é uma glicoproteína com PMA de 270.000 (NEUMANN & LAMP, 1960), com pelo menos 9, dos seus 13 sítios potenciais de glicosilação, ligados a extensas cadeias de manose (TAUSSIG & CARLSON, 1983). Já o ferormônio α , esse é um peptídeo formado por apenas 13 resíduos de aminoácidos (THORNER, 1981), sendo o seu precursor glicosilado com oligossacarídeos de cadeias curtas e em apenas 3 sítios (EMR *et alii*, 1983). Por esses dados de tamanho podemos facilmente entender porque a invertase fica basicamente compartimentalizada no espaço periplasmático, enquanto que o fator α consegue ultrapassar os limites da parede celular. A fusão entre esses dois genes, trazendo a região do peptídeo líder do fator α e a parte estrutural do gene SUC (invertase), não gera modificação nas localizações acima referidas (EMR *et alii*, 1983). Dessa forma, concluímos que a determinação da localização final da proteína, nos níveis espaço

periplasmático e exterior da célula, é resultado da interação entre o tamanho da molécula secretada e a estrutura da parede celular. KOMAR *et alii* (1986) observaram que enzimas de localização periplasmática, como a invertase e a fosfatase ácida, podem existir em baixas concentrações no meio externo, inclusive em equilíbrio dinâmico com as suas contrapartidas periplasmáticas. As características gerais e os principais propósitos biológicos desse fenômeno são desconhecidos, mas certamente esse não é consequência de um processo de localização específico. Uma outra evidência para isso é o fato de que mutantes para estrutura de parede celular, denominados fragéis, possuem liberação para o meio de proteínas normalmente localizadas no espaço periplasmático (WALTSCHENA *et alii*, 1989).

Dessa forma, observamos que o principal papel da glicosilação no sistema de secreção é determinar a localização de proteínas, ou seja, conduzir o tráfego dessas moléculas dentro da célula. Em mutantes para esse processo, assim como na presença de inibidores para o mesmo (ex. tunicamicina), a célula permanece na fase G 1, não progredindo através do ciclo celular (KUKURUZINSKA *et alii*, 1987). Além dessa função, observa-se que o processo tem papel fundamental na determinação da estrutura tridimensional de algumas proteínas, como a invertase, sendo indispensável para a existência de atividade enzimática nessas (SCHEKMAN & NOVICK, 1982).

2.3. Regulação da Síntese de Proteínas

Em células de eucariotos, os eventos que controlam a síntese de proteínas ativa estão divididos basicamente em três grupos: transcricionais, traducionais e pós traducionais.

Na regulação transcricional de leveduras, existem duas classes de elementos atuando em conjunto, os de ação cis e os de ação trans (GUARENTE, 1987). Os elementos de ação cis correspondem a sítios do DNA os quais mediam a ligação e atuação da RNA polimerase II, sendo divididos em elementos promotores e repressores. Os elementos promotores são os sítios UAS ("Upstream Activation Site" - Sítio de Ativação Acima) TATA e de iniciação (STRUHL, 1987). O elemento repressor é representado pelo sítio operador (O) (GUARENTE, 1987).

Sobre os elementos cis de regulação positiva, apenas o sítio UAS parece ter papel na variação do nível de transcrição. O elemento iniciador, localizado ao lado do sítio de iniciação da transcrição, têm pouco efeito no nível desse processo, sendo apenas um elemento sinalizador (STRUHL, 1987). O sítio TATA é utilizado para a iniciação ocorrer, tendo papel na determinação do elemento iniciador a ser considerado. Em leveduras essa sequência possui função um pouco diferente da encontrada para células de eucariotos superiores, podendo haver vários sítios TATA, em diferentes posições (HAHN *et alii*, 1985), ou mesmo ausência desses

(OGDEN *et alii*, 1986). Um exemplo do papel dos múltiplos sítios "TATA" é dado para o gene SUC 2, da invertase. Para esse, dois sítios de iniciação de mRNA são diferentemente utilizados (de acordo com dois diferentes sítios "TATA"): um constitutivo e outro regulado (CARLSON & BOTSTEIN, 1982). O constitutivo dá origem a uma invertase intracelular sem atividade, cuja função é desconhecida (NEIGEDORN & CARLSON, 1987). O regulado, reprimido por glicose, dá origem à invertase secretada (NEIGEDORN & CARLSON, 1987). Quanto aos sítios UAS, os dados obtidos até o momento demonstram que eles são indispensáveis para que a transcrição ocorra (GUARENTE, 1984). A nível funcional, e mesmo estrutural, esses elementos guardam extrema semelhança com os "enhancer" de eucariotos superiores e de alguns vírus. Como características gerais, esses elementos são pontos de ligação de complexos de ativadores (uma ou mais proteínas ligados ou não a efetores) e mediam a regulação a distância (GUARENTE, 1988). O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é um ponto bastante discutido, e os modelos apresentados até o momento admitem ser o fenômeno função da modulação espacial de diferentes regiões do DNA, o que faz com que os sítios se aproximem (GUARENTE, 1988).

Quanto aos elementos cis da regulação negativa, alguns sítios operadores, como os de genes haplo-específicos, foram bem caracterizados. Para esses sistemas, na maioria das vezes, o sítio "O" é fisicamente diferente dos sítios UAS e TATA, situando-se entre esses e sem precisar

sobrepo-los para mediar a regulação negativa (BREWT, 1987). Apesar disso, em alguns casos, como o do gene a específico BAR 1, observa-se que o sítio operador para o repressor $\alpha 2$ localiza-se na mesma região do sítio UAS (KRONSTAD *et alii*, 1987). O mais provável, no funcionamento desse elemento cis, é que os dois mecanismos, sítio independente ou sobreposição do UAS, não sejam mutuamente exclusivos.

Em relação à classe de reguladores trans, eles são basicamente proteínas, ou complexos delas, que mediam a atividade dos elementos cis em vários níveis (STRUHL, 1987). Em analogia a esses elementos, os reguladores trans também podem ser positivos ou negativos.

Na regulação por elementos trans, um sistema muito estudado é o do catabolismo da galactose em *S. cerevisiae*. Nesse sistema, um gene, o GAL 4, codifica para uma proteína de 881 aminoácidos que é requerida para ativação transcricional de pelo menos 5 genes: GAL 1, GAL 2, GAL 7, GAL 10 e MEL 1 (OSHIMA, 1982). A interação entre essa proteína GAL 4 e os sítios UAS dos genes ativados, foi demonstrado ser realizado pela região amino terminal da proteína, em uma extensão de 74 resíduos (KEEGAN *et alii*, 1986). É interessante notar que a sequência específica dessa região não é a determinante da interação, sendo que há uma correlação entre o aumento de resíduos ácidos desse trecho e o aumento da ativação da transcrição (GILL & PTASHWE, 1987). É observado que esse efeito de ativação da proteínas GAL 4, mediado pela mesma região aminoterminal, também ocorre para

elementos reguladores cis de outros organismos, como o UAS do vírus do tumor mamário de ratos (KAKIDANI & PTASHNE, 1988). A proteínas GAL 4 é produzida constitutivamente (MATSUMOTO *et alii*, 1978), porém os genes nos quais ela atua não. A razão para isso é a existência de um sistema de regulação de ação secundária, ou seja, sem ligação direta com os elementos cis, que determina a atuação da proteína ativadora. De forma geral, o sistema funciona pela existência de uma proteína repressora, sintetizada pelo gene GAL 80 de forma possivelmente constitutiva, que na ausência de galactose (ou algum produto relacionado) liga-se a GAL 4 evitando sua ação ativadora (JOHNSTON *et alii*, 1989). Quando a galactose está presente no meio, ela liga-se a GAL 80, e impede que essa proteína una-se a GAL 4. O motivo da inativação da regulação positiva, quando ocorre a ligação GAL 4 - GAL 80, parece ser a impossibilidade da ligação à GAL 4, de fatores ativadores da transcrição (JOHNSTON *et alii*, 1989). Uma observação interessante sobre esse aspecto foi feita por MA & PTASHNE (1988), que verificaram que a proteína GAL 80 poderia transformar-se em ativador transcricional, atuando juntamente com GAL 4, se a ela fosse ligada uma sequência da proteína B 42 de *E. coli*, que nesse organismo ativa a transcrição do repressor LEXA. Dessa forma verificamos não haver uma especificidade muito grande na atuação dos elementos, podendo inclusive ocorrer grandes modificações de função como consequência de modificações estruturais. Além desse tipo de regulação, o sistema

galactose também sofre repressão catabólica por glicose. Diversos resultados sugerem o papel de enzimas fosforiladoras, como a SNF 1, atuando nesse processo. Essas enzimas, segundo modelo proposto, atuariam fosforilando os ativadores transcricionais, tornando-os assim capazes de regular positivamente a transcrição (GUARENTE, 1987).

Em *K. lactis*, o sistema regulatório da lactose é muito semelhante ao de *S. cerevisiae*. Da mesma forma que nessa espécie, também ocorre um ativador transcricional positivo, o LAC 9, homólogo ao LAC 4. Apesar disso, em contraste com *S. cerevisiae* a maioria das linhagens de *K. lactis* não sofre repressão catabólica por glicose, havendo porém linhagens com esse tipo de regulação. A análise dos ativadores LAC 9 em linhagens com e sem repressão catabólica, demonstrou que diferenças entre eles é que são responsáveis pela existência do fenômeno (BREUNIG *et alii*, 1988), o que fortalece a idéia de haver um sistema relacionado com a glicose, como o de fosforilação por SNF 1, atuando no ativador.

Além de ativadores do tipo GAL 4/LAC 9, as quais parecem suficientes para regulação positiva da transcrição de vários genes, torna-se claro que para muitos outros casos, como os gene CYC 1 e CYC 7, mais de um gene é requerido para a ativação (GUARENTE, 1987). No caso do gene CYC 1 (Iso 1 - citocromo C), observa-se que em sua região de regulação cis ocorrem 2 sequências UAS: UAS 1 e UAS 2. Três genes, HAP 1, HAP 2 e HAP 3, foram identificados como

responsáveis pela ação nessas sequências UAS, ativando a transcrição (OLESEN *et alii*, 1987; PFEIFER *et alii*, 1987b). HAP 1, em conjunto com RC 2 (PFEIFER *et alii*, 1987a) ativa o UAS 1 em resposta ao efetor heme. Essa mesma proteína ativa o UAS do gene CYC 7, em resposta ao mesmo efetor, porém, inesperadamente, as sequências de ligação do DNA nos dois casos não possuem homologia (PFEIFER *et alii*, 1987b). Os reguladores HAP 1 e HAP 3 determinaram a ativação em resposta à troca da fonte de carbono para uma fonte não fermentecível, sendo que a ligação dessas duas proteínas ao UAS 2 ocorre de forma interdependente (OLESEN *et alii*, 1987). Existem vários motivos que podem explicar a existência de vários reguladores positivos para um mesmo gene, e entre esses podemos citar a possibilidade de resposta a mais de um sinal fisiológico, e a maior rigidez no controle do período da transcrição (GUARENTE, 1987).

Em relação a elementos tran-negativos em elementos cis, os principais exemplos são encontrados para as proteínas relacionadas à regulação da reação sexual. De uma forma geral, o sistema funciona pela regulação da transcrição dos genes a-específicos, α -específicos, haploide-específicos, e do homotalismo (NASMYTH & SHORE, 1987). Uma característica geral observada para todos esses casos, é a grande sinergia que há entre os reguladores trans-negativos, de modo a tornarem-se funcionais (GUARENTE, 1987). Exemplos dessa sinergia são dados para o repressor $\alpha 2$, cuja função é desligar os genes a-específicos, e os genes SIR, que

reprimem as cópias silenciosas dos loci HML e HMR. Para o repressor $\alpha 2$, KELEHER *et alii* (1988) demonstraram a existência de uma proteína não específica, GRM ("General Regulator of Mating Type"), que é requerida, em adição a $\alpha 2$, para a repressão nos operadores a-específicos. Em relação aos genes SIR, RINE & HEROWITZ (1987), demonstraram a ação conjunta do produto de 4 genes, SIR 1-4, na ligação ao operador E das cópias silenciosas.

Uma importante observação a ser feita em relação à interação de elementos cis e trans, é o efeito que linhagens específicos possuem na expressão de peptídeos heterólogos. IBORRA *et alii* (1988), mostrou que a atividade da B-galactosidase de *E. coli*, produzida em *S. cerevisiae* através de um plasmídio de expressão, varia em até 10 vezes de acordo com a linhagem transformada.

Por esses exemplos observamos a complexidade da regulação transcricional em células de eucariotos, especificamente de leveduras. A ocorrência de vários níveis de regulação e a existência de mecanismos de regulação para reguladores, demonstra a dificuldade dos estudos desses sistemas a nível fenotípico, o que foi possível para bactérias. Por esse motivos, normalmente a metodologia molecular é imprescindível para o estabelecimento inequívoco dos processos, sendo porém possível, por outras metodologias, determinar os princípios gerais relacionados.

Além da regulação a nível transcricional, a regulação a nível traducional e pós traducional são extre-

manente poderosas em eucariotos, tendo capacidade de determinar grandes variações no nível da expressão dos genes. A nível traducional, um sistema bem estudado em leveduras é o da biossíntese de aminoácidos, cujo funcionamento é desreprimido em resposta a carência de um único aminoácidos. Por exemplo, carência de triptofano leva a desrepressão de enzimas do percurso biossintético do triptofano, arginina, histidina, isoleucina e leucina (FINK, 1986). Essa desrepressão deve-se a atividade de um regulador transcricional positivo, o GCN 4, o qual por sua vez tem sua biossíntese reprimida pela proteína GCD 1 (HARASHIMA *et alii*, 1986). Essa proteína repressora desempenha a sua ação por ligar-se ao mRNA de GCN 4, evitando a sua tradução (FINK, 1986). Além desse nível de regulação, o próprio GCD 1 tem a sua ação repressora inibida por ação de 3 efetores positivos para o processo, o GCN 1, GCN 2 e GCN 3 (HARASHIMA *et alii*, 1986). Esse processo de regulação traducional em leveduras é muito semelhante a um tipo de regulação transcricional direta em procariotos, a atenuação, que também atua a nível de mRNA (KOLTER & YANOFSKY, 1982).

Um último nível de regulação a ser considerado é o pós traducional. No caso do sistema de secreção em órgãos especializados de eucariotos superiores, certos tipos de células possuem regulação a esse nível, com grupos de proteínas a serem exportadas ficando armazenados em grânulos secretores, sendo liberado ao meio por ação de estímulos externos (GUMBINER & KELLY, 1982; BURGESS & KELLY, 1987). Em

leveduras, não existe nenhuma evidência de que as células possuam algum sistema de secreção regulado (SALMINEN & NOVICK), sendo que as proteínas são exportadas na mesma velocidade em que vão sendo sintetizadas (NOVICK & SCHEKMAN, 1983). Apesar da constitutividade do processo, observa-se que a quantidade de uma proteína secretada pode ser alterada quando uma outra proteína, também secretada, varia a sua produção (MRSA *et alii*, 1988). O mecanismo pelo qual isso ocorre não é conhecido, mas pode-se pensar em competição das proteínas pelo percurso biossintético das modificações pós-traducionais, uma vez que o processo é altamente dispendioso energeticamente. Algumas perturbações da secreção, que também não podem ser consideradas como resultante de processos regulatórios, são observadas quando ocorre superprodução de proteínas. ROTHMAN & STEVENS (1986) citam que quando carboxidase y e proteinase A, duas enzimas vacuolares, sofrem superexpressão, elas são parcialmente secretadas. Dessa forma, verifica-se que no processo de secreção de leveduras, apesar de não haver um sistema específico para sua regulação (a nível pós traducional), existe alguma flexibilidade, que ocorre tanto em relação à produção, como em relação à localização final das proteínas processadas.

A partir dos níveis existentes de regulação, evoluíram nas células sistemas gerais para coordenação dos genes, cuja causa ambiental e efeito fenotípico podem ser facilmente verificados. Um desses sistemas é o da repressão por glicose, que funciona basicamente pela repressão da

produção de proteínas ativas por efeito de existência de hexoses (glucose, frutose, etc) no meio. Em procariotos, onde esse sistema foi primeiramente descrito, a regulação ocorre pela inibição da transcrição. Em eucariotos porém, o sistema é bem mais complexo, podendo envolver elementos dos três níveis de regulação (ENTIAN, 1986). O principal mecanismo para o fenômeno parece ser a interferência com a ativação positiva da transcrição (TRUMBLY, 1988), o que foi anteriormente exemplificado nessa revisão para a catabolismo da galactose. Um sistema extremamente útil para o estudo da repressão por glicose é o da invertase, cuja enzima, codificada pelo gene SUC 2, tem a sua produção na forma ativa modulada em mais de 200 vezes por efeito do açúcar (NEIGEBORN & CARLSON, 1987). Um grande número de genes que interagem com SUC 2 foram identificados fazendo parte dessa modulação, o que complica grandemente o entendimento das interações regulatórias. Os dados existentes até o momento demonstram que, a nível de transcrição, os genes glicose reprimidos são regulados positivamente para desrepressão (ENTIAN, 1986). Entre os genes com essa função de desrepressão estão os da série SNF (SNF 1-6), cujas mutações causam defeito na secreção da invertase (NEIGEDORN & CARLSON, 1984). Entre esses genes, identificou-se que SNF 1 codifica para uma proteína - quinase, e SNF 3 para um transportador de glicose de alta afinidade (CELENZA & CARLSON, 1986). Trabalhando com mutantes SNF 1, NEIGEBORN & CARLSON (1986) identificaram um novo mutante, o SSN 6, que determina a

produção constitutiva da invertase, ou seja, que ultrapassa a necessidade do mecanismo de desrepressão. Dessa forma, foi proposto um modelo com SSN 6 sendo uma proteína repressora, que na ausência da glicose seria fosforilada por SNF 1, que assim desreprimiria o sistema (NEIGEBORN & CARLSON, 1987). É possível que a repressão por glicose tenha efeito também a outros níveis de regulação além do transcricional. SAKAI *et alii* (1988) isolaram mutantes supersecretores para linhagens de *S. cerevisiae*, transformados com o gene quimérico SUC 2 - α amilase de rato. Entre esses mutantes, um apresentou aumento de secreção de 12 a 15 vezes sem qualquer variação no nível de transcrição, ou seja, é possível a existência de genes regulados por glicose e envolvidos no processo pós traducional da secreção, que também contribuam para o fenômeno da repressão. Uma classe desses possíveis genes é a dos GRP, cujas proteínas possuem grande homologia às da família HAP 70, do choque térmico. Esses componentes podem desempenhar funções na translocação de proteínas para o retículo endoplasmático, e na manutenção dessas proteínas translocadas em uma forma solúvel (PELHAM, 1986). Essa última função apresenta grande importância para a célula, pois na presença de glicose a atividade de N-glicosilação reduz-se sobremaneira, o que faz com que as proteínas translocadas se agrupem em grânulos insolúveis (MUNTO & PELHAM, 1986).

Pelo descrito, nota-se que em leveduras a maior parte dos trabalhos realizados sobre regulação concentra-se em *S. cerevisiae*. Para *Kluyveromyces*, têm-se observa-

do que muitos dos mecanismos estabelecidos para *Saccharomyces* também existem, sendo inclusive possível o intercâmbio de elementos regulatórios entre os gêneros (IBORRA *et alii*, 1988).

2.4. Atividade Inulinolítica em Leveduras

Como já observado, umas das características utilizadas para classificação de leveduras é a facilidade de assimilar e fermentar determinados carboidratos. Para *K. marxianus*, um polissacarídeo frequentemente ligado à sua caracterização é a inulina. Esse carboidrato é um glicofrutano que ocorre como substâncias de reserva em tubérculos de diversos membros da família compositae, notadamente em Jerusalem artichoke (*Heliantus tuberorus*) e em espécies de *Inula* (ASPINALL & HIRST, 1965). Em relação à sua composição, a inulina é formada por resíduos de β -D-frutofuranoses, unidos em ligações β 2-1, tendo como terminação um resíduo de glicopirranose idêntico a sacarose (KIERSTAN, 1980). O número de frutoses encadeiadas é variável, girando em torno de 35.

Uma grande variedade de enzimas foram identificadas com capacidade de hidrolisar as ligações β 1-2 frutofuranosidase que ocorrem em sacarose e inulina. Essas frutofuranosidases podem ser classificadas em três grupos, de acordo com suas atividades em polissacarídeos de diferentes graus de polimerização (GP) (FLEMING & GOOT WASSINK, 1979). No grupo (1), temos as verdadeiras β 1-2

frutano - frutano - hidrólases (E.C. 3.2.1.7), com alta atividade em inulina e atividade extremamente baixa em sacarose. As enzimas desse grupo ocorrem em tubérculos de *Helianthus tuberosus*, e estão envolvidas com a utilização das reservas da planta. No grupo (2) encontramos as β -D frutanofuranosídio - frutano - hidrolase (E.C. 3.2.1.26), com índice de hidrólise em sacarose e inulina (S/I) em torno de 14.000. Uma enzima desse grupo bastante conhecida é a invertase secretada por *S. cerevisiae*. O terceiro grupo é representado pelas enzimas com índice de hidrólise S/I intermediário, porém muito menor que o da invertase. A ação dessas hidrolases sobre a inulina se dá pela remoção terminal dos resíduos de frutose, até a clivagem da última ligação glicosídica, quando uma molécula de glicose é liberada (SNYDER & PHAFF, 1962). Estas enzimas foram inicialmente classificados como inulinases, tendo sido sua ação sobre sacarose considerada resultante de contaminações das amostras por invertase. Experimentos posteriores, de competição de substrato, mostraram que ambas as atividades são realizados pela mesma enzima, e em um único sítio ativo (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979). Esse último grupo de enzimas ocorre em um grande número de microorganismos, tendo sido identificados em várias leveduras e fungos filamentosos.

Diversos autores investigaram a atividade inulinolítica em leveduras, tendo sido encontrado grande variabilidade tanto no sistema regulatório da produção da enzima, quanto nas próprias características dessa.

