

CLÁUDIA SOUZA MACÊDO

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE MUTANTES *Kluyveromyces lactis*
Dhap1 e *Drox1* SOB AEROBIOSE E HIPOXIA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

RESUMO

MACÊDO, Cláudia Souza Macêdo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2005. **Caracterização fisiológica de mutantes *Kluyveromyces lactis Dhap1* e *Drox1* sob aerobiose e hipoxia.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiras: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Célia Alencar de Moraes.

Na busca de novos resultados para elucidar o papel de *HAP1* e *ROX1*, que codificam um ativador do metabolismo oxidativo e um repressor do metabolismo oxidorreduutivo, respectivamente, na levedura *Crabtree* negativa *Kluyveromyces lactis* cuja versatilidade metabólica pode ser explorada em vários campos da biotecnologia, inicialmente, foi identificado um gene ortólogo *ROX1* à *S. cerevisiae* na seqüência genômica de *K.lactis*. O gene *KIROX1* possui 40% de identidade daquele presente em *S. cerevisiae* e um *motif* característico do domínio HMG (*High Mobility Group*). Com base nessa seqüência uma linhagem mutante com deleção de *ROX1* foi construída e confirmada. O fenótipo *URA*⁺ e *rox1*⁻ dos transformantes obtidos, *K.lactis Dhox1::URA3*, foram 100% estáveis sob condição seletiva. O gene putativo *ROX1* de *K.lactis* teve a sua função em resposta ao oxigênio confirmada em culturas de *K. lactis* sob regime contínuo e desrepressão por glicose, pois, a deleção de *ROX1* induziu a um aumento no nível do transcrito do gene hipóxico *HEM13*. A análise dos produtos do metabolismo permitiu inferir que a deleção do gene *ROX1* em *K. lactis* aumentou a capacidade fermentativa dessa levedura sob aerobiose e de desrepressão catabólica. A investigação em culturas *K. lactis Dhap1* submetidas ao cultivo contínuo aeróbico sob desrepressão por glicose revelou um fenótipo relacionado ao metabolismo oxidorreduutivo, ou seja, *K. lactis Dhap1* é mais fermentativa levando a diversidade de metabólitos em torno do piruvato. A proposta da via de regulação parcial negativa controlando a expressão de *HEM13* foi confirmada nas culturas *K. lactis*.

ABSTRACT

MACÊDO, Cláudia Souza Macedo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, May 2005. **Physiological characterization of *Kluyveromyces lactis Dhap1* and *Drox1* mutants under aerobic and hypoxic conditions.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Célia Alencar de Moraes.

The objective of this study was to search for new results in order to elucidate the role of *HAP1* and *ROX1*, which codify an oxidative metabolism activator and an oxidoreductive metabolism repressor respectively, in the Crabtree-negative yeast *Kluyveromyces lactis*, whose metabolic versatility can be exploited in several biotechnology fields. Initially, a *ROX1* gene orthologous to *S. cerevisiae* was identified in the genomic sequence of *K. lactis*. The *KIROX1* gene has 40% identity with the one present in *S. cerevisiae* and a characteristic motif of the HMG (High Mobility Group) domain. Based on this sequence, a mutant line with *ROX1* deletion was built and confirmed. The obtained transformant *URA*⁺ and *rox1*⁻ phenotypes, *K. lactis Dhap1::URA3*, were 100% stable under selective condition. The putative *K. lactis ROX1* gene had its function in response to oxygen confirmed in cultures of *K. lactis* under continuous regime and glucose derepression, since *ROX1* deletion induced an increase in the level of the *HEM13* hypoxic gene transcript. The analysis of metabolism products allowed inferring that the deletion of gene *ROX1* in *K. lactis* increased the yeast fermentative capacity under aerobic and catabolic derepression. The investigation in *K. lactis Dhap1* cultures under continuous aerobic cultivation and glucose derepression revealed a phenotype related to oxidoreductive metabolism, in other words, *K. lactis Dhap1* is more fermentative, leading to metabolite diversity around the piruvate. The proposal of the partial negative regulation pathway controlling the *HEM13* expression was confirmed in *K. lactis* cultures.