Em *Candida kefyr*, NEGORO & KITO (1973) identificaram uma β frutanofuranosidase, intra e extra celular, produzidas quando as células eram cultivadas em meio com lactose. Além disso, os autores verificaram que a inulina e o extrato de levedura induziam a produção. Nesse trabalho um dos problemas observados é o uso, pelos autores, de meios complexos para a avaliação desses efeitos. A lactose, nesse caso, sempre foi avaliada em associação com a uréia e/ou extrato de levedura. Em *Candida salmeticensis*, GUIRAUD *et alii* (1980) identificaram atividade inulinolítica, em células crescidas em "Yeast Nitrogen Base" (YNB), tanto a nível de parede quanto extracelular. Nesse caso, as células inteiras não apresentaram atividade quando ensaiadas para hidrólise, o que foi considerado como efeito da impossibilidade da penetração da inulina através da parede celular. Quanto à regulação da exportação, esse organismo não apresentou produção de enzima quando na presença de glicose no meio de cultura, havendo estímulo na presença de inulina e sacarose. Em *Debaryomyces phaffi*, DEMEULEE *et alii* (1981), crescendo as células em YNB, identificaram atividade inulinolítica tanto em células inteiras como no meio de cultura, sendo que nesse meio a análise cromatográfica indicou a presença de apenas uma enzima. Em relação à regulação dessa, mostrou-se ser a atividade induzível por sacarose e inulina. Em *Debaryomyces cantarelli*, BELUCHE *et alii* (1980) estabeleceram que, como nos sistemas anteriores, também ocorria, para esse organismo, atividade enzimática no

meio de cultura e em células inteiras. A enzima de parede foi extraída com tampão fosfato pH 8,0 e as duas frações, celular e extracelular, foram ensaiados para a determinação do pH ótimo de atividade. Os autores encontraram diferentes valores de pH ótimo para essas amostras, tendo sido concluído com esse dado pela existência de duas enzimas atuando no processo. Posteriormente, GIRAUD *et alii* (1982), trabalhando com a mesma linhagem, fizeram extração das duas frações com a mesma metodologia, submetendo-as a cromatografia. Após essa análise, determinou-se a existência de apenas uma enzima, sendo considerado o resultado anteriormente obtido como consequência da interferência do tampão de extração na atividade da enzima da parede.

Em *Pichia polymorpha*, CHAUTARD *et alii* (1980), descreveu a existência de duas inulinases, denominadas EI e EII, com propriedades bioquímicas bastante semelhantes. No referido trabalho, as análises feitas para a caracterização das enzimas, principalmente cromatográficas e de avaliação de atividade, não parecem ser suficientes para a afirmação da existência de duas enzimas inulinolíticas. Com relação a regulação da atividade, o sistema também mostrou-se reprimido por glicose (CHAUTARD *et alii*, 1980). BAJON *et alii* (1984) obteve uma linhagem de *P. polymorpha* desreprimida, tendo observado que essa era também supersecretora. Uma possibilidade para explicar o fenômeno seria a existência de um sistema de repressão por ativador negativo, esse sensível a glicose. Uma mutação nesse elemento trans poderia torna-lo

insensível ao carboidrato, fazendo com que mesmo a repressão por níveis residuais de hexose deixasse de existir. Sistema de repressão semelhante ocorre para a invertase de *S. cerevisiae* (NEIGEBOERN & CARLSON, 1986).

Nos organismos apresentados, podemos considerar como características gerais dos seus sistemas, a capacidade de produzir inulinase quando as células são crescidas em YNB, a existência de atividade a nível de parede e extracelular, e a repressão catabólica por glicose.

No género *Kluyveromyces*, o principal organismo investigado para a secreção da inulinase foi *K. fragilis*. SNYDER & PHAFF (1960) determinaram as características gerais do sistema nesse organismo, tendo detectado atividade tanto a nível celular como extracelular, provavelmente determinadas pela mesma enzima. Além disso, os autores verificaram indução por inulina, baixa produção de enzima no crescimento em YNB e relação de atividade S/I variando entre 20 e 34,5. Um ponto interessante a ser ressaltado foi a baixa produção da enzima no meio sintético, o que foi considerado consequência do fraco crescimento celular, imputado ao uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogénio. A produção de inulinase efetivamente aumentou quando essa fonte foi substituída por caseína hidrolisada. DAVIS (1971), indica a existência de um fator na caseína, identificado como diquetopiperazini, capaz de induzir a produção de β -frutofuranosidase em culturas de *K. fragilis* previamente reprimidas por glicose. Dessa forma, esses trabalhos indicam que a produção da inulinase em *K.*

fragilis está associada não só a fontes de carboidratos específicos, como a compostos nitrogenados.

2.5. O Sistema "Killer"

Na natureza, algumas espécies possuem como estratégia de competição, mecanismos de secreção de toxinas, ativas contra organismos filogeneticamente próximos. Entre os sistemas com essa propriedade encontra-se o colicina de procariotos, o "Killer" de *Paraneercium*, e o Killer de leveduras (WICKNER, 1976).

No grupo das leveduras, o carater "Killer" já foi observado para muitas espécies, ocorrendo em pelo menos 9 géneros (PHILLISKIRK & YOUNK, 1975; STUMM *et alii*, 1977) sendo que, dentre esses, a maior parte dos estudos foi realizado para o sistema de *S. cerevisiae* e, mais recentemente, para o sistema de *K. lactis*.

Em *S. cerevisiae*, o carácter deve-se a presença de dois plasmídios de RNA dupla fita (dsRNA), L e M, separadamente encapsulados em partículas tipo vírus (WICKNER, 1981). O plasmídio M codifica para a secreção da toxina "Killer", letal para leveduras sensíveis, e para imunidade contra essa mesma toxina. O plasmídio L, existente em multiplas subespécies (L-A, L-B, L-C etc), codifica para a duplicação e manutenção dos dois plasmídios (TIPPER & BOSTIAN, 1984). Em relação à estabilidade do carácter, um grande número de genes cromossomais interferem com a

manutenção dos plasmídios e com a secreção da toxina (WICKNER, 1981), e é extremamente fácil a cura das células por fatores ambientais. Entre os métodos de laboratórios normalmente utilizados com esse fim, encontra-se o crescimento das células à elevada temperatura (WICKNER, 1974) e o uso de cicloexamida no meio de cultura (FINK & STYLES, 1972).

Quanto à toxina produzida por *S. cerevisiae*, ela é internamente sintetizada como uma grande proteína glicosilada de 42 Kd, sendo secretada, após desglicosilação enzimática, como uma forma menor de dois polipeptídeos, ligados por uma ponte dissulfeto (BUSSEY *et alii*, 1983). Sua ação se dá pela ligação à receptores do tipo 1-6 β -D glucano da parede de células sensíveis, com a letalidade ocorrendo devido à perda de potássio e ATP celular para o meio (WICKNER, 1981).

Quanto ao sistema "Killer" existente em *Kluyveromyces*, esse mostra pouca similaridade para com o de *Saccharomyces*, havendo como ponto em comum o fato do caráter estar ligado à ação de plasmídios citoplasmáticos. Nesse caso, porém, os dois plasmídios envolvidos no processo, pGKL 1 e pGKL 2, são formados por DNA dupla fita (dsDNA) (GUNGE *et alii*, 1981). O pGKL 1 codifica para a toxina Killer e para a imunidade do sistema e o pGKL 2 parece ser necessário para a replicação e manutenção de pGKL 1 (GUNGE, 1986). Análises recentes de fragmentos específicos do pGKL 2, têm demonstrado a ação desse também na codificação da imunidade,

porém o mecanismo que determina esse fenótipo ainda permanece desconhecido (TOKUNAGA *et alii*, 1987). Além dos genes plasmídiais, já foi demonstrado que pelo menos um gene cromossômico, o KEX 1, é necessário para a produção da toxina (WESOLOWSKI-LOUVEL *et alii*, 1988).

Em relação à toxina produzida por *K. lactis*, observa-se que essa é sintetizada e secretada como uma grande proteína glicosilada, a qual é dissociada após purificação, em três unidades com PMA de 99(α), 30(β) e 27(γ) Kd (STARK *et alii*, 1986). A secreção dessa polipeptídeos é marcadamente inibida pela tuinamicina (GUNGE, 1986), e a análise da sequência do gene codificante mostra a presença do peptídeo sinal (BALDARI *et alii*, 1986), o que indica que a secreção da toxina ocorre pelo mesmo sistema de exportação utilizado para genes nucleares. Quanto a forma de ação a função da toxina nas linhagens sensíveis é inibir a ação da adenilato ciclase, o que faz com que as células permaneçam na fase G1 do ciclo celular (SUGISAKI *et alii*, 1983). O espectro de ação desse inibidor é bem mais amplo que o apresentado pela toxina de *S. cerevisiae*, sendo eficiente sobre um número bem maior de espécies (GUNGE, 1986).

Para testar a especificidade da produção da toxina e os fatores reguladores a estabilidade dos plasmídios, diversos trabalhos foram realizados visando a introdução desses elementos em células de outras espécies. Para *S. cerevisiae* essa transmissão foi obtida tanto por fusão de protoplasto (GUNGE & SAKAGUCHI, 1981), como por transforma-

ção com o plasmídio purificado (GUNGE *et alii*, 1982). Em ambos os casos houve expressão do caráter na células transformada, tendo-se verificado competição replicativa entre os plasmídios e as mitocôndrias (GUNGE & YAMAWA, 1984). Um interessante resultado foi obtido com a transferência desses elementos para *K. fragilis*. Nessa espécie observou-se um aumento de 17 vezes no nível da secreção da toxina, o que foi relacionado com a maior capacidade de exportação desse organismo (SUGISAKI *et alii*, 1985). Resultado semelhante foi obtido para *Candida pseudotropicalis*. Em relação aos processos de cura, a espécie *K. lactis* mostra-se bem mais resistente à perda dos plasmídios que *S. cerevisiae*, sendo os processos normalmente utilizados para essa espécie altamente ineficientes (GUNGE, 1986). NIWA *et alii* (1981) apresenta um método para obtenção de cura baseado na irradiação da cultura por ultravioleta. Segundo esses autores a taxa de cura é de cerca de 10% para um índice de sobrevivência de células em torno de 70%.

É interessante notar que existem muito poucas informações a respeito da regulação da secreção dessa toxina, sendo normalmente considerado tratar-se de um sistema constitutivo. PANCHAL *et alii* (1985) demonstraram haver a formação de halos de inibição maiores quando as linhagens Killer e sensível são cultivadas em meio contendo galactose ou glicerol, do que quando são cultivados em meio com glicose ou frutose. Esse resultado, que aparentemente apontaria para algum tipo de repressão catabólica, foi

analisado como efeito das hexoses no metabolismo da linhagem sensível (PANCHAL *et alii*, 1985).

2.6. Expressão de Peptídeos Heterólogos

Na evolução da sociedade humana, um dos campos que desfrutou maior desenvolvimento foi o da química. O progresso de suas técnicas permitiu à ciência encontrar grandes soluções para áreas, como a da medicina. Nesse sentido, buscou-se, principalmente ao longo desse século, a síntese artificial de componentes biológicos, como peptídeos e proteínas. Atualmente, métodos para esses processos têm sido refinados, a tal ponto que a síntese de cadeias de 50 ou mais aminoácidos tornou-se rotina (KEWT & PARKER, 1988). Apesar desse espantoso avanço, grandes problemas permanecem no setor, principalmente no sentido de conferir às moléculas sintetizadas uma estrutura tridimensional adequada (KEWT & PARKER, 1988).

Uma grande alternativa para esses métodos veio do desenvolvimento da biologia molecular, com a tecnologia do DNA recombinante. Pelos processos desse sistema, é possível isolar e clonar genes específicos, e a partir desses produzir a proteína por eles codificadas, através da introdução dos mesmos em organismos de expressão.

Na utilização dessas práticas, dois organismos tornaram-se hospedeiros tradicionais dos genes clonados: a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *S. cerevisiae*. Na *E.*

coli as técnicas evoluíram, porém foi logo observado que, apesar da grande quantidade de proteína que esses organismos produzem, o fato deles não possuírem sistemas de modificações pós traducionais faz com que muitas das proteínas de eucariotos sintetizadas não sejam funcionais (VAN BRUNT, 1986). Em *S. cerevisiae*, grande parte dos problemas observados para *E. coli* foram solucionados. Inicialmente, uma vez que as leveduras são células eucariotas elas possuem o ambiente interno necessário para permitir o correto dobramento das proteínas heterólogas. Em segundo lugar, as leveduras possuem os mecanismos de glicosilação, processo esse que pode ser importante para integridade estrutural, solubidade e função biológica das moléculas sintetizadas. Por fim, as leveduras podem secretar proteínas, o que facilita sobremaneira a separação entre o produto heterólogo e os constituintes celulares (CREGG *et alii*, 1987). Entre os problemas apresentados por *S. cerevisiae* nesse processo, encontra-se a hipermanosilação (SALOVUORI *et alii*, 1987) e as pequenas concentrações de proteínas exportadas (VAN BRUNT, 1986).

Diversos grupos têm trabalhado buscando maximizar a produção de peptídeos heterólogos por esses organismos. Para isso, observa-se que um grande número de fatores estão envolvidos, e entre eles o genoma específico da linhagem e o tipo de promotor utilizado (KAPPELI *et alii*, 1988). Entre esses promotores, alguns dos mais comumente encontrados em vetores de expressão são o da invertase (SUC 2)

(NISHIZAWA *et alii*, 1986); o do fator α (VAN BRUT, 1986) e o pGK (PENTILLA, 1988). Em relação a quantidade específica de peptídeo heterólogo produzida, na maioria dos sistemas verifica-se concentrações de poucas miligramas por litro. SAKAI *et alii* (1988) trabalhando com o gene grumérico SUC 2 - β endorfina, relata a obtenção da concentração de 0,2 mg/l do produto no meio de cultura (meio definido). PENTILLA *et alii* (1988), relata resultado semelhante para a produção de celobiase I e II (CBH I e II) de *Trichoderma*, utilizando promotor pGK. Esses autores recuperaram, em meio de cultura definido, concentrações de 2 e 10 mg/l para CBH I e CBH II respectivamente. Em meio complexo foi observado uma produção maior, sendo obtido para CBH II cerca de 100 mg/l. (PENTILLA *et alii*, 1988).

Além da questão da baixa concentração de proteínas exportadas, um outro problema apresentado por *S. cerevisiae* é a rigidez de sua parede. Devido a isso, para muitos peptídeos heterólogos, principalmente os de alto peso molecular, a maior parte do produto secretado fica no espaço periplasmático, o que exige, a nível biotecnológico, o emprego de processos especiais para a recuperação da proteína (FILIPOVA *et alii*, 1986). Uma das técnicas propostas para contornar esse problema é o uso de mutantes com o envoltório celular frágil (FILIPOVA *et alii*, 1986).

Apesar dos esforços para melhorar a qualidade de *S. cerevisiae* como veículo de expressão, muitos grupos têm procurado outros organismos para esse fim. Entre esses

organismos pode-se citar a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e a espécie *K. lactis*.

Em *P. pastoris* GREGG *et alii* (1987) desenvolveram um processo para produção do antígeno de superfície do vírus da hepatite β , obtendo uma produtividade cerca de 10 vezes maior que a obtida para *Saccharomyces*. Em *Kluyveromyces* os processos ainda não alcançaram a escala de produção, porém a metodologia encontra-se estabelecida para muitos polipeptídeos (RIETVELD *et alii*, 1988). Quanto a *Kluyveromyces lactis*, as principais vantagens observadas em relação aos polipeptídeos exportados, foram a solubilidade, a alta atividade e a grande quantidade produzida, devendo poder alcançar níveis de gramas por litro em condições ótimas (RIETVELD, 1988). Resultados desse tipo são considerados excepcionais, acreditando-se haver poucos sistemas capazes de produzir mais que 100 ou 200 mg/l, em escala industrial. (VAN BRUT, 1986).

Apesar das investigações no gênero *Kluyveromyces* concentrarem-se principalmente em *K. lactis*, na questão específica da produção de peptídeos heterólogos, o mais provável é que outras espécies do gênero, com maior capacidade secretora, mostrem-se mais adequadas para desenvolvimento de processos com esse fim.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Para o trabalho foram utilizadas linhagens de *Kluyveromyces marxianus* originárias do Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (identificadas pela sigla IZD), e linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Levedura da ESALQ/USP.

3.2. Meios de Cultura

Os meios abaixo relacionados foram utilizados nesse trabalho tendo os seguintes objetivos: manutenção e crescimento das culturas, seleção de híbridos, caracterização de linhagens para a secreção e produção da inulinase para análises e eletroforese.

3.2.1. Meio Completo (YEPD)

Extrato de Levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Agar (para meio sólido)	2%

Esse meio foi utilizado para manutenção das culturas, para crescimento e para formação de placas mestras para seleção. O pH não necessita de correção, ficando na faixa de 6,5 a 6,8.

3.2.2. Meio sintético (SD)

Yeast Nitrogen Base (w/o aacs) 0,67%
 Glicose 2,00%
 Agar (para meio sólido)

O pH do meio foi ajustado para 6,8 com Na OH 1M. Esse meio foi utilizado na seleção de híbridos, na caracterização de mutantes e na formação de pré-inóculos.

Para caracterização dos mutantes foram adicionados os seguintes aminoácidos:

	CONC. FINAL (mg/l)
Arginina	20
Leucina	20
Metionina	20
Serina	375

3.2.3. Meios para secreção de inulinase

Para os testes de secreção foram utilizados variações do meio sintético, com adição de fontes de nutrientes complexos e substituição de fontes de carboidrato.

3.2.3.1. YNBC

YNB	0,67%
Carboidrato	0,9 %

O pH ajustado para 6,8 com Na OH 1M. As fontes de carboidrato variaram de acordo com o objetivo do ensaio, havendo sido utilizado inulina (I), glicose (G) e sacarose (S).

3.2.3.2. YNC

YNB	0,37%
Fonte de Nitrogênio	0,30%
Fonte de Carboidrato	0,50%

O pH ajustado para 6,8 com Na OH 1M. Para esses meios houve variação das fontes de nitrogênio, tendo sido utilizado extrato de levedura (Y), peptona (P), uréia (U), fontes de nitrato ou fontes de amônia. Não foi determinada a concentração de nitrogênio de cada fonte.

Os carboidratos também variaram de acordo com o objetivo do ensaio, tendo sido utilizados inulina (I), glicose (G) e sacarose (S).

3.2.4. Meio de "Killer" (K)

Consiste de YEPD acrescido de tampão citrato fostato autoclavado e de 4 mg/100 ml de azul de metileno.

Para o pH 4,9, utilizado nos testes, a concentração do tampão (v/v) é de 67 ml do tampão para 533 ml de YEPD.

Tampão citrato fosfato pH 4,5

Ácido Cítrico	14,07 g
$K_2 H PO_4$	18,96 g
Água Destilada	67 ml

Ajustado para pH 4,5 com os próprios constituintes.

3.2.5. Meio seletivo de regeneração (SDR_{reg})

É o meio utilizado para seleção de híbridos obtidos por fusão de protoplastos a partir de linhagens com marcas complementares. É o meio SD, preparado em Sorbitol 0,6M (10,92 g/l) para permitir a estabilidade osmótica dos protoplastos. O pH foi ajustado para 6,8 com Na OH 1M.

3.2.6. Meio completo de regeneração ($YEPD_{reg}$)

Utilizado para avaliar as taxas de fusão de protoplasto. É constituído pelo meio completo (YEPD), preparado em Sorbitol 0,6M (10,92 g/l) para permitir a estabilidade osmótica dos protoplastos.

Alguns outros meios, derivados desses apresentados, foram utilizados em alguns experimentos iniciais. Eles serão indicados no texto.

3.3. Soluções e Tampões

3.3.1. Solução salina

Solução de cloreto de sódio 0,89% em água destilada, distribuídas em frascos com 9 ml e autoclavada. Utilizada para diluições nos plaqueamentos.

3.3.2. Tampão fosfato pH 4,5

Solução de fosfato monobásico de potássio 0,05 M ajustado para pH 4,5 com Na OH 1N.

3.3.3. Tampão citrato fosfato

A partir das soluções 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato de sódio dibásico, foram feitos tampões com diferentes pHs segundo a Tabela abaixo, cuja molaridade final da solução variou entre 55,4 e 93,7 mM. Esses tampões foram utilizados para avaliação do comportamento da enzima em diferentes pHs, visando-se minimizar o possível efeito da molaridade da solução na atividade da enzima.

pH	ÁCIDO CÍTRICO (ml)	$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ (ml)
2,5	44,6	5,4
3,0	39,8	10,2
3,5	33,9	16,1
4,0	30,7	19,3
4,5	26,7	23,3
5,0	24,3	29,7
5,5	21,0	29,0
6,0	17,9	32,1
6,5	13,6	36,4
7,0	6,5	43,6

Completado com água destilada para 100 ml.

3.3.4. Soluções para fusão de protoplasto

3.3.4.1. EDTA

Solução de EDTA 10 mM.

3.3.4.2. Tampão sorbitol fosfato 0,6 M (TSP)

0,2 $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$	217,5 ml
0,2 $\text{NaH}_2 \text{PO}_4$	32,5 ml
Sorbitol	54,9 g

Ajustado para um volume final de 500 ml com água destilada.

3.3.4.3. Solução de enzima lítica

Solução de Zimoliase 2000 1 mg/ml em TSP.

3.3.4.4. Solução fusogênica

PEG 4000 8 g

Ca Cl 0,6 M 1 ml

Volume final 10 ml.

3.3.4.5. Solução de sorbitol 0,6 M

3.3.4.6. Solução de cloreto de cálcio 1,2 M

3.3.4.7. 2 Mercapto-etanol

Essas soluções, à exceção do 2 mercapto etanol, foram esterilizados por autoclavagem. A solução de enzima foi preparada após o resfriamento do TSP.

3.3.5. Solução para quantificação de proteínas

Dissolver 100 mg de Coomassie-Briliant-Blue G 250 (CBB - G 250) em 50 ml de etanol. Adicionar 100 ml de ácido fosfórico 85%. Diluir de 1:1 em água destilada antes do uso.

3.3.6. Reativo de Somogy

Dissolver 28 g de Na_2HPO_4 e 40 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNa} \cdot \text{C}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) em 700 ml de água destilada. Adicionar 100 ml de NaOH 1N, e em seguida gotear 80 ml de sulfato de cobre 10% na solução sob agitação constante. Acrescentar 180 g de Na_2SO_4 e completar o volume para 1 l. Deixar em repouso por 48 horas, filtrar e manter em recipiente escuro à temperatura ambiente.

3.3.7. Reativo de Nelson

Dissolver 25 g de molibdato de amônio em 450 ml de água destilada. Gotear 26 ml de ácido sulfúrico na solução sob agitação constante. Acrescentar 3 g de arseniato de sódio dissolvidos em 25 ml de água. Manter o reativo no escuro por 48 h, filtrar e completar o volume para 500 ml. Conservar a temperatura ambiente em recipiente escuro.

3.3.8. Solução de inulina

Solução contendo 0,3% de inulina, dissolvida à quente em tampão fosfato pH 4,5. Essa solução foi usada como substrato para medida da atividade da enzima. Para avaliação da atividade em diferentes pHs foi utilizado esse açúcar nas mesmas condições, porém diluído em tampão citrato-fosfato. Para determinação da atividade sobre sacarose foi utilizado

o mesmo tampão com substituição do açúcar na mesma concentração.

3.3.9. Solução padrão de glicose

Para calibração da concentração de açúcares redutores foi utilizada uma solução padrão de glicose 0,005%. Essa solução foi mantida em estoque a 1,0%, sendo diluída de 1/200 no momento da calibração. A solução estoque foi mantida em geladeira, tendo sido adicionado ácido benzóico para auxiliar na conservação.

3.3.10. Soluções para eletroforese

3.3.10.1. Estoque acrilamida - bis acrilamida (AB)

Acrilamida	30,0 g
Bis acrilamida	0,8 ml

Completar para 100 ml com água e filtrar.

3.3.10.2. Estoque do tampão inferior (TI)

Tris - amino - metano (TRIS)	181,7 g
------------------------------------	---------

Adicionar 500 ml de água, acertar o pH para 8,8 com HCl 1N e completar com água para 1 l.

3.3.10.3. Estoque do tampão superior (TS)

Tris - amino - metano 60,6 g

Adicionar 500 ml de água, acertar o pH para 6,8 com HCl 1N e completar com água para 1 l.

3.3.10.4. Estoque de sódio-dodecil-sulfato (SDS)

Solução de SDS a 10%

3.3.10.5. Solução de persulfato de amônio (PA)

Solução de persulfato de amônio a 10%. Deve ser preparada no momento da formação do gel.

3.3.10.6. Estoque do tampão de corrida (TC)

Tris - amino - metano 12,0 g

Glicina 57,6 g

Completar com água para 1 l.

3.3.10.7. Tampão da amostra (TA)

Tampão superior 12,5 ml

Glicerol 20,2 ml

Completar com água para 60 ml.

3.3.10.8. Tampão carregador

2 Mercapto etanol	0,50 ml
Azul de Bromofenol 0,1%	0,25 ml
SDS 10%	4,00 ml
Tampão da amostra	5,30 ml

3.3.10.9. Solução desnaturante

2. Mercapto etanol	1,0 ml
SDS 10%	8,0 ml
Tampão superior	2,25 ml

3.3.10.10. Fixador

Metanol	30 ml
Ácido acético	7 ml
Água	63 ml

3.3.10.11. Corante para proteína total

Coamassie Brilliant Blue R-250, na concentração de 0,05% diluído no fixados (3.3.10.10).

A água utilizada para todas as soluções deve ser deionizada.

3.3.11. Solução padrão de Albumina

Solução de albumina sérica em água com 1 mg/ml, utilizada na construção da curva padrão para determi-

nação de concentração de proteína. Solução mantida no congelador.

3.3.12. Solução de autólise

Clorofórmio	1 ml
Tolueno	1 ml
Suspensão celular	20 ml

A suspensão celular com concentração de células de 100 mg/ml.

3.4. Procedimentos

3.4.1. Esterilização

Os meios foram esterilizadas por autoclavagem a 1 atm de pressão por 20 minutos.

As soluções estoque de aminoácidos e padrão de glicose foram mantidas em refrigerador. A solução estoque de padrão de albumina foi mantida em congelador. As demais soluções foram mantidas à temperatura ambiente, não sendo contamináveis.

3.4.2. Incubação

A incubação das culturas em placas foi feita em estufas tipo BOD (Fanem) na temperatura de 30°. As incubações em meio líquido foram feitas com 30 ou 50 ml de

meio, em Erlenmeyers de 250 ml, sob agitação de 200 rpm e temperatura de 32°C.

3.4.3. Multiplicação do inóculo

Para todos os ensaios foram utilizados como inóculo alíquotas de culturas crescidas por 24 horas em YNB, sendo esse meio complementado com aminoácidos específicos no caso de linhagens auxotróficas.

3.4.4. Avaliação do Crescimento celular

Feita através da medida de densidade ótica das culturas ($\lambda = 520$ nm), multiplicado pela diluição feita nas mesmas, ou através da contagem de células em câmara de Neubauer.

3.4.5. Avaliação da atividade inulinolítica

Feitas através da quantificação do açúcar redutor (AR) no meio, resultante da atividade enzimática da amostra sobre o substrato (inulina ou sacarose). O procedimento padrão seguiu os princípios da análise de açúcar redutor determinados por SOMOGY (1952) e NELSON (1984), apresentados a seguir.

Inicialmente as linhagens foram cultivadas por 24,48 ou 72 h. Após esse período de incubação as culturas

foram centrifugadas e separadas em duas fases: O sobrenadante e as células. Para avaliação da atividade extracelular usou-se como amostra o sobrenadante, e para atividade celular às células inteiras, após lavagens por 3 vezes em tampão fosfato (3.3.2).

Para medida da atividade, retira-se 1 ml da solução enzimática a ser testada (celular ou extracelular) e incuba-se, durante 10 minutos a 30°C, com 5 ml da solução de inulina (3.3.8). Após esse tempo retira-se uma alíquota de 1 ml dessa solução para um novo tubo, e adiciona-se 1 ml de reativo de Somogy (3.3.6), o que paralisa a hidrólise. Ferve-se por 15 minutos, resfria-se a solução e adiciona-se 1 ml do reativo de Nelson (3.3.7). Completa-se o volume do tubo para 10 ml com água (tubo A). Para avaliar a quantidade de açúcar redutor anteriormente existente no meio, prepara-se um novo tubo (B) seguindo a mesma metodologia anterior, porém fervendo-se o extrato enzimático por 10 minutos antes da adição da solução de inulina.

Um padrão de glicose (3.3.9) é utilizado para correspondência dos valores de absorção com a concentração de açúcar redutor no meio. Para prepara-lo adiciona-se a 1 ml do padrão, 1 ml do reativo de Somogy e segue-se, a partir desse passo, o procedimento anterior. Da mesma forma é utilizado um "branco" geral com a finalidade de zerar o medidor de densidade ótica (espectrofotômetro ou fotolorímetro). No preparo desse branco utiliza-se 1 ml de água destilada em substituição ao padrão de glicose.

A densidade ótica (DO) é medida no comprimento de 520 mm, e para se obter a atividade enzimática a partir dessas leituras temos as seguintes relações:

$$\Delta = \text{D.O. do Tubo A} - \text{D.O. do Tubo B}$$

$$K = \frac{C \cdot d \cdot D}{t}$$

$$\text{Atividade} = \frac{K}{P} \cdot \Delta$$

onde:

Δ = Diferenças de densidade óticas entre Tubos A e B.

C = Concentração molar do padrão de glicose (em μM) = 277,78.

d = Diluições feitas durante o processo = 6.

D = Diluição do extrato enzimático.

t = Tempo da reação (em minutos).

P = Densidade ótica do padrão de glicose.

A unidade de atividade (UD) resultante desses cálculos corresponde a nMoles de AR liberados por minuto em 1 ml meio, como consequência da hidrólise enzimática.

3.4.6. Avaliação da estabilidade da enzima

Para verificar a estabilidade da enzima, o sobrenadante da cultura foi filtrado por milipore, e em intervalos definidos foi medido a atividade desse filtrado. O valor da estabilidade para um determinado intervalo foi dado pela relação entre essa atividade e a atividade inicial.

3.4.7. Identificação do pH ótimo para atividade

Para identificação desse parâmetro, a atividade enzimática foi determinada utilizando o tampão citrato-fosfato (3.3.3), em diferentes valores de pH, na preparação da solução de inulina (3.3.8).

3.4.8. Medida de resistência térmica

Para avaliar a temperatura de inativação da enzima, colocou-se as amostras, antes da medida da atividade enzimática, por 10 minutos em banho maria a diferentes temperaturas.

3.4.9. Quantificação de proteínas

Feita segundo metodologia para quantificação de BRADFORD (1976). Consiste da adição de volumes de amostras a serem testadas, a tubos de ensaio contendo 5 ml da solução 3.3.5. Da mesma forma, adiciona-se volumes do padrão de albumina (3.3.11), cuja concentração proteica é conhecida, para a construção da curva padrão.

A determinação da quantidade de proteína é feita a partir da medição da absorbância das amostras obtidas em espectrofotômetro com $\lambda = 595 \text{ nm}$, e do relacionamento dessas medidas com as aferidas para a curva padrão.

3.4.10. Eletroforese de proteínas: SDS - PAGE e proteínas não desnaturadas

A eletroforese de proteínas foi feita utilizando um sistema vertical descontínuo de dois géis: um superior (empilhador) e um inferior (separador). A metodologia empregada foi basicamente a descrita por LAEMMLI (1970), com modificações.

Inicialmente arma-se as placas de vidro em paralelo, sendo essas separadas por espaçadores de acrílico com espessura entre 0,8 e 1,0 mm. Essa estrutura é mantida por presilhas e o contato entre o vidro e os espaçadores é selado com agar 0,8%. Após esse selamento adiciona-se o gel inferior, cuja concentração de acrilamida é variável. Na Tabela abaixo encontra-se a composição para as concentrações de 8 a 10%, com volume final de 40 ml.

	CONCENTRAÇÃO DE ACRILAMIDA		
	8	10	12
TI (3.3.10.2)	10 ml	10 ml	10 ml
SDS (3.3.10.4)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
AB (3.3.10.1)	10,6 ml	13,6 ml	16,0 ml
Água	18,5 ml	15,8 ml	13,1 ml
PA (3.3.10.5)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Temed	10 ml	10 ml	10 ml

Para a polimerização, após a adição do gel coloca-se numa lâmina de SDS 1% sobre o mesmo, o que evita o

contato com o ar. Após a polimerização, retira-se a solução de SDS e coloca-se o gel superior, tendo sido esse utilizado sempre na concentração de 4,5% de acrilamida.

	CONCENTRAÇÃO DE ACRILAMIDA
	4,5%
TI (3.3.10.2)	2,5 ml
SDS (3.3.10.4)	0,1 ml
AB (3.3.10.1)	1,5 ml
Água	5,4 ml
PA (3.3.10.5)	0,1 ml
Temed	10 ml

Após a colocação dessa fase do gel, encaixa-se o pente na borda superior do vidro, o qual servirá para a formação das canaletas de colocação de amostra. Terminada a polimerização, retira-se o pente e limpa-se as canaletas com SDS 1% ou com água deionizada.

A precipitação das proteínas foi feita com acetona (-20°C), na proporção de 2:1 em relação ao sobrenadante do meio de cultura. As amostras, para a corrida, foram preparadas com a ressuspensão das proteínas precipitadas em tampão inferior (3.3.10.2), diluído 10 vezes.

Aliquotas dessa suspensão foram usadas para quantificação de proteínas para a corrida, sendo as amostras ajustadas para valores entre 20 a 100 mg por canaleta. Ao volume relativo a essas quantidades foi adicionado igual

volume de tampão carregador (3.3.10.8), e as amostras foram colocadas em banho maria fervente por 5 minutos. Após esse tratamento as amostras foram aplicadas às canaletas, sendo também utilizado um padrão de peso molecular. Esse padrão continha polipeptídeos de 94 Kd (fosforilase B), 67 Kd (albumina bovina), 43 Kd (oscoalbumina), 30 Kd (anidrase), 20,1 Kd (inibidor da tripsina) e 14,4 Kd (α - lacto albumina). Nesse ponto a armação foi ajustada à cuba de corrida, e os tanques preenchidos com tampão de corrida (3.3.10.6) diluído 4 vezes, ao qual foi adicionado SDS 10% na concentração de 10 ml/l. Após o preenchimento dos tanques, a cuba foi levada ao refrigerador e ligada à fonte de voltagem. Para a corrida são utilizados duas voltagens: uma inicial de 100 V, que permanece até a frente do corante atingir o gel separador, e uma final de 200 V, que permanece até o fim da corrida.

Terminado o processo, as placas de vidro são desmontadas, o gel superior é descartado, e o inferior colocado na solução de corante (3.3.10.11), onde permanece por cerca de 12 h à temperatura ambiente. Daí inicia-se a descoloração, com a retirada do corante e adição do fixador (3.3.10.10). Esse fixador é substituído quantas vezes forem necessárias, até a descoloração total das regiões do gel onde não há proteína.

O processo descrito acima é utilizado com o objetivo de desnaturar e separar cadeias polipeptídicas. Para a eletroforese com proteínas na conformação nativa pode-se utilizar a mesma metodologia e soluções, sendo porém

substituído os volumes relativos à SDS e 2. mercapto etanol por água deionizada. Além disso, a etapa da fervura das amostras é desconsiderada.

3.4.11. Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional foi feita com o uso dos dois sistemas anteriores.. Inicialmente procedeu-se uma eletroforese de proteínas não desnaturadas, com uso de espaçadores de 0,8 mm e preenchimento de três canaletas por amostra. Após essa eletroforese, o gel foi cortado em tiras relativas a cada uma das canaletas, sendo que para cada amostra uma tira foi corada e outra utilizada para segunda dimensão.

A tira utilizada para a segunda dimensão foi mantida por 2 h na solução desnaturante (3.3.10.11), à temperatura ambiente. Após a desnaturação, a tira foi aplicada à borda superior do gel para corrida SDS - PAGE, sendo feitos duas canaletas lateralmente à essa, onde correu uma outra alíquota da amostra original e o padrão de peso molecular. Essa corrida foi conduzida da forma normalmente empregada para o sistema SDS (3.4.10).

3.4.12. Localização da enzima no gel

Para localização da enzima no gel, a tira referente à corrida da amostra em eletroforese não desnaturan-

te foi cortada em intervalos de 3 mm, e cada uma dessas frações dividida em duas partes. Nessas pequenas divisões, A e B, procedeu-se a avaliação da atividade enzimática da forma descrita no item 3.4.5..

3.4.13. Cálculo do peso molecular aparente dos polipeptídeos das amostras

O peso molecular aparente (PMA) dos polipeptídeos, representados pelas bandas eletroforéticas, foi calculado a partir do peso molecular dos padrões, em uma relação logarítmica com a distância percorrida no gel.

3.4.14. Avaliação densitométrica dos géis

Para avaliação da relação de concentração entre bandas, alguns géis foram analisados densitometricamente no densitômetro modelo ARGOS 7 (TECNAW).

3.4.15. Avaliação do caráter "Killer"

Para avaliação do caráter "Killer", plaqueou-se a linhagem sensível AH 22 de *Saccharomyces cerevisiae* em meios K (3.2.4). Após a secagem da cultura, cultivou-se sobre essa as linhagens a serem testadas. As placas foram incubadas por 24 horas, e avaliadas quanto à existência de halo de inibição, o que caracteriza a linhagem "Killer".

3.4.16. Cruzamentos

3.4.16.1. Natural

Para o cruzamento natural, mistura-se sobre uma placa de YEPD (3.2.1) inóculos do tipo "ponta de palito" de cada uma das linhagens, essas com marcas diferentes. Após 48/72 horas de incubação os cruzamentos são passados para salina (3.3.1), e alicotas dessa suspensão utilizadas para plaqueamento em SD (3.3.2). Os híbridos foram recuperados desse meio após 48/72 h, e repicados para YEPD (3.2.1).

3.4.16.2. Fusão de protoplastos

A esferoplastização e fusão de protoplastos, seguiram o protocolo normalmente utilizado para *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (GUNGE & SAKAGUCHI, 1981), com modificações.

Inicialmente cultivou-se as linhagens em 50 ml de YEPD até as células atingirem a fase exponencial (1 a $2 \cdot 10^8$). As células foram coletadas por centrifugação a 5000 g e lavados 2 vezes EDTA 10 mM, sendo ressuspensas nessa solução para uma densidade de $5 \cdot 10^8$ cel./ml. Aliquotas dessa ressuspensão foram plaqueados em YEPD e em meio seletivo, para verificar taxas de reversão. A essa suspensão adicionou-se 50 ml de 2-mercapto etanol, e incubou-se por 10 minutos a 30°C. As células foram novamente lavadas com

EDTA 10 mM, centrifugadas e ressuspendidas em 3 ml de TSP (3.3.4.2). A essa suspensão foi adicionado 1 ml da enzima lítica (3.3.4.3), sendo a solução incubada por 20-30 minutos a 35°C. Durante esse período de incubação a formação dos protoplastos foi monitorada por observações em microscópio e por teste com SDS 1%. No final da incubação foram obtidas taxas de protoplastização entre 80 e 90%.

A suspensão foi centrifugada a 2000 g e lavada 3 vezes com sorbitol 0,6 M. Após a última lavagem, as células foram cuidadosamente ressuspendidas nessa solução, e passadas para um novo tubo com o auxílio de um pipetador automático de 500 ml e ponteiros estéreis com ponta cortada. As células foram precipitadas sob centrifugação de 1000 g e ressuspendidas em 500 ml de sorbitol 0,6 M.

As linhagens a serem fundidas foram juntadas em um mesmo tubo, e adicionou-se 0,1 ml de CaCl_2 1,2 M. Incubou-se durante 30 minutos e acrescentou-se 1,2 ml de PEG 80%, sendo a suspensão misturada com bastão de vidro, e posteriormente incubada por 40 min. a 30°C.

As células foram lavadas 3 vezes com sorbitol 0,6 M e plaqueadas em meio SD_{reg} (3.2.5). Sobre o plaqueamento foi colocado uma pequena quantidade do mesmo meio, para evitar o contato do protoplasto com o ar. Da mesma forma, foi feito o plaqueamento em YEPD_{reg} (3.2.6) para verificar a sobrevivência dos protoplastos. As placas foram incubadas por 5 a 7 dias a 30 °C.

3.4.17. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram montados segundo o delineamento de blocos ao acaso, sempre com 3 repetições por tratamento. As análises foram conduzidas segundo os modelos inteiramente casualizado e fatorial. As comparações de médias foram feitas pelo teste de Tukey, a 5% de significância (PIMENTEL GOMES, 1982).

3.4.18. Autólise

A autólise das células, para retirada da enzima de parede, foi feito com o crescimento das células em 50 ml de YYI (YNB 0,37% + extrato de levedura 0,30% + inulina 0,5%), lavagem das células em tampão fosfato (3.3.2), e suspensão das células nesse tampão. Uma alíquota de 20 ml dessa suspensão, com 100 mg de célula por ml, foi retirada, e a ela foi adicionado 1 ml de clorofórmio e 1 ml de tolueno (3.3.2). As células foram mantidas por 24 horas sob agitação, centrifugadas e a atividade do sobrenadante foi avaliada. Posteriormente foi precipitada a proteína desse sobrenadante, sendo essa utilizada preparada para eletroforese (3.4.10).

3.4.19. Avaliação da fragilidade da parede

A fragilidade da parede foi avaliada a partir da resistência das células ao tratamento com enzima lítica. O procedimento seguiu as etapas da formação do protoplasto (3.4.16.2), sendo utilizada a enzima zimoliase 2000 na concentração de 2,5 mg/ml em tampão sorbitol fosfato 0,6 M. A avaliação do rompimento foi feita por centrifugação, e pela estimativa da redução da densidade de células via microscopia.

4. RESULTADOS

A apresentação dos resultados será feita em quatro etapas: caracterização das linhagens utilizadas; características da atividade inulinolítica; causas da variação da atividade inulinolítica e características da exportação de proteínas. As diferenças entre as médias obtidas nos experimentos, serão representadas, quando significativas, através de diferentes letras.

4.1. Caracterização das Linhagens Utilizadas

O trabalho foi iniciado com a seleção de 3 linhagens de *K. marxianus*, as quais apresentaram características adequadas para a análise do sistema inulinase. As linhagens foram a IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, essa última anteriormente classificada como *K. fragilis*.

Em relação às características gerais das linhagens (Tabela 1), a IZ 1339 é Killer, possui atividade inulinolítica relativa classificada como baixa, e é desreprimida catabolicamente em relação a hexoses. Em diversas oportunidades, quando cultivada em meio mínimo, apresentou forte pigmentação vermelha, caráter esse que não

persistiu quando as células foram repicadas para meio complexo. A IZ 619 é não Killer, possui a maior atividade inulinolítica entre as linhagens testadas, e é desreprimida parcialmente. A linhagem IZ 610 é também não Killer, possui uma atividade semelhante à IZ 1339 e apresenta-se reprimida para inulinase na presença de hexoses. Mutantes auxotróficos para essas linhagens (Tabela 1) foram utilizados para a obtenção dos híbridos. A provável ploidia das linhagens (Tabela 1) foi estabelecida a partir da observação da formação de ascas em células submetidas à meio com rafinose e acetato.

O valor da atividade enzimática variou bastante entre ensaios, havendo porém constância em relação às tendências. Devido a essa variação, o valor específico das atividades será considerado para as condições de cada experimento apresentado.

Tabela 1 - Características gerais das linhagens de *K. marxianus* utilizados no trabalho.

LINHAGENS	MUTANTE	PLOIDIA	ATV.	REPRESSÃO	KILLER
IZ 1339	Km 9(met ⁻)	n	Baixa	Desreprimida	+
IZ 619	Km 21(arg ⁻)	n	Alta	Semireprimida	-
IZ 610	Kf 4(ser ⁻)	2n	Baixa	Reprimida	-

4.2. Características da Atividade Inulinolítica

Inicialmente foi avaliado o padrão de crescimento das linhagens, a estabilidade da atividade inulinolítica

tica e o período de produção da enzima no crescimento da cultura. O meio utilizado foi o YEPD, com substituição da glicose por inulina a 0,5%.

Em relação à estabilidade da enzima (3.4.6), o sobrenadante da cultura manteve a atividade inicial por pelo menos 48h, período máximo testado. Na Figura 1 observa-se as curvas de crescimento das três linhagens, juntamente com os valores das suas atividades, e na Tabela 2 os valores da atividade nos tempos 12, 24 e 48 h. Na Tabela 3 encontra-se os valores do tempo de geração para os períodos de 0 a 6, 6 a 12 e 12 a 24 h, e na Tabela 4 a taxa de incremento da atividade no tempo.

Figura 1 - Curvas de crescimento e evolução da atividade inulinolítica extracelular das linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610.

Tabela 2 - Atividade inulinolítica extracelular de linhagens de *K. marxianus* em diferentes períodos de crescimento. (ATV. = UD).

LINHAGENS	T E M P O h			
	0	12	24	48
IZ 1339	0,00	0,00	14,81 ^a	444,42 ^a
IZ 610	0,00	0,00	18,52 ^a	296,28 ^a
IZ 619	0,00	0,00	407,39 ^b	1574,00 ^b

* Meio completo (3.2.1) com substituição de glicose (2%) por inulina (0,5%).

Tabela 3 - Cinética de crescimento das linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, e os tempos necessários para alcançar a fase estacionária (F.E.).

LINHAGENS	I N T E R V A L O h			
	0-6	6-12	12-24	F.E.
IZ 1339	1h 38'	2h 00'	-	13h 15'
IZ 610	1h 40'	1h 55'	-	12h 58'
IZ 619	3h 47'	5h 10'	2h 47'	24h 15'

Tabela 4 - Taxa de incremento da atividade inulinolítica extracelular das linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610 (Incremento = Δ atividade/tempo).

LINHAGENS	P E R Í O D O	
	12-24 h	24-48 h
IZ 1339	1,23 U/h ^a	17,90 U/h ^a
IZ 619	33,95 U/h ^b	48,60 U/h ^b
IZ 610	1,54 U/h ^a	11,57 U/h ^a

Para a caracterização das faixas de temperatura e pH de atividade da enzima, os ensaios foram realizados com alíquotas do sobrenadante da cultura de IZ 619, crescida por 48 h em YYI (3.2.3.2). A escolha dessa linhagem deveu-se aos maiores valores de hidrólise que a mesma apresenta, tendo sido aumentado, com essa seleção, a capacidade de detectar variações no comportamento da inulinase nas diferentes condições de pH e temperatura, o que se expressa pela variação da atividade.

Com relação à resistência térmica, os valores de atividade após o tratamento de inativação (3.4.8) estão apresentados na Tabela 5 e Figura 2.

Tabela 5 - Inativação térmica da enzima extracelular de IZ 619. (Valores em atividade: U).

	T E M P E R A T U R A					
	30	40	50	60	70	80
Atividade	637,85 ^c	670,77 ^c	403,29 ^b	12,34 ^a	0,00	0,00

Figura 2 - Curva da inativação térmica da enzima extracelular de IZ 619 (atividade em UD).

Os valores da atividade em diferentes pHs mostraram grande variação quanto às características do tampão utilizado na preparação da solução de inulina (3.3.8). Na Figura 3 observa-se os resultados da variação da atividade em tampão citrato fosfato, sem concentração molar definida. Na Figura 4, os resultados da variação em tampão citrato fosfato (3.3.3), com concentração molar aproximadamente constante em todo o gradiente, (para valores de pH acima de 7,0 não foi possível manter a molaridade). A Tabela 6 apresenta esses resultados, juntamente com o valor da atividade em pH 4.5 (tampão fosfato - 3.3.2).

Figura 3 - Curva de atividade em gradiente de pH ajustado por tampão citrato fosfato com molaridade variável. Enzima extracelular de IZ 619.

Figura 4 - Curva de atividade em gradiente de pH ajustado por tampão citrato fosfato com molaridade constante. Enzima extracelular de IZ 619.

Tabela 6 - Valores da atividade em diferentes pHs ajustados por tampões em diferentes condições. Enzima extracelular de IZ 619. (atividade em U).

T A M P Õ E S			
pH	CITRATO FOSFATO ¹	CITRATO FOSFATO ²	SÓDIO FOSFATO
2,0	0,0	0,0	-
2,5	38,88 ^a	24,69 ^a	-
3,0	288,88 ^d	49,38 ^a	-
3,5	289,50 ^d	24,69 ^a	-
4,0	299,99 ^d	65,84 ^a	-
4,5	299,99 ^d	164,61 ^a	592,58
5,0	172,22 ^c	197,52 ^a	-
5,5	255,55 ^d	415,63 ^b	-
6,0	325,92 ^e	1.259,25 ^d	-
6,5	274,07 ^d	784,96 ^c	-
7,0	172,22 ^c	526,74 ^{b^c}	-
7,5	96,29 ^b	263,20 [*]	-
8,0	44,44 ^a	43,18 [*]	-
8,5	0,00	0,00 [*]	-

¹ Sem molaridade definida.

² Com molaridade definida e aproximadamente constante.

* Esses valores não foram obtidos em soluções com concentração constante.

A linhagem IZ 619 foi também utilizada para identificação do padrão eletroforético da enzima. Para tal, as células foram crescidas por 48 h em meios nos quais apresentavam ou não atividade extracelular. A proteína do sobrenadante dessas amostras foi precipitada e utilizada para 3 tipos de eletroforese em poliacrilamida: sem SDS (3.4.10); com SDS (3.4.10) e bidimensional (3.4.11). Na eletroforese

sem SDS as amostras com atividade são facilmente distinguíveis das sem atividade, por apresentarem, na parte superior do gel, uma banda (A) com cerca de 15 mm de largura. Na amostra sem atividade essa banda não ocorre, porém nelas observa-se uma banda (B) com boa definição na parte inferior do gel (Figura 5). Conforme descrito no item 3.4.12, foi medida a atividade enzimática ao longo do padrão eletroforético das amostras. Essa avaliação determinou a existência de atividade inulinolítica na banda que ocorre na parte superior do gel (Figura 6) da amostra com atividade. Na Figura 7 encontra-se o padrão densitométrico dos géis, nos quais foram medidas as áreas dos picos relativos às bandas (Tabela 7).

Figura 5 - Eletroforese sem SDS de 2 amostras do sobrenadante de IZ 619. (1) sem atividade; (2) com atividade (50 mg de proteína por amostra).

Figura 6 - Medida da atividade inulinolítica ao longo do gel de acrilamida sem SDS. Eletroforese da amostra de IZ 619 com atividade.

Figura 7 - Análise densitométrica das amostras sem (1) e com (2) atividade de IZ 619 (relativa a eletroforese da Figura 5).

Tabela 7 - Valores das áreas estimadas para as medidas densitométricas das bandas da eletroforese de proteínas do sobrenadante de amostras com e sem atividade.

BANDA	A M O S T R A S ¹			
	1		2	
	VALOR (mm ²)	%	VALOR (mm ²)	%
A	67	57	332	86
B	16	14	8	2,1
Total	117	100	388	100
Relação A/B	4,18		41,50	

¹ Amostras: 1 sem atividade; 2 com atividade.

Para avaliação do número de cadeias polipeptídicas da enzima identificada no gel sem SDS, foi realizado uma eletroforese bidimensional (3.4.11), sendo a 1^a dimensão uma repetição da corrida sem SDS da amostra 2, e a 2^a dimensão uma corrida com SDS da tira do gel correspondente à 1^a dimensão. Pelo padrão eletroforético do gel resultante desse procedimento (Figura 8), determinou-se a localização da enzima para as posteriores eletroforeses em poliacrilamida com SDS.

Figura 8 - Segunda dimensão com SDS, da amostra de proteína extracelular de IZ 619 apresentando atividade.

(1) Banda da inulinase. (A) amostra submetida à desnaturação; (P) padrão de peso molecular; (B) amostra submetida à primeira dimensão e desnaturação.

Uma nova corrida com SDS foi realizada com 4 amostras, duas com atividade e duas sem, visando a identificação de outras proteínas presentes no sobrenadante (Figura 9). Para essa eletroforese foram corridas duas repetições de cada amostra, uma com 40 mg e outra com 20 mg de proteína por canaleta. A redução da quantidade de proteína visou melhorar a definição da banda relativa à inulinase. Na Tabela 8 encontra-se o peso molecular aparente (PMA) dos polipeptídeos identificados no gel da Figura 9. As diferenças observadas entre as amostras com e sem atividade

foram a maior largura e intensidade da banda relativa à inulinase nas amostras com atividade, e a ocorrência de duas bandas de baixo peso molecular (15 e 14,4 Kd) nas amostras sem atividade. Além dessas duas bandas, com boa definição, as amostras sem atividade apresentaram um rastro na parte inferior do gel.

Pela análise densitométrica desses géis, determinou-se que nas amostras com atividade a banda relativa à inulinase (PMA = 94 Kd) corresponde a cerca de 85% dos polipeptídeos exportados. Em amostras sem atividade, obtidas pelo crescimento das células em meio SD (3.2.2), essa banda representa apenas cerca de 20%. Ainda com o objetivo de confirmar a localização da inulinase no gel, foram feitas eletroforeses com as proteínas do sobrenadante da cultura de IZ 610, reprimível, crescida com e sem condições de repressão. Na Figura 10 encontra-se o resultado da corrida, e observa-se a presença da banda de 94 Kd apenas na amostra em condições de não repressão. As 3 linhagens, IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, apresentaram o mesmo padrão eletroforético para as proteínas extracelulares, e o mesmo PMA para a inulinase. Quando a eletroforese foi feita sem a prévia quantificação de proteínas para a corrida, ou seja, apenas tomando-se iguais volumes das amostras, observou-se que a amostra de IZ 619, que apresentou maior atividade, determinou uma faixa com grande largura e intensidade. Essa característica, inclusive, foi responsável pela deformação do gel (Figura 10).

Figura 9 - Padrão eletroforético de 4 amostras de proteína extracelular de IZ 619 (Amostras 1 e 4 sem atividade; 2 e 3 com atividade; Série da esquerda com 20 mg de proteína por amostra; série da direita com 40 mg/amostra).

Tabela 8 - Peso molecular aparente dos polipeptídeos de 4 amostras de proteína extracelular de IZ 619. (amostra 1 e 4 sem atividade; amostras 2 e 3 com atividade).

A M O S T R A S				
PMA	1	2	3	4
94,0	+	++	++	+
67,0	+	+	+	+
59,5	+	+	+	+
53,0	+	+	+	+
49,0	+	+	+	+
43,0	+	+	+	+
35,5	+	+	+	+
31,5	+	+	+	+
17,8	+	+	+	+
15,0	+	-	-	+
14,4	+	-	-	+
Rastro	+	-	-	+

+ Ocorrência da banda/++ banda de maior intensidade.

- Não ocorrência da banda.

As linhagens crescidas em YNB (3.2.2) não apresentaram atividade extracelular, o que será apresentado com maior detalhe posteriormente. Apesar disso, as linhagens inoculadas nesse meio, tendo inulina como fonte de carbono, cresceram normalmente, o que aponta para a existência de atividade inulinolítica a nível de parede. Na Tabela 9 observa-se a evolução do crescimento e os valores de atividade para as culturas de *S. cerevisiae* e IZ 619 em diferentes meios. Nela verifica-se o efeito de fontes de nutrientes complexas, ou concentração desses nutrientes, no crescimento da cultura e no aumento da atividade inulinolítica. Quanto as fontes de carbono, observa-se que *S. cerevisiae* apresenta crescimento reduzido quando o açúcar do meio é inulina, não havendo, nessas condições, alterações para esse parâmetro quando há modificação das outras fontes de nutrientes. Para a linhagem IZ 619 observa-se que o tipo de fonte de carbono é indiferente para o crescimento celular, sendo porém determinante para os valores da atividade inulinolítica em YEPD. Quando IZ 619 é crescida em YNB só ocorre atividade a nível de parede, enquanto que em YEP ocorre também a extracelular. Quando a fonte de carbono é alterada de glicose para inulina, há aumento da atividade celular em YNB e da extracelular em YEP (Tabela 10).

Para *S. cerevisiae* observou-se que quando a linhagem FF é crescida em meio com sacarose, as células inteiras apresentam atividade hidrolítica sobre esse açúcar,

cujo valor atingiu 355,57 U/ml min. Nessas condições não houve atividade hidrolítica sobre inulina, e nem atividade extracelular sobre qualquer dos dois açúcares.

Pelo padrão eletroforético dos polipeptídeos da parede, determinado a partir da precipitação das proteínas após autólise das células (3.4.18), observou-se a existência da banda de 94 Kd, característica da inulinase extracelular (Figura 10), na linhagem IZ 619. O mesmo procedimento foi realizado para *S. cerevisiae* com objetivo de extrair a invertase da parede. Após a realização da autólise observou-se, no sobrenadante, atividade hidrolítica sobre sacarose cujo valor foi de 277,78 U/ml min. Com a eletroforese (acrilamida com SDS) da proteína desse sobrenadante não foi determinada nenhuma banda (Figura 10).

Para avaliação da fragilidade da parede de *K. marxianus* (3.4.19), foi comparado o efeito da enzima lítica zimoliase sobre as células de IZ 619 e *S. cerevisiae*. Na concentração de enzima descrita, 2,5 mg/ml, entre 10 e 20 minutos de tratamento é observado uma redução de cerca de 50% das células de IZ 619. Centrifugando-se a suspensão após esse tempo, já observa-se, no sobrenadante, a existência de grande quantidade de material provindo do rompimento de células. Para *S. cerevisiae* a densidade de células mantém-se praticamente inalterada para o tratamento, mesmo após o tempo de 1 a 2 h. Com a centrifugação dessas células a fase do sobrenadante apresentou-se limpa, o que é indicativo da integridade das mesmas.

Tabela 9 - Comparação do crescimento e atividade inulinolítica celular e extracelular, entre *S. cerevisiae* (FF) e *K. marxianus* (IZ 619).

LINHAGEM	MEIO ¹	AÇÚCAR ²	CRESCIMENTO ³		ATIVIDADE ⁴	
			0h	24h	CEL.	EXTRA.
FF	YNB	G	0,1	2,60	0,00	0,00
FF	YNB	I	0,1	1,56 ^a	0,00	0,00
FF	YEP	G	0,1	6,33 ^c	0,00	0,00
FF	YEP	I	0,1	1,04 ^a	0,00	0,00
IZ 619	YNB	G	0,1	4,94 ^a	94,01 ^a	0,00
IZ 619	YNB	I	0,1	4,68 ^a	399,56 ^b	0,00
IZ 619	YEP	G	0,1	7,89 ^b	987,17 ^c	1304,48 ^a
IZ 619	YEP	I	0,1	8,32 ^b	987,17 ^c	1715,81 ^b

¹ Meios: YNB (3.2.3.2); YEP (Extrato de levedura 0,5% peptona 1%).

² Açúcar: G = glicose; I = inulina.

³ Crescimento: Em unidades de densidade ótica multiplicado pela diluição.

⁴ Atividade: Em U, medida após 24 h de cultura.

As análises de significância estão consideradas dentro das linhagens.

Figura 10 -Padrão eletroforético do sobrenadante das culturas IZ 1339 (1), IZ 619 (2) e IZ 610 (3) apresentando atividade extracelular; IZ 610 em condições repressão (4) e não repressão (5). Proteínas de parede de *S. cerevisiae* (6) e de IZ 619 (7), (P) padrão de peso molecular.

4.3. Causas da Variação da Atividade Inulinolítica

Com o objetivo de obter um meio livre de proteínas para a avaliação do padrão eletroforético da inulinase extracelular, foi feita a substituição do YEPD (3.2.1) por SD (3.2.2), sendo observado a não existência de atividade extracelular quando dessa modificação. A partir daí foi testado o efeito de diversas fontes de nitrogênio na produção e/ou exportação da enzima.

Inicialmente foi avaliado o efeito que diferentes quantidades de extrato de levedura desempenham no aumento da produção da enzima e na exportação dessa. Para isso foi realizado um experimento variando-se a concentração desse componente no meio, porém mantendo-se a concentração final de nutrientes constante em 0,67%. Nas Tabelas 10 e 11 observa-se os resultados desse ensaio. Na hidrólise sobre sacarose, assim como sobre inulina, há um crescimento do valor da atividade proporcional ao aumento da concentração de extrato de levedura no meio de crescimento. As equações de regressão para a atividade total sobre os dois açúcares estão na Tabela 12, juntamente com o coeficiente de correlação. Na Figura 11 encontra-se a representação dessas retas, e na Figura 12 os gráficos do comportamento da atividade total, celular e extracelular. A atividade total considerada é a soma da celular e extracelular. Por esses resultados, observa-se a forte correlação existente entre os dois parâmetros, atividade total e concentração de extrato de levedura, e a redução da atividade de parede com o início da detecção da atividade extracelular. A relação de atividade sobre sacarose e inulina (índice S/I) mostrou-se variável, indo de 8,11 a 26,67. Um ponto a ser ressaltado é a constância no máximo de atividade celular detectada. Pela Tabela 11 observa-se que quando a atividade celular sobre inulina está em torno de 400 U inicia-se a exportação da inulinase, e o aumento da atividade total não determina aumento da atividade celular.

Dividindo-se os valores de atividade celular pelos de crescimento celular, obtém-se a atividade específica. Esse parâmetro mostra pequena variação entre as situações em que ocorre atividade extracelular no experimento. Na Tabela 11 se observa resultado semelhante, não havendo variação significativa da atividade específica quando ocorre alta atividade celular, inclusive para células crescidas em YNB.

Tabela 10 - Avaliação do crescimento celular de IZ 619 em várias concentrações de extrato de levedura. (açúcar utilizado no meio: inulina 0,5%).

MEIO ¹		CRESCIMENTO ²	
YNB(%)	YEC(%)	INICIAL	FINAL
0,67	0,00	0,1	3,81 ^a
0,57	0,10	0,1	4,07 ^{ab}
0,47	0,20	0,1	4,42 ^b
0,37	0,30	0,1	4,33 ^{ab}

¹ Meio: YNB (3.2.2); YE (extrato de levedura).

² Crescimento: em valores de densidade ótica após 48h de cultura.

Tabela 11 - Avaliação da atividade hidrolítica celular e extracelular de IZ 619 sobre sacarose e inulina, em várias concentrações de extrato de levedura (açúcar utilizado no meio: inulina 0,5%).

MEIO ¹		ATIVIDADE ²			
YNBC%	YEC%	CELULAR ¹		EXTRACELULAR ²	
		S	I	S	I
0,67	0,00	3.299,92 ^a	121,90 ^a	0,00	0,00
0,57	0,10	5.514,16 ^b	436,66 ^b	0,00	0,00
0,47	0,20	5.323,69 ^b	347,61 ^b	2.372,47 ^a	107,83 ^a
0,37	0,30	6.528,43 ^b	488,56 ^b	3.862,62 ^b	323,52 ^b

¹ Meio: YNB (3.2.2); YE (extrato de levedura).

² Atividade: em U; S = sacarose; I = inulina, medida após 48 h de cultura.

Tabela 12 - Equações da regressão e coeficiente de correlação para atividade total sobre sacarose e inulina, em relação ao aumento da concentração de extrato de levedura no meio de cultura.

SUBSTRATO	EQUAÇÃO ¹	r ²
Sacarose	y = 3206,88 + 23456,26 x	0,99
Inulina	y = 143,188 + 2089,03 x	0,92

¹ Equação: y = atividade esperada.
x = concentração de E.L. no meio em %.

Figura 11 - Representação das curvas de regressão para atividade hidrolítica total em IZ 619 em relação à concentração de extrato de levedura no meio de cultura (a) Atividade sobre sacarose; (b) atividade sobre inulina; os pontos representam a atividade observada.

Figura 12 - Representação do comportamento da atividade total, celular e extracelular de IZ 619, submetida a cultura em meio com concentrações crescentes de extrato de levedura (a) Atividade sobre sacarose; (b) atividade em inulina;

Devido aos altos valores de atividade apresentados por IZ 619 quando a cultura foi crescida em meio com 0,3% de extrato de levedura, esse valor de concentração foi adotado para testar outras fontes de nitrogênio. Para manter a concentração final de nutrientes em 0,67%, a fonte de nitrogênio a ser testada foi complementada com 0,37% de YNB (3.2.3.2). Na Tabela 13 encontra-se os valores de atividade celular e extracelular para IZ 619, tendo como fontes de nitrogênio o extrato de levedura, a peptona, o nitrato de potássio e a uréia. O tratamento YNB (0,67%) entrou como testemunha.

Pela análise da Tabela 13, observa-se que a uréia, a peptona e o extrato de levedura geraram aumento da atividade inulinolítica total e possibilitaram a exportação da inulinase a nível de meio de cultura. Comparando-se a peptona com o extrato de levedura, observa-se que essas fontes determinaram valores semelhantes para a atividade total, porém com a peptona ocorre menor exportação da enzima. Para uréia verifica-se que ela suporta um menor crescimento celular, porém determina um significativo aumento na atividade inulinolítica total, ocorrendo inclusive liberação da enzima para o meio. Os valores de atividade específica (atividade celular/crescimento celular) para uréia e peptona mostraram-se bastante semelhantes (31,04 e 38,42 respectivamente), e bem superiores aos apresentados para o extrato de levedura (19,77) e YNB (10,27). Comparando-se os valores de crescimento celular

para uréia e YNB, observa-se que não há correlação entre esse parâmetro e a capacidade de produzir e/ou exportar inulinase.

Outra fonte de nutrientes que demonstrou clara influência na atividade inulinolítica, foram os açúcares. As linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, foram crescidas em meio YNC (3.2.3.2) tendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose ou inulina como fonte de carbono. Na Tabela 14 encontram-se os valores de atividade para essas duas condições. Pela análise dessa tabela, observa-se o comportamento diferencial das linhagens quanto à atividade inulinolítica, na presença de glicose no meio. A IZ 1339 apresenta-se indiferente, não havendo variação significativa para as duas situações. A IZ 619 e IZ 610 apresentam-se sensíveis, sendo a IZ 619 parcialmente reprimível e a IZ 610 totalmente reprimível. Além da atividade enzimática, nesse experimento foram medidos os valores da proteína exportada para as diferentes situações (Tabela 15). Comparando-se os valores de atividade extracelular e proteína exportada (desconsiderando-se a atividade nula para IZ 610 crescida em glicose), obtém-se um coeficiente de correlação de 86,70%, o que mostra a grande contribuição da inulinase no montante das proteínas extracelulares.

Tabela 13 - Efeito das diversas fontes de nitrogênio no crescimento celular e atividade celular e extracelular de IZ 619 (fonte de carbono: inulina 0,5%).

MEIO ¹		CRESCIMENTO ²			ATIVIDADE ³	
YNB	N	I	F	C	E	T
0,67	-	0,1	4,25 ^b	43,66 ^a	0,00	43,66 ^a
0,37	KN	0,1	4,25 ^b	31,66 ^a	0,00	31,66 ^a
0,37	U	0,1	3,23 ^a	100,27 ^b	187,66 ^a	287,93 ^b
0,37	P	0,1	5,63 ^c	216,29 ^c	484,10 ^b	700,40 ^c
0,37	YE	0,1	5,72 ^c	113,10 ^b	619,15 ^c	732,12 ^c

¹ Meio: N = Fonte de nitrogênio a 0,3%;
 KN = Nitrato de potássio;
 U = Uréia;
 P = Peptona;
 YE = Extrato de levedura.

² Crescimento: Em valores de densidade ótica; I = Inicial e
 F = Final.

³ Atividade: C = Celular; E = Extracelular; T = Total; atividade em U medida após 48 h de cultura.

Tabela 14 - Atividade total, celular e extracelular para as linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, crescidos em meio com glicose ou inulina.

LINHAGENS	A T I V I D A D E ¹					
	TOTAL		CELULAR		EXTRACELULAR	
	G	I	G	I	G	I
IZ 1339	474,34 ^a	435,76 ^a	96,15 ^b	81,19 ^b	378,19 ^a	354,53 ^a
IZ 619	584,58 ^b	673,05 ^b	34,18 ^a	42,73 ^a	550,40 ^b	630,31 ^b
IZ 610	0,00	552,02 ^{ab}	0,00	39,26 ^a	0,00	512,80 ^{ab}

¹ Atividade: Em U; substrato inulina.
 G = Células crescidos em meio com glicose;
 I = Células crescidas em meio com inulina;

Tabela 15 - Valores de proteína exportada para as linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, crescidas em meio com glicose ou inulina.

LINHAGENS	P R O T E I N A E X P O R T A D A ¹	
	G	I
IZ 1339	65,18	66,97
IZ 619	69,14	75,26
IZ 610	42,60	73,19

¹ Proteína exportada: Valores em mg/ml no meio de cultura;
 G = Células crescidas em meio com glicose;
 I = Células crescidas em meio com inulina;

Devido à sensibilidade à glicose apresentada por IZ 619 e IZ 610, a influência dos açúcares no comportamento dessas linhagens foi estudado com maior detalhe.

Para IZ 619 a linhagem foi crescida em meio complexo (extrato de levedura 0,5% e peptona 1%), sendo os tratamentos constituídos por diferentes fontes de carbono: glicose (0,5%), sacarose (0,5%), inulina (0,5%) e glicose (0,2% + inulina (0,5%). Na Tabela 16 encontra-se a evolução do crescimento da linhagem nos diferentes tratamentos, e a média do tempo de geração para os períodos de crescimento. Na Tabela 17 encontram-se os valores da atividade inulinolítica extracelular nos diversos períodos de crescimento, e na Tabela 18 um índice relacionando os valores da atividade da Tabela 17 com os valores de crescimento da Tabela 16. A análise dos dados desse experimento mostra a menor velocidade inicial de crescimento

da cultura em meio apenas com inulina, e a maior atividade enzimática apresentada pelas culturas onde existe esse açúcar no meio. Pela Tabela 18 verifica-se claramente esse quadro, apesar de que observa-se, ao menos para a medida feita com 12 h de cultura, o efeito da glicose na redução da produção da enzima.

Tabela 16 - Avaliação do crescimento e tempo de geração de IZ 619 em meio com diversas fontes de carbono.

TRATAMENTOS	CRESCIMENTO*					T. DE GERAÇÃO	
	0 h	4 h	6 h	12 h	24	0-6	6-12
Glicose 0,5%	0,1	0,20 ^a	0,36 ^b	4,90 ^b	13,17 ^a	3h14'	1h35'
Sacarose 0,5%	0,1	0,15 ^a	0,29 ^b	4,70 ^b	13,24 ^a	3h54'	1h29'
Inulina 0,5%	0,1	0,14 ^a	0,22 ^a	2,33 ^a	14,00 ^a	3h54'	1h45'
Glicose 0,2%							
Inulina 0,5%	0,1	0,16 ^a	0,30 ^b	4,16 ^b	16,40 ^b	3h54'	1h35'

* Crescimento: Valores em medidas de densidade ótica x diluição.

Tabela 17 - Avaliação da atividade inulinolítica extracelular de IZ 619 em meio com diversas fontes de carbono.

TRATAMENTOS	A T I V I D A D E ¹					
	0	6	12	24	48	72
Glic. 0,5%	0,00	0,00	57,40 ^a	482,12 ^a	1749,92 ^a	1810,24 ^a
Sac. 0,5%	0,00	0,00	88,88 ^a	517,83 ^a	1984,28 ^a	2187,40 ^a
Inul. 0,5%	0,00	0,00	92,77 ^a	869,00 ^b	2724,88 ^b	2760,29 ^b
Glic. 0,2% +						
Inul. 0,5%	0,00	0,00	73,88 ^a	976,14 ^b	2932,16 ^b	3176,94 ^b

¹ Atividade: Em U; substrato inulina;

Tabela 18 - Relação das medidas de atividade inulinolítica extracelular e crescimento, da linhagem IZ 619, em culturas com diversas fontes de carbono.

TRATAMENTOS	RELAÇÃO ATIVIDADE/CRESCIMENTO ¹			
	12	24	48	72
Glicose 0,5%	11,71 ^a	35,25 ^a	128,95 ^a	133,40 ^a
Sacarose 0,5%	18,91 ^a	39,11 ^a	149,87 ^a	165,21 ^{ab}
Inulina 0,5%	38,81 ^b	62,07 ^b	187,49 ^b	197,16 ^b
Glicose 0,2% + Inulina 0,5%	17,75 ^a	59,52 ^b	178,79 ^b	193,91 ^b

¹ Atividade: Em U / crescimento em D.O.

A IZ 610 foi analisada de forma semelhante a IZ 619. Essa linhagem foi crescida em meio YNC (3.2.3.2) tendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose, sacarose, inulina, ou glicose (0,5%) + inulina (0,5%) como fonte de carbono. Para aumentar a capacidade de detecção da enzima, foi medida a atividade enzimática sobre sacarose e sobre inulina (Tabela 19). Pela análise da Tabela 19 observa-se a repressão por glicose, verificável através do resultado em meio com glicose e inulina, e a indução por inulina após 12 h de cultura, quando grande parte do açúcar redutor do meio já foi consumido. Em meio sem inulina é possível detectar atividade hidrolítica na parede (apenas sobre sacarose), porém o nível dessa é bem reduzido.

Além da inulinase, a espécie *K. marxianus* exporta para o meio de cultura pelo menos outra proteína

identificável: a toxina Killer. A linhagem IZ 1339, quando crescidas em meio de Killer (3.2.4) juntamente com uma linhagem sensível (no caso a AH 22 de *S. cerevisiae*), determina para essa última zonas de não crescimento de célula, denominadas halo de inibição. Para verificar o possível relacionamento nos níveis de secreção da inulinase e toxina Killer, foi realizado um experimento para avaliar o comportamento da atividade inulinolítica, sob condições em que a toxina certamente esta sendo exportada. Para isso a linhagem IZ 1339 for crescida em cultura isolada e consorciada com a linhagem AH 22, sendo medidos os valores de crescimento celular e atividade para os dois casos. Como testemunhas foram utilizadas culturas isoladas de AH 22 e de IZ 619, e a cultura consorciada dessas duas linhagens. Na Tabela 20 encontram-se os resultados de crescimento celular das culturas, e na Tabela 21 os valores da atividade inulinolítica extracelular, total e por 10^9 células. Pela análise dos resultados desse experimento, verifica-se que em culturas isoladas as linhagens possuem uma densidade final bem maior que quando em consórcio. Considerando-se os valores de crescimento das linhagens em consórcio como porcentagem do crescimento das linhagens isoladas, temos que IZ 619 cresce 90%, IZ 1339 77% e AH 22 43% e 0% (consórcio IZ 619 + AH 22 e IZ 1339 + AH 22 respectivamente). O fato de AH 22 permanecer praticamente com o mesmo número de células do inóculo, no consórcio IZ 1339 + AH 22, demonstra a existência da exportação de toxina para o meio.

Tabela 19 - Atividade celular e extracelular de IZ 610, sobre sacarose e inulina, em culturas crescidas com diversas fontes de carbono.

TRATAMENTOS	A T I V I D A D E ¹							
	12 hs				24 hs			
	Celular		Extra-celular		Celular		Extra-celular	
	S	I	S	I	S	I	S	I
Glicose 0,5%	0,00	0,00	0,00	0,00	786,66 ^a	0,00	0,00	0,00
Sacarose 0,5%	0,00	0,00	0,00	0,00	1.071,09 ^a	0,00	0,00	0,00
Inulina 0,5%	416,66	14,24	0,00	0,00	3.239,96 ^b	106,66 ^a	5.730,91 ^b	188,88 ^b
Glicose 0,25%+ +Inulina 0,25%	0,00	0,00	0,00	0,00	4.484,41 ^c	240,00 ^b	4.420,43 ^a	148,88 ^a

¹ Atividade: Em-U/ml min;
S: Sobre sacarose; I: Sobre inulina.

Tabela 20 - Crescimento celular das linhagens IZ 1339, IZ 619 e AH 22 em culturas isoladas e nos consórcios IZ 1339 + AH 22 e IZ 619 + AH 22 após 24 horas.

TRATAMENTO	NÚMERO DE CÉLULAS / ml	
	0 h	24 h
IZ 1339	$4,5 \cdot 10^5$	$1,137 \cdot 10^9$
IZ 1339 + AH 22	$4,5 \cdot 10^5 + 3,7 \cdot 10^4$	$0,875 \cdot 10^9 + 3,5 \cdot 10^4$
IZ 619	$4,5 \cdot 10^5$	$3,67 \cdot 10^8$
IZ 619 + AH 22	$4,5 \cdot 10^5 + 3,7 \cdot 10^4$	$3,325 \cdot 10^8 + 5,25 \cdot 10^7$
AH 22	$4,5 \cdot 10^5$	$1,225 \cdot 10^8$

Tabela 21 - Atividade inulinolítica extracelular total e por 10^9 células das linhagens IZ 1339, IZ 619 e AH 22, em culturas isoladas e nos consórcios IZ 1339 + AH 22 e IZ 619 e AH 22.

TRATAMENTO ³	A T I V I D A D E E X T R A C E L U L A R ¹	
	TOTAL	POR 10^9 CEL. ²
IZ 1339	126,48 ^b	111,24 ^b
IZ 1339 + AH 22	34,40 ^a	39,31 ^a
IZ 619	505,55 ^c	1375,64 ^c
IZ 619 + AH 22	550,00 ^c	1654,13 ^d
AH 22	0,00	0,00

¹ Atividade: em U;

² Por 10^9 células de IZ 1339 e IZ 619;

³ Células crescidas em meio com glicose.

Para IZ 1339 foi tentado obter a cura do caráter Killer através dos meios normalmente preconizados para *K. lactis*, que são a luz ultravioleta e o brometo de etídio. No presente trabalho o uso desses agentes, nas mais diversas condições, não determinou a cura de nenhuma célula detectada, tendo sido avaliadas mais de 10.000 colônias isoladas (uso de réplicas).

Devido às reduzidas taxas de cruzamento natural em *K. marxianus*, mutantes autotróficos das linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610 (Tabela 1) foram utilizados em cruzamentos, com vistas a possibilitar a identificação dos híbridos (prototróficos). As taxas de hibridação natural mostraram-se muito reduzidos, ficando em torno de 1 a $5 \cdot 10^{-7}$. A taxa de hibridização via fusão de protoplasto

também apresentou-se bastante reduzida, ficando em torno de 10^{-6} . Para efetuar esse procedimento de fusão a metodologia de formação dos esferoplastos teve que ser bastante modificadas, com drástica redução da concentração da enzima lítica utilizada, e redução da concentração de sorbitol para estabilização osmótica (3.3.4 e 3.4.16.2). As marcas met⁻ de Km 9 e arg⁻ de Km 21 mostraram-se bastantes eficientes, sendo extremamente fácil distinguir as linhagens originais prototróficas dos mutantes auxotróficos. Não foi detectada reversão de marca para esses mutantes. Para a marca ser de Kf 4, o mutante apresentou crescimento residual, sendo esse bastante rigoroso quando o plaqueamento foi feito por estriamento. Devido a essa dificuldade para Kf 4, os híbridos foram identificados não só pela prototrofia, como pelo caráter Killer (Tabela 22). Híbridos entre Km 21 e Kf 4 não foram considerados pela pequena confiabilidade na distinção entre esses e o mutante Kf 4. Foi dado preferência, nos ensaios, ao uso dos híbridos obtidos por cruzamento natural, pois pela fusão de protoplastos o nível de ploidia poderia trazer instabilidade às culturas.

Os mutantes, assim como os híbridos, foram testados para a atividade inulinolítica extracelular e para repressão catabólica. Para esse fim as linhagens foram crescidas em YNC (3.2.3.2) tendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose ou inulina como fonte de carbono. Na Tabela 23 encontra-se os resultados da atividade após 24 h em cultura.

Tabela 22 - Origem e marcas das linhagens mutantes e dos híbridos.

LINHAGENS	ORIGEM	KILLER	AUXOTROFIA
Km 9	IZ 1339	+	met ⁻
Km 21	IZ 619	-	arg ⁻
Kf 4	IZ 610	-	ser ⁻
MM 1	Km 9 x Km 21	+	-
MF 8	Km 9 x Kf 4	+	-

Tabela 23 - Medida da atividade inulinolítica extracelular em linhagens parentais e híbridos, crescidos em meio com glicose (G) e inulina (I).

LINHAGENS	A T I V I D A D E ¹	
	G	I
Km 9	75,92 ^a	55,55 ^a
Km 21	312,95 ^b	457,40 ^c
Kf 4	0,00	175,92 ^b
MM 1	0,00	166,66 ^b
MF 8	0,00	87,75 ^a

¹ Atividade: Em U após 24 h de crescimento.

Pela análise da Tabela 23 observa-se que o híbrido entre a linhagem desreprimida Km 9 e a reprimida Kf 4 mostra-se reprimível. O híbrido entre Km 9 e a linhagem parcialmente reprimida Km 21, também apresentou repressão. A atividade dos híbridos mostraram-se semelhantes à média da atividade dos pais. Outros híbridos do cruzamento Km 9 x Km

21 (mm 2 e mm 3) e Km 9 Kf 4 (MF 6, MF 7 e MF 9), também apresentaram o caráter Killer e a repressão catabólica. Com isso eles foram considerados idênticos ao MM 1 e MF 8, sendo portanto desnecessário para as medidas de atividade.

4.4. Características da Exportação de Proteínas por *K. marxianus*

Comparando-se os valores de atividade da Tabela 14 com os valores de exportação de proteína da Tabela 15, encontrou-se uma correlação de 86,70% para esses dois parâmetros, nas linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610. Apesar disso, observa-se que essa correlação é válida apenas para variações de atividade em um mesmo meio. Quando IZ 619 é crescida em YNBC (3.2.3.1) e YNC (3.2.3.2), esse tendo uréia (YUI) ou extrato de levedura (YYI) como fonte de nitrogênio (todos os meios com inulina 0,5% como fonte de carbono), observa-se que a variação da atividade inulinolítica não corresponde à variação da proteína exportada (Tabela 24). Os padrões eletroforéticos para os três casos mostraram-se diferentes. Na Figura 5 e 9 as amostras com e sem atividade correspondem à proteína precipitada do sobrenadante de IZ 619 crescida em YNBC e em YYI. O padrão eletroforético do sobrenadante da linhagem crescida em YUI apresenta apenas a banda da inulinase, não sendo distinguida qualquer outra banda (figura não apresentada).

A linhagem IZ 619, por apresentar maiores valores para concentração de proteína extracelular e atividade inulinolítica, foi selecionada para uma comparação de capacidade de exportação de proteínas com *S. cerevisiae* (FF). As duas linhagens foram crescidas em YEPD (3.2.1) por 96 h (período estacionário), sendo corrigida a concentração de glicose para 2% com 48 h, e então foi medida a atividade inulinolítica extracelular e a quantidade de proteína exportada. Na Tabela 25 encontram-se esses valores, tendo sido obtido nesse ensaio a maior atividade inulinolítica até então avaliada em IZ 619, e uma superioridade de exportação de proteínas por *K. marxianus* de 270 mg/l.

Tabela 24 - Avaliação da atividade inulinolítica extracelular e exportação de proteínas para IZ 619 crescida em diferentes meios.

MEIO ¹	CRESCIMENTO ²	ATIVIDADE ³	PROT. EXPORT. (mg/l)
YNBI	4,25	0,00	30,73
YYI	5,72	1041,00	40,83
YUI	3,23	600,00	14,98

¹ Meio: YNBI (3.2.3.1); YYI (3.2.3.2 - extrato de levedura como fonte de nitrogênio); YUI (3.2.3.2 - uréia como fonte de nitrogênio); açúcar utilizada inulina.

² Crescimento: Em unidade de D.O. x diluição.

³ Atividade: Em U.

Tabela 25 - Medida da atividade inulinolítica e da concentração de proteína extracelular em *S. cerevisiae* (FF) e *K. marxianus* (IZ 619).

LINHAGEM	ATIVIDADE EXTRACELULAR ¹	PROTEINA EXTRACELULAR ²
IZ 619	16.553,33	880 ^b
FF	0,00	610 ^a

¹ Atividade: Em U.

² Proteína: Em mg/l.

5. DISCUSSÃO

A discussão se desenvolverá de acordo com o ordenamento dos resultados, e para tal será dividida em 4 itens: Caracterização das Linhagens utilizadas, Características da atividade inulinolítica, Causas da variação da atividade inulinolítica e Características da exportação de proteínas.

5.1. Características das Linhagens Utilizadas

As linhagens utilizadas foram obtidas junto ao Instituto Zinotécnico da ESALQ/USP, tendo sido classificadas, de acordo com VAN DER WALT (1970), como *K. marxianus* (IZ 1339 e IZ 619) e *K. fragilis* (IZ 610). Em leveduras, a classificação de espécies dentro de gêneros têm-se mostrado um procedimento muito controvertido. A maioria dos taxonomistas utiliza, nessa diferenciação, a capacidade dos organismos de assimilar e fermentar determinados carboidratos. Parâmetros desse tipo, resultantes da interação entre genótipo e ambiente, não parecem muito confiáveis, uma vez que mesmo alterações monogênicas podem modificar o caráter. Outro parâmetro taxonômico utilizado é a capacidade de cru-

zamento, sendo englobadas na mesma espécie organismos capazes de gerar híbridos. JOHANSEN (1980) propôs essa forma de classificação para *Kluyveromyces*, tendo enquadrado *K. marxianus* e o *K. fragilis* em uma mesmas espécies.

Para as linhagens IZ 1339, IZ 619 e IZ 610, foram feitos cruzamento entre IZ 1339 e IZ 619, e entre IZ 1339 e IZ 610, tendo sido obtidos híbridos para os dois casos. As linhagens não apresentam reação sexual, tendo sido utilizado a complementação de marcas para identificação dos cruzamentos. As taxas de recuperação de híbridos foram muito baixas, em torno de 10^{-6} , sendo essas praticamente idênticas para os dois casos. Devido a isso, foi adotado para o trabalho a sistematização feita por JOHANSEN (1980), sendo as três linhagens consideradas *K. marxianus*.

Entre essas linhagens detectou-se a existência de grande variabilidade. A IZ 1339 é Killer, caráter esse bastante investigado em *K. lactis* (GUNGE, 1986). ECHEYER-RIGARAY (1986), determinou existência de dois plasmídios de DNA para essa linhagem, os quais considerou responsável pelo fenômeno. Em *K. lactis* o caráter Killer é determinado pela secreção de uma toxina, a qual é uma proteína glicosilada com peso molecular aparente (PMA) superior a 100 Kd, (GUNGE, 1986). Para IZ 1339 não foi identificado nenhum polipeptídeo com PMA superior ao da inulinase. Apesar disso, devido ao alto PMA que essa enzima apresenta (94 Kd) é possível ter havido uma superposição de bandas para as duas proteínas, o que dificultaria a identificação da toxina.

Outra característica observada para IZ 1339 foi a produção de pigmento vermelho quando as células foram cultivados em meio mínimo, caráter esse que desapareceu após a cultura ser repicada para meio complexo. MACMILLAN & PHAFF (1978) citam esse traço como eventual para algumas espécies de *Kluyveromyces*, não havendo informações à respeito de sua causa fisiológica. Um ponto a ser ressaltado é a inconstância do fenômeno em IZ 1339, não tendo ocorrido todas as vezes em que foi testado. Nas demais linhagens o pigmento não foi observado.

As linhagens IZ 619 e IZ 610 não apresentaram marcas tão claras para sua diferenciação. Um ponto observado para IZ 610 foi a sua esporulação quando colocada em meio com rafinose e acetato, fato esse que determinou sua condição de diplóide.

Um ponto comum para as três linhagens foi a capacidade de produzir e exportar a enzima inulinase, o que permitiu o crescimento das células em meio com inulina. Apesar de ser uma característica geral, as linhagens apresentaram grande variabilidade para o caráter, principalmente no que diz respeito aos valores da atividade hidrolítica, e ao sistema de regulação.

Nos próximos itens, aspectos dessa variabilidade serão avaliados e discutidos, sendo importante ressaltar que as linhagens utilizadas não foram objeto de qualquer manipulação genética anterior.

5.2. Características da Atividade Inulinolítica

Pela avaliação da atividade inulinolítica extracelular durante o crescimento das linhagens (Figura 1; Tabela 2 e 3) observa-se que entre 0 e 12 horas, fase exponencial da cultura, a atividade não é detectada. Nesse período as linhagens mostram-se desuniformes para o crescimento, com a IZ 1339 e IZ 610 praticamente alcançando a fase estacionária, e a IZ 619 apenas iniciando a fase exponencial (Tabela 3). No período entre 12 e 24 h inicia-se a liberação das enzimas para o meio. Para a IZ 1339 e IZ 610 os valores da atividade medidas são bem reduzidas e praticamente idênticos, havendo a partir das 24 h um grande incremento para esse parâmetro. Para a IZ 619 o aumento da atividade em cultura é praticamente constante no período entre 12 e 48 h, havendo porém um aumento significativo dessa taxa a partir das 24 h. Uma vez que a atividade extracelular apresentou-se estável por pelo menos 48 h em meio livre de células, foi assumido que as diferenças entre atividades medidas nos vários períodos devem-se ao incremento da exportação de enzimas. Pela Tabela 4 observa-se essas taxas de incremento nos períodos de 12 a 24 e de 24 a 48 h. Por ela verifica-se o aumento da velocidade de exportação à partir das 24 h, principalmente nas linhagens IZ 1339 e IZ 610, o que mostra que o predomínio da atividade ocorre na fase estacionária. Para IZ 619 ocorre também o aumento da atividade a partir das 24 h, sendo esse porém menos intenso.

Esse dados, mostrando que a maior parte da atividade inulinolítica ocorre na fase estacionária, está de acordo com o comportamento observado para diversas outras leveduras, como *Candida* (NEGORO & KITO, 1973; GRAUD *et alii*, 1980), *Debaryomyces* (BELUCHE *et alii*, 1980; DENEUZEE, 1981) e *Pichia* (CHAUTARD *et alii*, 1980). Por eles conclui-se que a atividade extracelular não é necessária para o crescimento das células em inulina, o que aponta para existência de atividade a nível de parede, e que não há correlação positiva entre atividade inulinolítica e velocidade de crescimento, o que mostra que mesmo pequenas quantidades da enzima são suficientes para permitir o ritmo de crescimento característico de cada linhagem. Os resultados permitem também a diferenciação da linhagem IZ 619 das demais, por essa apresentar uma atividade hidrolítica extracelular muito superior na avaliação com 24 h de crescimento.

Devido à maior atividade extracelular apresentada por IZ 619, o sobrenadante dessa cultura foi utilizado para a avaliação das características físicas da enzima. Em relação à resistência térmica, pela Tabela 5 observa-se que a partir de 40°C já inicia-se o processo de inativação, sendo que o tratamento do sobrenadante em temperaturas superiores a 60° tornaram esse praticamente inativo. Esses dados concordam aproximadamente com os obtidos por ECHEVERRIGARAY (1986), porém foi detectado uma sensibilidade ainda maior da enzima.

Em relação do pH observou-se um fato curioso, que foi a grande variação do comportamento da enzima em relação ao tipo e concentração do tampão utilizado na solução de inulina. Pelas Figuras 6 e 7, observa-se que quando foi utilizado tampão citrato fosfato, houve dois tipos de comportamento. Quando o tampão teve molaridade variável, e desconhecida, obteve-se um patamar de atividade entre os pHs 2,5 e 4,5, uma redução específica no pH 5,0 e um pico de atividade no pH 6,0. Esse resultado está em concordância com ECHEVERRIGARAY (1986), e apontou para a existência de duas enzimas. BELUCHE *et alii*, (1980), trabalhando com *Debaryomyces Cantarelli*, encontraram um comportamento semelhante para a inulinase desse organismo, tendo sido proposto a existência de duas diferentes enzimas, uma a nível de parede e outra extracelular, devido aos diferentes valores de pH ótimo que determinaram para as duas frações. Posteriormente, GIRAUD *et alii* (1982), demonstraram que a detecção dos diferentes picos devia-se simplesmente às condições do tampão utilizado na extração da enzima da parede, sendo que essa era a mesma extracelular. De forma semelhante, quando a molaridade do tampão foi mantida constante para todo o gradiente, apenas um pH ótimo, em 6,0, foi encontrado. O patamar entre 3,0 e 4,5, anteriormente observado, não foi detectado. Para confirmar a influência do tipo de tampão, foi também medida a atividade nas condições normalmente utilizadas nas análises, tampão fosfato - pH 4,5, tendo sido obtido nesse tampão um valor de atividade diferente dos

obtidos para os outros tampões nesse pH (Figura 4, Tabela 6). Por esses dados concluiu-se pela existência de apenas um pH ótimo, em 6,0, sendo os valores anteriormente obtidos considerados como resultante da interferência de condições não homogêneas de análise.

Outra caracterização feita para a enzima foi a eletroforética. Inicialmente foi realizada uma corrida com proteína total não desnaturada (Figura 5), sendo observado grande diferença entre os padrões das amostras, onde ocorre ou não atividade. Nas amostras com atividade foi observado uma grande banda, com cerca de 15 mm, na parte superior do gel. Nessa eletroforese, a medição da atividade ao longo do gel determinou essa grande banda como responsável pela atividade hidrolítica (Figura 6). O padrão eletroforético da amostra sem atividade (Figura 5) apresentou a ocorrência da banda da inulinase, porém de forma muito menos intensa, e a ocorrência de uma banda de baixo peso molecular e boa definição. A análise da atividade ao longo desse gel não detectou a presença da inulinase. A banda relativa a inulinase foi denominada (A) e a banda de baixo peso molecular (B). Com a análise densitométrica das duas amostras na eletroforese (Figura 7 - Tabela 7) observa-se claramente a grande contribuição da banda A na amostra com atividade, representando 86% da proteína detectada por densitometria. Na amostra sem atividade essa banda representa 57%, porém observa-se que a área dessa é 5 vezes menos que a área da banda A na amostra com atividade. Dentro das amostras

verifica-se ainda que a relação entre as áreas A e B é bem diferente. Na amostra sem atividade esse valor é 10 vezes menor que na amostra com atividade. Um ponto a ser ressaltado é que apesar de nas duas amostras haver sido corrido a mesma quantidade de proteína na eletroforese, o total das áreas avaliadas por densitometria nos dois casos não foi igual, sendo 2,9 vezes maior para o padrão da amostra com atividade. Uma explicação para isso pode ser a baixa definição da inulinase no gel, o que alarga o pico A. Como o pico B apesar de intenso apresenta-se bem definido, é possível que a sua área não seja proporcional à quantidade de proteína relativa a ele.

Para essa corrida de eletroforese sem SDS foi feita uma segunda dimensão, com SDS, objetivando determinar o número de polipeptídeos da enzima. Pela Figura 8 observa-se a ocorrência de apenas 1 banda relativa a banda A, essa apresentando-se também larga e com pouca definição no gel. As razões para essa baixa definição poderia ser ou a existência de polipeptídeos sobrepostos ou a existência de grupos conjugados, como cadeias glicosídicas, ligados a enzima. Pela Figura 8 observa-se a eletroforese das amostras com concentrações bem reduzidas de proteínas, não ocorrendo aumento na definição da inulinase. Assim sendo, a provável explicação para o padrão observado é a alta glicosilação da enzima, sendo a baixa definição um elemento característico para esse tipo de proteína conjugada (BERGH *et alii*, 1988). Uma vez que a inulinase é uma proteína secretada, a possibi-

lidade dessa glicosilação não traz qualquer surpresa. Em *S. cerevisiae*, onde o processo de secreção está bem estabelecido, a adição de cadeias de polissacarídeos é uma etapa fundamental, sendo determinante para a localização celular da proteína (KUKURUZINKA *et alii*, 1987; DESHAIES *et alii*, 1989) e para existência de atividade em algumas enzimas (SCHECKMAN & NOVICK, 1982). Uma metodologia empregada para determinar a contribuição das cadeias glicosídicas no PMA de proteínas glicosiladas, é o uso de enzimas desglicosiladoras (endoglicosidase F e H, α manosidase). Com o uso dessas enzimas, que são altamente específicas, o PMA em eletroforese com SDS de proteínas glicosiladas sofre grande redução, algumas vezes da ordem de mais de 50% (BERGH *et alii*, 1988). Como a maior parte das cadeias polissacarídicas das proteínas glicosiladas de leveduras é formada por manose, foi tentada a desglicosilação da inulinase através de tratamento com enzimas capazes de hidrolisar as polimanoses da parede celular (lisozima, zimoliase e novozym). Essas enzimas, mesmo quando utilizadas em alta concentração e por longos períodos de tempo, não apresentaram qualquer efeito para a desglicosilação da inulinase. Esse resultado, que poderia indicar a não existência de cadeias de manose nessa hidrolase, não é elucidativo, pois as enzimas desglicosiladoras de proteínas secretadas, como já citado, são altamente específicas.

WOOD *et alii*, (1985) apontam que proteínas com alto nível de secreção, em leveduras, podem ser exportados

sub glicosiladas. Uma vez que é possível a existência da subglicosilação, é natural que o padrão eletroforético de proteínas glicosilados apresentem-se sob a forma de faixa, pois os seus pesos moleculares variam com a extensão das cadeias de açúcar. Dessa forma, concluiu-se pela existência de apenas uma inulinase exportada, por IZ 619, tendo essa, em sua provável forma glicosilada, um PMA de 94 Kd (medida no centro da banda). As outras duas linhagens, IZ 1339, e IZ 610, apresentaram o mesmo padrão eletroforético que IZ 619 para proteínas exportadas, não tendo sido detectado diferenças, em relação a esse parâmetro, entre as inulinase dessas três linhagens.

Apesar da existência de apenas uma banda atividade inulinolítica, é possível que a inulinase não seja monomérica. Pelo resultado obtido através da eletroforese bidimensional (Figura 8), pode-se supor apenas que se a enzima for polimérica os seus polipeptídeos constituintes devem ter peso molecular muito próximos.

É interessante notar a modificação do perfil eletroforético que ocorre nas amostras com e sem atividade (Figura 9, tabela 8). Nas amostras com atividade a banda da inulinase (94 Kd) é bem mais larga e intensa, representando, em avaliação feita por densitômetro, 85% da proteína exportada. Nas amostras sem atividade a banda da inulinase é bem mais estreita e menos intensa, representando apenas 20% da proteína exportada. Em contrapartida, essas amostras sem atividade apresentam duas bandas de baixo peso molecular

(15,0 e 14,4 Kd), as quais estão associadas a uma banda difusa na parte inferior do gel. Não foi encontrado uma explicação definitiva para essa modificação do padrão, porém no próximo item uma possibilidade para tal ocorrência será discutida.

Pelos dados apresentados na Figura 1, verificou-se que a atividade extracelular não é necessária para o crescimento de *K. marxianus* em inulinase. Efetivamente, quando células lavadas foram testados para atividade, essas apresentaram capacidade de hidrolisar inulina (Tabela 9). Em diversos organismos que apresentam atividade inulinolítica extracelular, essa atividade celular foi também detectada. GIRAUD *et alii* (1980), citam que em *Candida salmeticensis*, apesar de ser possível extrair inulinase da parede celular, células inteiras não apresentam atividade. Esse fato deve estar relacionado com a estrutura da parede, mais especificamente com a impossibilidade de contato entre a hidrolase e a inulina.

Observando-se o comportamento da atividade de parede em relação à atividade extracelular, determinou-se que para a primeira ocorre um valor máximo de atividade, havendo a partir desse ponto aumento apenas da atividade extracelular. Pela Tabela 11 e Figura 11, verifica-se esse comportamento. Há uma correlação positiva entre aumento da concentração de extrato de levedura no meio de cultura, e a atividade inulinolítica total (celular + extracelular). Enquanto a atividade extracelular não ocorre, a atividade

celular cresce, porém no momento em que detecta-se inulinase no meio há uma concomitante redução da atividade na parede. Posteriormente, a variação da atividade total ocorre basicamente pelo aumento da inulinase extracelular. Da mesma forma, em outros experimentos, nos quais a atividade celular foi medida, sempre observou-se um patamar para essa atividade, a partir do qual ocorre a extracelular (Tabela 9 e 13). Esse patamar não mostrou-se constante entre experimentos, porém ao longo de todo o trabalho não foi detectado nenhum caso em que a atividade celular, de culturas apresentando atividade extracelular, tenha sido menor que a atividade análoga em culturas sem atividade extracelular.

O tipo de relacionamento existente entre atividade celular e extracelular apontou claramente para a existência de uma mesma enzima atuando nos dois níveis. Para comprovar essa possibilidade foi feito a autólise das células e eletroforese das proteínas liberados. O resultado desse procedimento foi a determinação da existência da banda referente à inulinase entre as proteínas da parede (Figura 10-7), a partir de que foi assumido que a atividade extracelular é a função da existência dessa enzima no meio de cultura.

Um sistema enzimático semelhante estudado em *S. cerevisiae* é o da invertase. Nesse organismo essa enzima é secretada e mantida no espaço periplasmático (SCHECMAN & NOVICK, 1982). A localização da enzima nesse ponto é função basicamente do seu volume, determinado pelo grau de

glicosilação da enzima, e da estrutura densa da parede celular, que não permite a passagem da enzima para o meio de cultura (EMR *et alii*, 1983). Entre as evidências que reforçam essa interação, temos o fato de que quando a invertase está acoplada a sequências sinalizadoras da exportação do ferormônio α , que é liberado ao meio de cultura, sua localização periplasmática não é alterada (EMR *et alii*, 1983). Em contrapartida, nos mutantes com parede celular frágil, ou seja, menos densa, ocorre liberação da invertase para o meio de cultura (WALTSCHWEA *et alii*, 1989). Essa interação com a parede celular, observada para a invertase, também está de acordo com a inexistência de um sistema específico de exportação de proteínas para o meio de cultura, como ocorre em procariotos (BECKIWITH & FERROWOVICK, 1986), sendo o espaço periplasmático o alvo das proteínas secretadas (DESHAIES *et alii*, 1989).

Para provar que em *K. marxianus* o sistema é idêntico ao acima descrito, foi realizado um teste de fragilidade da parede celular, baseado na capacidade de resistência dessa estrutura à enzima zimoliase. Por esse teste verificou-se que após 10 minutos de tratamento com a enzima, ocorre cerca de 50% de rompimento das células. Para *S. cerevisiae* mesmo em tempos superiores a uma hora não foi verificado esse tipo de comportamento, tendo as células permanecidas íntegras até a formação dos esferoplastos.

Desse dados chegou-se a conclusão da existência de apenas uma inulinase para *K. marxianus*, sendo essa

secretada até o espaço periplasmático. A partir disso, a atividade extracelular que o organismo exibe é consequência da produção da enzima em quantidades superiores à capacidade de retenção pela parede celular.

Um ponto a ser ressaltado foi a grande variação observada no índice S/I, mesmo tratando-se de uma mesma enzima. Pela Tabela 11 verifica-se que para amostras de IZ 619 os valores desse índice variaram entre 8,11 e 26,67. Diversos autores, como SNYDER & PHAFF (1960) em *Kluyveromyces* e NEGORO & KITO (1973) em *Candida*, encontraram resultados semelhantes para esse parâmetro. Dessa forma, apesar do índice ser normalmente proposto para a identificação de inulinasas, a grande variação que ele apresenta impossibilita a distinção entre enzimas semelhantes. Assim, os índices observados apenas enquadram a enzima estudada como uma inulinase, segundo os critérios descritos por FLEMING & GOOTWASSINK (1979).

5.3. Causas da Variação da Atividade Inulinolítica

Uma das primeiras observações feitas em relação à variação da atividade inulinolítica extracelular em *K. marxianus*, foi a inexistência dessa quando as células são crescidas em YNB. Para outras leveduras, tais como *Candida* (GIRAUD *et alii*, 1980), *Debaryomyces* (DEMEULEE *et alii*, 1981) e *Pichia* (CHAUTARD *et alii*, 1980), esse é o meio normalmente utilizado para testar as variações de atividade

relacionados com fontes de carbono, ou seja, para esses organismos esse meio supre todas as necessidades para o processo de produção e/ou exportação da enzima.

Em *Kluyveromyces fragilis*, SNYDER & PHAFF (1960), determinaram que quando o esse organismo cresce em meio tendo amonia como fonte de nitrogênio, o crescimento celular é reduzido e há queda do pH do meio. Esses autores relacionaram essas características à baixa atividade inulinolítica observada nessas condições, sendo que quando caseína hidrolisada foi adicionada ao meio de cultura houve aumento da detecção da inulinase. DAVIS (1971) apontou, para explicar tal fenômeno, a existência de um composto na caseína, identificado como diquetopiperazina, que seria responsável pela indução.

A primeira questão levantada em relação à esse problema, foi quanto a natureza da indução provocada pelos compostos nitrogenados na exportação da inulinase. Para testar esse ponto, inicialmente as células foram crescidas em YNB e meio complexo, tendo glicose e inulina como fonte de carbono (Tabela 9). Por esse experimento verificou-se que em meio sintético há a produção da inulinase, ficando essa a nível de parede. Além disso, em meio complexo a densidade de células apresentou-se muito maior, e a atividade inulinolítica total, mesmo considerada em relação ao crescimento celular, também apresentou-se muito superior. Dessa forma, concluiu-se que fatores do extrato de levedura, ou peptona, influenciam no aumento da produção da enzima por célula, o

que determinar a sua exportação.

Outra avaliação, com o mesmo propósito, foi realizada aumentando gradualmente a concentração de extrato de levedura no meio de cultura, e avaliando as consequências desse aumento no crescimento celular e atividade inulinolítica (Tabela 10, 11 e 12; Figura 11 e 12). Por esse experimento verificou-se que o extrato de levedura permite o aumento da densidade celular, e que a atividade total é proporcional à concentração dessa fonte no meio. Devido a alta atividade apresentada na concentração de 0,3% de extrato de levedura no meio, esse valor foi utilizado para testar outras fontes de nitrogênio (Tabela 13). Dessas fontes obteve-se aumento da atividade com a peptona e com a uréia. O nitrato de potássio foi também testado, apesar do gênero *Kluyveromyces* não utilizá-lo como fonte de nutriente (MACMILLAN & PHAFF, 1978), com a finalidade de testar a possibilidade no nitrogênio estar desempenhando algum outro papel que não o nutricional. Para peptona e uréia foi verificado o aumento da atividade total (e atividade extracelular), sendo observado diferenças no comportamento relativo das culturas comparando-se a peptona ao extrato de levedura. Ressalta-se que apesar dessas duas fontes terem determinado valores semelhantes para a atividade total, no meio com peptona há maior retenção da enzima pelas células. A origem dessa maior retenção não foi determinada, mas é possível que esteja relacionada com diferenças na densidade da parede provocadas pelo uso das diferentes fontes. A

análise eletroforética das proteínas extracelulares das culturas crescidas nos dois meios determinou identidade entre os seus padrões (Amostras 2 e 3 da Figura 9). Como observado na Tabela 13, essas fontes também suportam maior crescimento celular que o meio YNB.

Um comportamento diferencial é observado com a utilização da uréia como fonte de nitrogênio. Nesse caso, observa-se uma drástica redução do crescimento celular, mesmo comparado com o nitrato, o que é um indício da possível toxidez causada pela amida. Apesar disso, houve um grande incremento da atividade inulinolítica nesse tratamento, que em termos relativos ao crescimento celular alcançou 70% e 72% das atividades obtidas com o uso de peptona e extrato de levedura respectivamente. Pela eletroforese das proteínas extracelular nesse tratamento foi possível distinguir apenas a banda da inulinase, não tendo sido verificado outras bandas.

Uma grande questão a ser levantada, com base nesses resultados, é a natureza da influência das fontes de nitrogênio. De uma forma geral, ela pode estar atuando a nível transcricional ou pós transcricional. GUARENTE (1987) citou, para os genes CYC 1 e CYC 7, o efeito do elemento Heme diretamente em elementos regulatórios do DNA desses genes, promovendo a transcrição. A nível pós transcricional, CHIRICO *et alii* (1988) observaram que o precursor do fator α de *S. cerevisiae*, *in vitro*, tem capacidade de translocar-se para o retículo endoplasmático, quando no substrato estão

presentes fontes de nitrogênio específicos. Essas fontes foram identificadas como duas proteínas do sistema do choque térmico, SSA 1 e SSA 2, presentes no extrato de levedura. Posteriormente, verificou-se a pequena especificidade do efeito quanto ao agente causador, sendo o fenômeno também verificado na presença da uréia (CHIRICO *et alii*, 1988).

No presente trabalho, alguns resultados tendem à possibilidade da variação da atividade inulinolítica por fontes de nitrogênio, ser devida a fatores pós transcricionais. Inicialmente observa-se a não relação entre crescimento celular e atividade inulinolítica. Se a diferença de efeito entre as fontes estivesse nos diferentes níveis de carência observados nos meios, era de se esperar que a atividade inulinolítica tivesse correlação com o crescimento celular, o que não ocorre. Se o aumento da atividade tivesse origem meramente transcricional, era de se esperar maior especificidade para as fontes ativadoras e a não correlação entre a concentração dessas fontes e a atividade inulinolítica, pois tratando-se de fatores de ativação o seu efeito dar-se-ia mesmo em pequenas concentrações. Outro ponto a se destacar é o padrão eletroforético extracelular e a exportação de proteínas para as diversas situações. Pela Tabela 15 observa-se para a linhagem IZ 610, reprimível, que em condições de repressão há uma grande redução no nível de proteína exportada e a não ocorrência da banda relativa à inulinase entre as proteínas extracelulares (Figura 10). Comparando-se a exportação de proteínas entre células cres-

cidas em YNB e em meios com outras fontes de nitrogênio determinantes de atividade, esse comportamento proporcional não foi observado. Pela Tabela 24 verifica-se que a concentração de proteína específica (proteína exportada/crescimento celular) para os meios YNB e YYI é bem semelhante (7,23 e 7,13 respectivamente), sendo que no primeiro meio não há qualquer atividade. A eletroforese da proteína extracelular para os dois casos, mostrou padrões diferentes para os polipeptídeos exportados. No caso de YNB, observou-se que a banda da inulinase apresenta-se bem mais estreita e menos intensa do que a de YYI, e que ocorrem duas bandas de baixo peso molecular (15,0 e 14,4 Kd) na parte inferior do gel. Uma possibilidade para explicar a diferença desses padrões, seria esses dois polipeptídios corresponderem à inulinase subglicosilada, sendo essa subglicosilação consequência da ausência das fontes de nitrogênio relacionadas.

Entre os fatores que fortalecem essa possibilidade, encontra-se a analogia das fontes de nitrogênio descritas por CHIRICO (1988) como responsáveis pela translocação, e as fontes aqui relacionadas como determinantes do aumento da atividade extracelular. Outro elemento para essa discussão é a efetiva existência de situações, em levedura, nas quais verifica-se a exportação de enzimas subglicosiladas como consequência do alto nível de expressão das mesmas (WOOD *et alii*, 1985). Transportando esses dados para a secreção da inulinase, poderíamos supor que a subglicosilação seria responsável pelo padrão eletroforético verificado

para as culturas em YNB, e pela não existência de atividade nessas culturas, pois em muitos casos, como o da invertase e o da fosfatase ácida de *S. cerevisiae*, a exatidão do processo é fundamental para a conformação tridimensional correta das enzimas (SCHECKMAN & NOVICK, 1982).

Dessa forma, pelo descrito verifica-se que o efeito das fontes de nitrogênio na produção da inulinase não se dá pela indução do processo. O que parece ocorrer é que esses elementos, quando ausentes, limitam a produção e/ou exportação da enzima. Apesar das possibilidades aqui levantadas para a influência dessas fontes ocorrer a nível de exportação, a metodologia empregada não permite provar essa hipótese. Para tal, seria necessário determinar se polipeptídeos de 15,0 e 14,4 Kd efetivamente constituem a inulinase, o que exige o uso de enzimas desglicosiladoras, e quantificar os níveis de mRNA produzido para provar a não correlação entre os valores de transcrição e secreção. Esses procedimentos, pelos custos e equipamentos envolvidos, não foram realizados.

Outra fonte de nutrientes que teve a sua influência testada foram os açúcares. Pela Tabela 9 verifica-se a necessidade da atividade inulinolítica para o crescimento em meio com inulina. Quando *S. cerevisiae* é inoculado tendo essa fonte de carbono como substrato, seu crescimento apresenta-se reduzido se comparado ao crescimento com glicose.

Para *K. marxianus* as linhagens não apresentam diferenças no crescimento celular em relação à fonte de carbono ser inulina, glicose ou sacarose. Na Tabela 16 verifica-se, para IZ 619, que a densidade ótica final das culturas para as diferentes fontes, quando essas estão na mesma concentração, é idêntica. Quando a concentração de açúcar no meio é aumentada ocorre o concomitante aumento da densidade ótica, o que mostra ser a concentração de açúcar limitante para o crescimento celular nesse meio. Apesar disso, a curva de crescimento para IZ 619 apresenta influência do tipo carboidrato metabolizado. Pela Tabela 16 verifica-se que a evolução da densidade ótica no meio contendo inulina ocorre de forma mais lenta que nos outros meios, sendo o tempo de geração no intervalo de 0 a 6 h bastante superior. No meio contendo glicose e inulina essa menor aceleração para o crescimento não é observada, devendo a glicose, nos primeiros momentos da cultura, suportar o maior ritmo de crescimento. Posteriormente, quando a glicose é consumida, a atividade inulinolítica já é suficiente para determinar, no meio de cultura, uma concentração de açúcar redutor capaz de permitir o ritmo normal de crescimento.

Em relação a atividade inulinolítica, as fontes de carbono tiveram diferentes efeitos entre as linhagens. Em IZ 1339 não observou-se variação significativa da atividade nas culturas crescidas em glicose ou inulina (Tabela 14). Devido a esse resultado, a atividade inulinolítica dessa linhagem foi assumida como indiferente à fonte de carbono.

Em relação a IZ 619, observou-se que a atividade inulinolítica da linhagem possui clara influência da fonte de carbono. Quando crescida em inulina, a atividade apresentada pela cultura com essa fonte é significativamente superior à apresentada pela cultura crescida em glicose (Tabelas 9, 15 e 17). Para gerar esse efeito existem três causas básicas: a existência de um sistema de repressão parcial por glicose, a existência de um nível constitutivo de produção da enzima, o qual é estimulado por inulina, ou a existência dos dois sistemas anteriores atuando em conjunto. Em *S. cerevisiae* há a ocorrência dos dois tipos de sistema. Para as enzimas do catabolismo da galactose, observa-se que a transcrição dessas enzimas é regulada por dois sinalizadores ambientais: a glicose, que reprime, e a galactose, que induz. O papel da galactose, já elucidado, esta na inativação de um repressor, GAL 80, o qual liga-se a um indutor, o GAL 4 (JOHNSTON *et alii*, 1989). O papel da glicose, menos conhecido, parece ser indireto, pela regulação de outros genes cujos produtos vão interferir nos elementos trans acima descritos (GURARANTE, 1987). Para a invertase, também a repressão por glicose parece envolver elementos transnegativos e transpositivos, cujas ações coordenadas, e em alguns pontos positivos reguladas por glicose, geram o fenômeno (CELENZA & CARLSON, 1986).

Voltando a IZ 619, para testar se o efeito é provocado pela indução por inulina ou repressão por glicose, a linhagem foi crescidas em várias fontes de carbono. Pela

tabela 17, observa-se que a atividade inulinolítica das linhagens crescidas em glicose e sacarose são praticamente idênticas, o que mostra que a sacarose não atua na indução. Em meio com inulina, observa-se um aumento significativo da atividade, o que também ocorre no meio glicose + inulina. Apesar disso, avaliando-se a Tabela 18, onde encontra-se a relação atividade/crescimento celular, verifica-se claramente a maior atividade específica das células crescidas em meio tendo apenas inulina como fonte de carbono, o que aponta para a possível existência de um sistema de repressão por glicose. Posteriormente, com o crescimento da cultura, observa-se que os tratamentos tendo inulina no meio igualam-se quanto a atividade, o que aponta para o efeito indutor desse açúcar.

Para IZ 810, os efeitos observados para glicose e inulina são ainda maior acentuados. Pela Tabela 14 verifica-se que quando essa linhagem é crescida tendo apenas glicose como fonte de carbono, não se detecta nenhuma atividade inulinolítica. A Tabela 19, também apresenta o comportamento da atividade dessa linhagem quando crescida em diversas fontes de carbono. Por ela verifica-se a não atividade quando as células são crescidas em glicose ou sacarose e a atividade em meio com inulina ou glicose + inulina. Quanto ao crescimento em glicose ou sacarose, constatou-se, após 24 h em cultura, a existência de atividade celular, verificável apenas quando do uso da solução de sacarose para a reação de hidrólise. O uso dessa solução justifica-se pela

maior atividade da inulinase sobre o dissacarídeo sacarose, o que aumenta a capacidade de detecção da enzima. Como observado na Tabela 19, a atividade celular avaliada nessas condições é bem inferior (cerca de 3 a 6 vezes) a avaliada para as células crescidas em meio com inulina.

Para as células de IZ 610 crescidas com inulina (Tabela 19), foram estabelecidos duas condições: inulina e inulina + glicose. Para o tratamento com inulina a atividade hidrolítica já é detectada, ainda que apenas sobre sacarose, nas 12 horas de cultura, o que não ocorre para o outro tratamento. Na avaliação com 24 h já verifica-se que a atividade total (celular + extracelular) é praticamente idêntica para os dois casos.

Um ponto a ser ressaltado para IZ 610, é o padrão eletroforético da proteína extracelular nas situações de repressão e não repressão. pela Figura 10 observa-se que no primeiro caso não ocorre a banda da inulinase e nem as duas bandas de baixo peso molecular, características das células crescidas em YNB. Por esse resultado, observa-se que essas bandas de baixo peso molecular não são consequência da repressão, não devendo portanto ser esse o processo que determina a não ocorrência de atividade extracelular nas células crescidas em YNB.

Dos dados de IZ 610, chega-se a conclusões bem semelhantes as obtidas para IZ 619. Para os dois casos parece ocorrer tanto a repressão por glicose como a indução por inulina, sendo que a existência desse açúcar no meio

parece determinante para a elevação do nível da atividade inulinolítica.

Considerando-se as 3 linhagens, de uma forma geral, pelos experimentos realizados, constatou-se entre elas diferenças nos valores de atividade inulinolítica e diferenças na regulação da exportação da inulinase.

Quanto a variação dos valores de atividade, existem duas possibilidades para explicá-la: exportação de diferentes enzimas com diferentes atividades específicas, ou exportação de diferentes quantidades de uma mesma enzima. A eletroforese feita com a proteína extracelular das três linhagens detectou, para todos os casos, a existência da banda de 94 Kd. Além disso, quando a corrida de eletroforese é feita tomando-se alíquotas iguais das amostras, sem prévia quantificação de proteínas, observa-se que para a linhagem IZ 619, com maior atividade, a banda da inulinase é bem mais intensa (Figura 10). Por esses dados concluiu-se que as três linhagens exportam a mesma inulinase, pelo menos do ponto de vista da mobilidade eletroforética, sendo a variação da atividade consequência dos diferentes níveis de secreção da enzima.

Para as diferenças a nível de regulação, observa-se que IZ 1339 é desreprimida, IZ 619 é parcialmente desreprimida e IZ 610 é reprimida. Sendo as linhagens oriundas de ambientes naturais, a primeira vista torna-se estranho o fato de duas delas não possuírem uma regulação eficiente para o caráter. Em *K. lactis* uma observação

semelhante é feita para o sistema do catabolismo da lactose. BREUNING *et alii* (1988) citam que a maioria das linhagens avaliadas são desreprimidas para a produção das enzimas responsáveis por esse catabolismo. Apesar disso, observa-se que essas linhagens desreprimidas possuem o sistema de repressão, porém esses apresentam elementos regulatórios não ativos (BREUNING *et alii*, 1988).

Com o objetivo de testar o relacionamentos entre os sistemas de regulação das três linhagens, foram feitos cruzamentos entre IZ 1339 e IZ 619 e entre IZ 1339 e IZ 610, ambos através do uso de mutantes complementares (Tabela 22).

No cruzamento entre IZ 1339 (Km 9) e IZ 610 (Kf 4), o híbrido (Mf 8) apresentou o reestabelecimento da repressão catabólica. Esse resultado indica que em IZ 1339 o sistema de repressão existe, devendo a desrepressão ser consequência de alterações em elementos regulatório. Considerando-se que esses elementos podem ser de dois tipos, *cis* e *trans* (GUARANTE, 1987), uma vez que a repressão foi restabelecida pode-se afirmar que o elemento defeituoso de IZ 1339 é do tipo *trans*. Se o defeito detectado estivesse em um elemento *cis*, o qual inviabilizaria a ligação de elementos *trans*, o híbrido não deveria apresentar a repressão.

No cruzamento entre IZ 1339 (Km 9) e IZ 619 (Km 21), o híbrido MM 1 apresentou repressão catabólica. Esse resultado, um tanto inesperado, confirma também para IZ 619 a existência de um sistema regulatório. Além disso, como

houve complementação para os possíveis elementos trans defeituosos, pode-se afirmar que existem pelo menos dois desses elementos, provavelmente atuando em conjunto, estabelecendo a repressão.

Considerando-se ser a repressão nessas linhagens um processo de regulação transcricional, pode-se propor, a partir dos resultados, a construção de um modelo regulatório. Uma possibilidade seria a existência, nas linhagens sem repressão, de um elemento transnegativo, o qual deve ser formado por duas unidades, não ativo. Nesse elemento atuariam a glicose, ativando-o para a repressão, e a inulina, desativando-o e promovendo a indução. Na linhagem IZ 1339 a unidade desse repressor responsável pela ligação a sítios cis estaria defeituosa, o que acarretaria na não repressão. Em IZ 619 seria a outra unidade, na qual atuaria a glicose (direta ou indiretamente), que estaria inoperante. Isso provocaria uma repressão parcial devido à menor afinidade desse repressor ao seu sítio cis de atuação. Quando a linhagem IZ 1339 é cruzada com a IZ 610, devido a essa última ter o sistema regulatório intacto o seu repressor atuaria normalmente nos elementos reguladores cis da inulinase no híbrido, impedindo a produção da enzima. No cruzamento entre IZ 1339 e IZ 619, as unidades não defeituosas do elemento transnegativo se complementariam e o tornariam novamente ativo. Na presença da inulina esse açúcar ligar-se-ia ao elemento transnegativo ativo, o que provocaria a sua inativação e a produção da inulinase.

O modelo apresentado considera a interação primária entre elementos trans e cis, o que não é, de forma alguma, regra para os sistemas regulatórios de leveduras. Para prová-lo seria necessário a identificação e quantificação do mRNA da inulinase, o que determinaria se a variação da atividade deve-se a eventos transcrpcionais. Pelos dados apresentados, temos como informações seguras a ocorrência de sistemas regulatórios semelhantes para as três linhagens, e a existência de um elemento transnegativo formado por pelo menos duas unidades.

Além da regulação a nível transcricional, é possível que os elementos detectados atuem a nível pós transcricional, como ocorre para a regulação de aminoácidos (CHARASHIMA *et alii*, 1986) e para a regulação de proteínas envolvidos com a translocação (PELHAM, 1986). Em *S. cerevisiae*, SAKAI *et alii* (1988) citam a obtenção de mutantes supersecretores, em que o aumento da exportação não esta relacionado com o aumento da transcrição, o que mostra a importância que esse nível de regulação pode ter na modulação do processo. Apesar disso, para provar a regulação a esse nível é novamente imprescindível o uso da metodologia molecular já citada, sem a qual a discussão sobre esse ponto torna-se dispensável.

Como já citado, a linhagem IZ 1339 além de exportar a enzima inulinase exporta também a toxina Killer. Sendo as duas produtos de secreção, foi realizado um experimento para verificar a possível interferência entre os

seus processos de exportação. Pelas Tabelas 20 e 21, observa-se que quando a IZ 1339 cresce em consórcio com a linhagem AH 22 ocorre redução dos valores de crescimento da linhagem sensível, o que prova a produção da toxina. No tratamento controle, formado pelo consórcio entre IZ 619 e AH 22, não observa-se redução da atividade específica, havendo inclusive um incremento da mesma (Tabela 21).

Uma possível explicação para a redução da atividade específica no consórcio IZ 1339 + AH 22 é a interferência da secreção da toxina na secreção da inulinase. Sendo o processo da glicosilação altamente dispendioso em relação a consumo de energia (KUKURUZINSKA *et alii*, 1987), é possível que nessas condições ocorra uma competição de peptídeos pela secreção, tornando o mecanismo limitante. MRSA *et alii* (1988) observou situação semelhante em relação a secreção da invertase e da fosfatase ácido por *S. cerevisiae*. Esse autor verificou, nesse organismo, que o aumento da produção de uma enzima determinou a redução do nível da outra, mesmo as duas estando em condições ótimas para a expressão (MRSA *et alii*, 1988).

Em relação à regulação da toxina Killer, não foi obtido nenhuma referência acerca da ativação da sua secreção, sendo considerado a sua síntese um evento constitutivo. Apesar disso, SUGISAKI *et alii* (1985) cita que a transferência dos plasmídios "Killer" de *K. lactis* para *K. fragilis* gera um aumento de 17 vezes no nível de exportação dessa proteína. Uma vez que o genoma específico mostra

influência nesse processo, é possível que os elementos desses genomas de alguma forma o regule. Isso explicaria os dados obtidos, com o aumento da produção da toxina por IZ 1339 na presença da linhagem sensível, a qual competiria com a inulinase pela secreção. Sendo a produção de inulinase por IZ 1339 constitutiva, esse fato explicaria a redução de atividade detectada.

Outra forma de verificar esse relacionamento seria avaliar o comportamento da atividade inulonolítica na linhagem IZ 1339 curada. Para proceder essa cura foi tentado a utilização dos métodos normalmente empregados para *K. lactis* (GUNGE, 1986), porém esses não surtiram qualquer efeito. Entre as mais de 10.000 colônias individualmente avaliadas não foi detectada nenhuma não Killer.

Sobre o consórcio IZ 619 + AH 22, observou-se que a linhagem de *K. marxianus* apresentou um crescimento celular de 90% em relação à sua cultura isolada. Para AH 22 esse valor foi de apenas 23%. Esses dados inferem para a capacidade de competição de IZ 619, o que possivelmente compensa a sua desrepressão para a produção da inulinase.

5.4. Características da Exportação de Proteínas

Para a linhagem IZ 619 determinou-se, a partir da análise densitométrica, que cerca de 85% das proteínas exportadas corresponde a inulinase (Tabela 7). Efetivamente, relacionando-se os dados de atividade extracelular com valo-

res de proteína exportada, encontrou-se uma correlação de 86,7% (dados da tabela 15). Tal correlação confirma a elevada proporção da inulinase entre as proteínas exportadas, porém observa-se que isso acontece apenas em meios com fontes de nitrogênio que permitem a exportação da enzima. Entre essas fontes de nitrogênio, observa-se que a uréia, apesar de suportar alta atividade inulinolítica, não apresenta grandes valores para a exportação de proteínas (Tabela 24). O padrão eletroforético das proteínas extracelulares das culturas crescidas nesse meio, mostrou-se distinto do padrão obtido para as culturas crescidas em meio com extrato de levedura, sendo que no primeiro só foi detectada a banda da inulinase. É possível que outros polipetídeos também sejam exportados nessa condição, porém, se isso ocorrer, suas concentrações devem ser bem reduzidas.

Pelos dados obtidos nesse trabalho, é possível constatar a grande capacidade secretora de *K. marxianus*. Pela Tabela 24, verifica-se que a linhagem IZ 619, mesmo em meio extremamente pobre (YUI), produz cerca de 15 mg/l, dos quais, pelos dados de eletroforese, a quase totalidade corresponde a inulinase. Para o meio complexo foi realizado um ensaio comparando *K. marxianus* (IZ 619) e *S. cerevisiae* (FF) quanto a capacidade de exportar proteína. Após 4 dias em cultura, fase estacionária, foi medida a atividade inulinolítica e a concentração de proteína extracelular nos dois tratamentos (Tabela 25). Por esses dados observou-se para *K. marxianus* um montante de proteína de 880 mg/l contra 610

mg/l de *S. cerevisiae*. Mesmo considerando-se a possibilidade da interferência de proteínas do meio de cultura nessa avaliação, constata-se que IZ 619 produz 270 mg/l a mais que FF. Baseados nos dados de atividade e de densitometria pode-se estimar que pelo menos cerca de 85% dessa proteína corresponde a inulinase. Dessa forma, esses altos valores de exportação para uma mesma proteína, associado a outras características favoráveis de *K. marxianus*, como a existência de plasmídios, nos permite afirmar ser esse organismo um potencial hospedeiro para produção de peptídeos heterólogos, principalmente através do sistema inulinase. Por esse sistema é possível prever a recuperação, em meio de cultura, de quantidades de polipeptídeos bem superiores a 200 mg/l, atualmente considerado um valor excepcional.

6. CONCLUSÕES

A investigação da atividade inulinolítica extracelular em linhagens de *K. marxianus* permitiu, a partir de dados apresentados, obter as seguintes conclusões quanto ao funcionamento do sistema.

1. Em relação ao número de enzimas inulinolíticas exportadas, a análise eletroforética determinou a ocorrência de apenas uma banda apresentando essa atividade, concluindo-se pela existência de apenas uma enzima.
2. A faixa do padrão eletroforético correspondente à inulinase, avaliada após tratamento com agentes desnaturantes, tem PMA de 94 Kd e apresentou-se muito larga.
3. A faixa de temperatura ótima para a atividade da enzima é de 30 a 40°C, havendo brusca redução da atividade quando a enzima é submetida por 10 min a temperaturas maiores. Para valores superiores a 60°, a enzima apresenta-se completamente inativa.

4. A enzima apresenta atividade em uma ampla faixa de pH (2,5 a 8,0), porém o valor ótimo ocorre em 6,5. Em valores de pH bem próximos a esse, a atividade já apresenta um acentuado declínio.
5. A enzima possui estabilidade em cultura por pelo menos 48 h, podendo-se considerar que as variações de atividade durante o crescimento das células corresponde ao valor do incremento da produção da enzima.
6. A atividade inulinolítica extracelular ocorre predominantemente na fase estacionária da cultura.
7. A relação de atividade sacarose/inulina, normalmente utilizada para caracterizar enzimas inulinolíticas, variou consideravelmente para uma mesma linhagem em diferentes experimentos. Dessa forma, a utilização desse parâmetro não é recomendável para a determinação de diferenças entre inulinases.
8. Entre as diferentes linhagens, o padrão eletroforético das enzimas exportadas mostrou-se bem semelhante, havendo forte aumento na concentração da faixa da enzima em linhagens com maior atividade. Desse resultado, concluiu-se que a variação da atividade inulinolítica entre linhagens deve-se predominantemente a maior produção de enzima, e não à exportação de inulinases com diferentes atividades específicas.

9. Células inteiras apresentam atividade inulinolítica, sendo essa consequência da ocorrência de enzima com essa atividade a nível de parede.
10. A inulinase de parede e extracelular apresentam padrões eletroforéticos idênticos. Além disso, a atividade extracelular só ocorre após o início da atividade de parede. Esses fatos, aliados à fragilidade do envoltório celular de *K. marxianus*, levam a conclusão de que existe apenas uma enzima operando no sistema, sendo essa levada ao espaço periplasmático e daí liberada para o meio.
11. Na ausência de fontes específicas de nitrogênio, como a uréia, extrato de levedura e peptona, ocorre reduzida produção da inulinase, ficando essa restrita à parede celular. O padrão eletroforético do sobrenadante das culturas, crescidas nessas condições, apresenta-se modificado, com ocorrência de duas bandas de baixo peso molecular (15 Kd e 14,4 Kd) e um rastro na parte inferior do gel.
12. Na linhagem IZ 610, que apresenta repressão catabólica, a indução da inulinase ocorre na presença de inulina. Na presença de sacarose, ou mesmo glicose, pode ser detectada uma fraca atividade a nível de parede, sendo essa suficiente para permitir o crescimento da linhagem em meio com esse dissacarídeo.

13. Os sistemas Killer e inulinase, ambos gerando proteínas secretadas, relacionam-se quanto ao nível de proteína exportada, havendo redução da atividade inulínolítica extracelular por célula, quando a linhagem Killer é crescida juntamente com uma linhagem sensível.
14. Em analogia ao sistema de regulação da lactose em *K. lactis*, ocorrem naturalmente em *K. marxianus* linhagens desreprimidas para a produção da inulinase, como a IZ 1339 e a IZ 619.
15. O híbrido resultante de cruzamento entre linhagens com e sem repressão catabólica apresenta repressão, ou seja, existe um sistema comum para o fenômeno que torna-se não funcional na linhagem desreprimida devido à inatividade de elementos transnegativos.
16. O híbrido resultante das linhagens desreprimida e parcialmente desreprimida apresenta repressão catabólica por glicose, ou seja, há complementação entre pelo menos dois elementos transnegativos não funcionais no híbrido, o que acarreta o restabelecimento do sistema.
17. A partir da análise do comportamento dos híbridos em relação à repressão catabólica, sugeriu-se um modelo com a existência de dois elementos transnegativos

agindo em conjunto. Um desses elementos seria responsável pela ligação à glicose (A) e o outro pela ligação a elementos de regulação *Cis* (B). Na linhagem parcialmente desreprimida haveria defeito no elemento A, o que determinaria uma menor afinidade do repressor pela glicose, e portanto um menor grau de repressão. Na linhagem desreprimida haveria defeito no elemento B, o que responderia pela não influência da glicose no nível da inulinase exportada. A inulina, por outro lado, pode fazer parte de um sistema inativador da repressão, uma vez que com a adição do polímero no meio após a redução da glicose ocorre exportação da enzima. O modelo apresentado não possui a base molecular necessária para a sua confirmação, situando-se assim a nível de especulação.

18. Por análise densitométrica do padrão eletroforético das proteínas exportados por IZ 619, determinou-se que cerca de 90% dessas proteínas corresponde à inulinase. Essa estimativa é válida para meio ótimo de produção.
19. Em meio complexo a linhagens IZ 619 apresentou, após 4 dias em cultura, uma atividade de 16.553 U/ml min, e uma quantidade de proteína no meio de 880 mg/l. A linhagem comercial FF de *S. cerevisiae* apresentou, nas mesmas condições, um valor de 610 mg/l para pro-

teína exportadas. Mesmo considerando-se a existência de proteínas no meio relativas ao extrato de levedura e peptona, a variação apresentada pelas duas espécies permite afirmar que pelo menos 270 mg/l deve-se à secreção por *K. marxianus*. Considerando-se à estimativa de que 90% da proteína extracelular corresponde à inulinase, é possível, pelo uso desse sistema na produção de peptídeos heterólogos, a recuperação em meio de cultura de proteínas de alto peso molecular em concentrações muito superiores a 200 mg/l, hoje consideradas excepcionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASPINALL, G.O. & HIRST, E.L. Inulin: preparation of inulin from *Dahlia* tubers. In: WHISTLER, R. ed. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York, Academic Press, 1965. p. 157-158.
- BAJON, A.M.; GIRAUD, J.P.; GALZY, P. Isolation of an inulinase derepressed mutant of *Pichia polymorpha* for the production of fructose. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 128-133, 1984.
- BALDARI, C.; MURRAY, J.A.H.; GUIARA, P.; CESARENI, G.; GALEOTTI, C. Killer mediated secretion of interleukin 1 β by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 3(Spec. Iss): 18, 1986.
- BECKWITH, J. & FERRO-NOVICK, S. Genetic studies on protein export in bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 125: 5-27, 1986.
- BELUCHE, I.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Inulinase activity of *Debaromyces cantarelli*. *Folia Microbiol.*, 25: 32-39, 1980.
- BERGH, M.L.E.; HUBBARD, S.C.; ROBBINS, P.W. Glycosilation of heterologously expressed proteins: problems and solutions. In: MARSHAK, D.R. & LIU, D.T. ed. *Therapeutic Peptides and Proteins: assessing new technologies*. New York, Cold Spring Harbor laboratory, 1988. p. 59-68.

- BICKNELL, J.N. & DOUGLAS, H.C. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces*. *Journal of Bacteriology*, 101(2): 505-512, 1970.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- BREWT, R. Repression of transcription in yeast. *CELL*, 42: 3-4, 1985.
- BREUNIG, K.D.; GODECKE, A.; KUGER, P. Glucose repression of *B. galactosidase* in *Kluyveromyces lactis* is mediated by the positive regulatory protein LAC 9. *YEAST*, 4(Spec. Iss): 322, 1988.
- BURGESS, T.L. & KELLY, R.B. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 3: 243, 1987.
- BUSSEY, H.; SAVILLE, D.; GREWE, D.; TIPPER, D.J. BOSTIAN, K.A. Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* Killer toxin: processing of glycosylated precursor. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1362-1370, 1983.
- CARLE, G.F. & OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 13: 5647-5664, 1984.
- CARLE, G.F. & OLSON, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3756-3760, 1985.
- CELENZA, J.L. & CARLSOW, M. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, 233: 1175-1180.

- CHAUTARD, P.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Inulinase activity of *Pichia polymorpha*. *Acta Microbiol Acad. Sci. Hung.* 28: 245-255, 1981.
- CHIRICO, W.J.; WARTERS, M.G.; BLOBEL, G. 70 K Heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsome. *Nature*, 332: 805-810, 1988.
- COLLIER, P.; BANKAITIS, Y.A.; WEISS, J.B.; BRASSFORD, J.R. The antifolding activity of sec B promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein. *CELL*, 53: 273-283, 1988.
- CREGG, J.M. TSCHOPP, C.S.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W.S.; BUCKHOLZ, R.G.; MADDEN, K.R.; KELLARIS, P.A.; DAVIS, G.R.; SMILEY, B.L.; CRUZE, J.; TORPEGROSSA, G.; VELICELEBI, G.; THILL, G.P. High-Level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*. *Bitechnology*, 5: 479-485, 1987.
- DAVIES, R. A new factor stimulating invertase production by *Saccharomyces fragilis*. *Journal of General Microbiology*, 66: 37-53, 1971.
- DEMEULLE, S.; GIRAUD, J.P.; GALZY, P. Study of inulase from *Debaromyces phaffi* Capriotti. *Zeitschrift Fur Allgemeine Microbiologie*, 21: 181-189, 1981.
- DESHAIES, R.J.; KEPES, F.; BÖHNI, P.C. Genetic dissection of the early stages of protein secretion in yeast. *Trends in Genetics*, 5: 87-96, 1989.
- ECHEVERRIGARAY, S.L. Genética e melhoramento de leveduras para a bioconversão de extratos de *Helianthus tuberosus* L. Piracicaba, 1986. 173 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- EMR, S.D.; SCHEKMAN, R.; FLESSEL, M.C.; THORNER, J. An MF α 1 - SUC2 (α factor - invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 7080-7084, 1983.
- ENTIAN, K.D. Glucose repression: a complex regulatory system in yeast. *Microbiological Science*, 3: 366-371, 1986.
- FILIPOVA, D.; HADIJIOLOV, A.A.; VEWKOY, P. Genetic transformation of fragile yeast. *YEAST*, 2(Spec. Iss): 111, 1986.
- FINK, G.R. Translational control of transcription in eukaryotes. *CELL*, 45: 155-156, 1986.
- FINK, G.R. & STYLES, C.A. Curing of a Killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2846-2849, 1972.
- FLEMING, S. & GOOTWASSINK, J.W.D. Preparation of high-fructose syrup from the tuber of the jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *CRC Critical Review Food Science and Nutrition*, 12(1): 1-28, 1979.
- GILL, G. & PTASHNE, M. Mutants of GAL 4 protein altered in an activation function. *CELL*, 51: 121-126, 1987.
- GIRAUD, J.P., BERNIT, C.; GALZY, P. Inulinase of *Debaromyces cantarelli*. *Folia Microbiol*, 27: 19-24, 1982.
- GIRAUD, J.P.; VIARD-GAUDIN, C.; GALZY, P. Etude de L'inulinase de *Candida salmeticensis* Van Uden et Buckley. *Agric. Biol. Chem.*, 44: 1245-1252, 1980.
- GUARENTE, L. Yeast promoters positive and negative elements. *CELL*, 36: 799-800, 1984.

- GUARENTE, L. Regulatory proteins in yeast. *Ann. Rev. Genet.* 21: 425-52, 1987.
- GUARENTE, L. UAS e enhancers: Common mechanisms of transcriptional activation in yeast and mammals. *CELL*, 52: 303-305, 1988.
- GUMBINER, B. & KELLY, R.B. Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *CELL*, 28: 51-59, 1982.
- GUNGE, N. Linear DNA Killer plasmids from the yeast *Kluyveromyces*. *YEAST*, 2: 153-162, 1986.
- GUNGE, N.; MURATA, K.; SAKAGUCHI, K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with linear DNA Killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 151: 462-464, 1982.
- GUNGE, N. & SAKAGUCHI, K. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid Killer plasmids, pGKL 1 and pGKL 2, from *Kluyveromyces lactis* to *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *Journal of Bacteriology*, 147: 155-160, 1981.
- GUNGE, N.; TAMARU, A.; OZAMA, F.; SAKAGUCHI, K. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmid-associated Killer character. *Journal of Bacteriology*, 145: 382-390, 1981.
- GUNGE, N. YAMANE, C. Incompatibility of Linear DNA Killer plasmids pGKL 1 and pGKL 2 from *Kluyveromyces lactis* with mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 159: 533-539, 1984.

- HAGUENAUER - TSAPIS, R. & HINNEN, A. A deletion that includes the signal peptidase cleavage site impairs processing, glycosylation and secretion of cell surface yeast acid phosphatase. *Mol. Cel. Biol.* 4: 2668-2675, 1984.
- HAHN, S.; HOAR, E.T.; GUARENTE, L. Each of three "TATA elements" specifies a subset of transcription initiation site at the *CYC1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8562-66, 1985.
- HANSEN, W.; GARCIA, P.; WALTER, P. In vitro protein translocation across the yeast endoplasmatic reticulum: ATP - dependent post-translational translocation of the prepro - α - factor. *CELL*, 45: 397-406, 1986.
- HARASHIMA, S.; HANNIG, E.; MUELLER, P.; HINNEBUSCH, A.G. Interaction between *GCN3* and multiple *GCD* genes involved in growth control and translational repression of *GNC-4*. *YEAST*, 3(Spec. Iss): 149, 1986.
- IBORRA, F.; RAYNAL, A.; GUERINEAU, M. The promoter of B-glucosidase gene from *Kluyveromyces lactis* contains sequences that act as upstream repressing sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 213: 150-154, 1988.
- JOHANNSEN, E. Hibridization studies hithin the genus *Kluyveromyces* van der WALT emend van der WALT. *Antonie Van Leenwenhock*, 46: 177-189, 1980.
- JOHNSTON, S.A.; SALMERON JR., J.M. DINCHER, S.S. Interation of positive and negative regulatory protein into galactose regulon of yeast. *CELL*, 50: 143-146, 1987.
- KAKIDANI, H. & PTASHNE, M. Gal4 activates gene expression in mammalian cells. *CELL*, 52: 161-167, 1988.

- KAPPELI, O.; WEBER, J.; ZURBRINGEN, B.; SANGLARD, D.
Maximizing heterologous gene expression in yeast. *YEAST*,
4(Spec. Iss): 159, 1988.
- KEEGAN, L.; GILL, G.; PTASHNE, M. Separation of DNA binding
from the transcription - activation function of an
eucaryotic regulatory protein. *Science*, 231: 669-704,
1986.
- KELEHER, C.A.; GOUTTE, C.; JOHNSON, A.D. The yeast Cell-
-type-specific repressor $\alpha 2$ acts cooperatively with a
non-cell-type-specific protein. *CELL*, 53: 927-936, 1987.
- KENT, S.B. & PARKER, K.F. The chemical synthesis of therapeutic
peptides and proteins. In: MARSHAK, D.R. & LIU., D.T.
ed. *Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing New
Technologies*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory,
1988. p. 3-20.
- KIERSTAN, M. Production of fructose syrups from inulin.
Process Biochemistry, p. 2-3, may 1980.
- KOLTER, R. & YANOASKY, C. Attenuation in amino acids
biosynthetic operons. *Ann. Rev. Genet.* 16: 143-134, 1982.
- KOMAR, A.A.; GERASIMENKO, O.G.; KOVAJOLVA, N.S. YUKERVITCH,
Y.Y. Dynamic aspects of the yeast cell wall. *YEAST*,
3(Spec. Iss): 192, 1986.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. Taxonomy and systematics of yeast.
In: ROSE, R.H. & HARRISON, J.S. *The Yeast*. New York,
Academic press, 1969, p. 5-78.
- KRONSTAD, J.N.; HOLLY, J.A.; Mac KAY, V.L. Yeast operator
overlaps an upstream activation site. *CELL*, 50: 369-377,
1987.

- KUHN, A. & WICKNER, W. Conserved residues of the leader peptide are essential for cleavage by leader peptidase. *J. Biol. Chem.*, 260: 15914-18, 1985.
- KUKURUZINSKA, M.A.; BERGH, M.L.E.; JACKSON, B.J. Protein glycosylation in yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 914-44, 1987.
- LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 681-685, 1970.
- LARGE, P. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. *YEAST*, 2: 1-34, 1986.
- LOODER, J. The yeast: a taxonomic study. Amsterdam, North Holland, 1970. 1385 p.
- MA, J. & PTASHNE, M. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *CELL*, 55: 443-446, 1988.
- MACMILLAN, J.D. & PHAFF, H.J. Yeast. In: LASKIN, A.I. & LECHEVALIER, H.A. *CRC Handbook of Microbiology*, Florida, CRC Press, 1978. p. 207-250.
- MARTINI, A.; PHAFF, H.J. DOUGLASS, S.A. Deoxyribonucleic acid base composition of species in the yeast genus *Kluyveromyces* van der WALD emend. Van der WALT. *J. Bacteriol.* 111: 481-485, 1972.
- MATSUMOTO, K.; TOH-E, A.; OSHIMA, Y. Genetic control of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for constitutive expression of the positive regulator gene Gal 4. *J. Bacteriol.* 134: 446-457, 1978.

- MRSA, Y.; DELIC, I.; FINK, N.; BABARIC, S.; MILDNER, P.
Parameters affecting glycosilation and secretion of yeast invertase and acid phosphatase. *YEAST*, 4(Spec. Iss): 448, 1988.
- MUNRO, S. & PELHAM, H.R.B. An Hsp-70 like protein in the E.R.: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immuno globin heavy chain binding protein. *CELL*, 46: 291-300, 1986.
- NASMYTH, K. & SHORE, D. Transcriptional regulation in the yeast life cycle. *Science*, 237: 1162-1170, 1987.
- NEGORO, H. & KITO, E. B. Fructofuranosidase from *Candida Kefyr*. *J. Ferment Technol*, 51: 96-102, 1973.
- NEIGERBORN, L. & CARLSON, M. Genes affecting the regulation of SUC 2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 108: 845-858, 1984.
- NEIGEBOERN, L. & CARLSON, M. Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interaction with snf mutations. *Genetics*, 115: 247-253, 1987.
- NELSON, N.J. A photometric adaption of the Somogy method for determination of glucose. *J. Biol. Chemic*, 375: 375-380, 1984.
- NEUMANN, N.P. & LAMPEN, J.O. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry*, 6: 468-475, 1967.
- NISHIZAWA, M.; OZAWA, F.; HISHINUMA, F. Constrution of a yeast secretion vector using signal peptide of a yeast invertase. *YEAST*, 2(Spec. Iss): 272, 1986.

- NIWA, O.; SAKAGUCHI, K.; GUNGE, N. Cloning of the Killer deoxyribonucleic acid plasmids of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 148: 988-990, 1981.
- NOVICK, P. & SCHEKMAW, R. Export of major cell surface protein is blocked in yeast secretory mutants. *J. Cell Biol.*, 96: 541-547, 1983.
- OGDEN, J.E.; STANWAY, E.; MELLOR, K. KINGSMAN, A.J. KINGSMAN, S.M. Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGK gene depends on an upstream activation site but does not require TATA sequences. *Mol. Cell Biol.*, 6: 4335-4343, 1986.
- OLESEN, J.; HAHN, S.; GUARENTE, L. Yeast HAP 2 and HAP 3 activators both bind to the CYC 1 upstream activators site, UAS 2, in an interdependent manner. *CELL*, 51: 953-961, 1987.
- OSHIMA, Y. Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphatase. In: STRATHERN, J.N. et alii. *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p. 159-180.
- PANCHAL, C.J.; MEACHER, C.; VAN OOSTROM, J. STEWART, G. Phenotypic expression of *Kluyveromyces lactis* Killer toxin against *Saccharomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 257-260, 1985.
- PELHAM, H.R.B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *CELL*, 46: 959-961, 1986.
- PENTILA, M.E.; ANDRÉ, L.; LEHTOVAARA, P.; BAILEY, M.; TEERI, T.T.; KNOWLES, J.K.C. Efficient secretion of two fungal

cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae* Gene, 63: 103-112, 1988.

PFEIFER, K.; ARCANGIOLI, B.; GUARENTE, L. Yeast HAP 1 activator competes with-the factor RC 2 for binding to the upstream activation site UAS 1 of the CYC 1 gene. CELL, 49: 9-18, 1987a.

PFEIFER, K.; PREZANT, T.; GUARENTE, L. Yeast HAP 1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence. CELL, 49: 19-27, 1987b.

PHILLISKIRK, G. & YOUNG, T.W. The ocurrence of Killer character in yeast of varions genera. Antonie Van Leenwenhock, 41: 147-151, 1975.

PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 10^a ed. Piracicaba, Nobel, 1982. 430 p.

RANDAL, L.L.; HARDY, S.J.S.; THOM, J.R. Export of protein: a biochemical view. Ann. Rev. Microbiol, 41: 507-541, 1987.

RIETVELD, K.; BAKHVIS, J.G.; IN DE WAL, J.; VAN LEEN, R.W.; NOORDERMEER, A.C.M. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression. YEAST, 4(Spec. Iss): 163, 1988.

RINE, J. & HERSKOWITZ, I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 116: 9-22, 1987.

ROTHMAN, J.H. & STEVENS, T.H. Protein sorting in yeast: mutant defective in vacuoles biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathways. CELL, 47: 1041-1051, 1986.

SALKAI, A.; SHIMIZU, Y.; HISHINUMA, F. Isolation and characterization of mutants which show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 119: 499-506, 1988.

SALAMINEN, A. & NOVICK, P.J. A ras-like protein IS required for a post-golgi event in yeast secretion. *CELL*, 49: 527-538, 1987.

SALOVUORI, I.; MIAKAROW, M.; RAUVALA, H.; KNOWLES, J.; KAARIAINEN, L. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bitechnology*, 5: 152-156, 1987.

SCHEKMAN, R. Protein localization and membrane traffic in yeast. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1: 115-143, 1985.

SCHEKMAN, R. & NOVICK, P. The secretory process and yeast cell-surface assembly. In: STRATHERN, J. *et alii*; ed. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. New York, Cold spring Harbor laboratory, 1982. p. 361-398.

SNYDER, H.E. & PHAFF, H.J. Studies on beta-fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie Van Leenwenhoeek*, 26: 433-452, 1960.

SNYPER, H.E. & PHAFF, H.J. The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. *J. Biol. Chem.* 237: 2438-2441, 1962.

SOMOGY, M.J. Notes in sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23, 1952.

SOR, F. & FUKUHARA, H. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *YEAST*, 5: 1-10, 1981.

- STARK, M.J.R.; ROMANOS, M.A.; MILEHAN, A.J.; BOYD, A.
Processing, glycosylation and assembly of the secreted
Killer toxin of *Kluyveromyces lactis*. *YEAST*, 2(Spec.
Iss): 367, 1986.
- STRUHL, K. Promoters, activator proteins, and the mechanisms
of transcriptional initiation in yeast. *CELL* 49: 295-297,
1987.
- STUMM, C.; HERMANS, J.M.H.; MIDDELBEEK, E.J. CROES, A.F.; de
VRIES, G.J.M.L. Killer sensitive relationships in yeast
from natural habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek* 43:
125-128, 1977.
- SUGISAKI, Y.; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, T.;
TAMURA, G. *Kluyveromyces lactis* Killer toxin inhibits
adenylate cyclase of sensitive yeast cells. *Nature* 304:
464-466, 1983.
- SUGISAKI, Y.; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA,
G. Characterization of a novel Killer toxin encoded by a
double-stranded linear DNA plasmids of *Kluyveromyces*
lactis. *FEBS* 141: 241-245, 1984.
- SUGISAKI, Y.; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, M.;
TAMURA, G.; Transfer of DNA Killer plasmids from
Kluyveromyces lactis to *Kluyveromyces fragilis* and
Candida pseudotropicalis. *Journal of Bacteriology* 164:
1373-1375, 1985.
- TAUSSIG, R. & CARLSON, M. Nucleotide sequence of the yeast
SUC 2 gene for invertase. *Nucleic Acids Research*, 11:
1943-1954, 1983.
- THORNER, J. Pheromonal regulation of development in
Saccharomyces cerevisiae. In: STRATHERN, J. et alii. *The*

Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and inheritance. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. 1981. p. 143-180.

TIPPER, D.J. & BOSTIAN, R.A. Double strand ribonucleic acid Killer system in yeast. *Microbiol. Rev.* 48: 125-156, 1984.

TOKUNAGA, M.; WADA, N.; HISHINUMA, F. Expression and identification of immunity determinants on linear DNA Killer plasmids pGKL 1 and pGKL 2 in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, 15: 1031-1046, 1987.

TROMBLY, R.J. Cloning and characterization of the CYC 8 gene mediating glucose repression in yeast. *Gene* 73: 97-111, 1988.

VAN BRUNT. Fungi: The perfect host. *Biotechnology* 4: 1057-1062, 1986.

VAN DER WALT, J.P. Criteria and methods used in classification. In: LODDER, J. ed. *The Yeast: a Taxonomic Study*. Ed. North Holland, Amsterdam, 1970, p. 34-113.

VON TIGERSTROM, R.G. & STELMASCHUK, S. Localization and characterization of lipolytic enzymes produced by *Lysobacter enzymogenes*. *Journal of Gen. Microb.* 135: 1027-1035, 1989.

WALTSCHewa, L.; PHILIPOVA, D.; VENKOY, P. Increased extracellular secretion in fragilis in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST*, 5(Spec. Iss): 313-320, 1989.

WESOLOWSKI-LOUVEL, M.; TANGUY-ROGEAU, C.; FUKUHARA, H. A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated Killer system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *YEAST*, 4: 71-81, 1988.

WICKNER, R.B. Killer character of *Saccharomyces cerevisiae*: a double stranded ribonucleic acid plasmid. *Bacteriolog. Rev.* 40: 753-773, 1976.

WICKNER, R.B. Killer system in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. *et alii*. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. New York, Cold Spring harbor laboratory, 1981 p. 429-442.

WOOD, C.R.; BOSS, M.A.; KENTEW, J.H.; CALVERT, J.E.; ROBERTS, N.A.; EMTAGE, J.S. The synthesis and in vitro assembly of functional antibodies in yeast. *Nature* 314: 446-449, 1985.