



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas-NUPEB
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia-BIOTEC
Laboratório de Biologia Celular e Molecular-LBCM



Identificação de um gene, provavelmente envolvido no transporte ativo de glicerol em *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*)

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Co-orientadora: Janaina Aparecida Teixeira

Mestranda: Lorena Soares Gomes

OURO PRETO-MG

2015

G633i Gomes, Lorena Soares.
Identificação de um gene, provavelmente envolvido no transporte ativo de glicerol em *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) [manuscrito] / Lorena Soares Gomes. - 2015.
xiii, 42pf.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Janaina Aparecida Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas . Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Glicerol. 2. *Pichia anomala*. 3. Leveduras (fungos). I. Brandão, Rogelio Lopes. II. Teixeira, Janaina Aparecida. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 582.282.23

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas-NUPEB
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia-BIOTEC
Laboratório de Biologia Celular e Molecular-LBCM



Identificação de um gene, provavelmente envolvido no transporte ativo de glicerol em *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*)

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

CO-ORIENTADORA: Dra. Janaina Aparecida Teixeira

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Industrial.

OURO PRETO-MG

2015



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Identificação de um gene, provavelmente envolvido no transporte ativo de glicerol, em *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*)"

Aos trinta dias do mês de abril de 2015, às 13h30min, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Lorena Soares Gomes**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram porAPROVAR..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão
Presidente

Prof. Dr. Iesô de Miranda Castro
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 30/04/2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

- João Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

Dedicatória

À minha querida madrinha Heloisa por todo o incentivo. E ao Marco, pela paciência, carinho e amparo em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço à instituição Universidade Federal de Ouro Preto, ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas/NUPEB e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular/LBCM por toda experiência científica e de vida adquirida.

À Fapemig pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão pela orientação, confiança e por conceder esta oportunidade.

À minha co-orientadora Dr^a Janaina Aparecida Teixeira e ao Dr. Fábio Faria-Oliveira, pela orientação, por toda presteza, conhecimento e dedicação empregada. Sendo fundamentais na realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Cândida Lucas pela colaboração e contribuições oportunas neste trabalho.

À Dr^a Fernanda Godoy pela paciência, dedicação e imensurável auxílio na criação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Ieso Miranda Castro pela disponibilidade e auxílio.

À querida Zezé Trópia por sua presença de espírito e disposição em ajudar sempre.

Aos queridos colegas, atuais e antigos, do LBCM: Anna Clara, Aureliano, Bruna, Débora, Diogo, Eduardo, Fábio, Fernanda Godoy, Fernanda Piló, Filipe, Florência, Heloá, Hygor, Janaina, Jéssica, Juliana, Luís, Lygia, Marcos, Margarete, Maria Ana, Míriam, Patrícia, Raphael, Stefane, Tais e Thalita.

Aos professores do NUPEB pelo ensino e disponibilidade.

Ao Laboratório de Imunopatologia pela disponibilidade de equipamentos para a realização de experimentos.

À Prof^a Dr^a Renata Guerra, ao Prof. Dr. William Castro e ao Josino pela atenção e disponibilidade em solucionar as eventuais dúvidas surgidas a respeito do programa de Pós-graduação.

A meus familiares, amigos e todos que contribuíram e vibraram para a realização deste trabalho. Minha eterna GRATIDÃO!

Resumo

Existem micro-organismos capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono e energia, sendo assim, bastante atrativos como bioconversores do glicerol bruto gerado a partir da produção de biodiesel. Em *Saccharomyces cerevisiae* via de metabolização do glicerol é bem definida, em que um sistema simporte de prótons, codificado pelo gene *STL1*, é preferencialmente utilizado na captação do glicerol quando fontes fermentáveis de carbono não estão presentes. O presente trabalho objetivou identificar o gene *STL1* que codifica um provável transportador de glicerol em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105, cujo o genoma ainda não se encontra disponível em banco de dados. O gene identificado apresentou 1443 pb e 480 aminoácidos. A análise *in silico* comparativa da região promotora identificou fatores de transcrição putativos associados à regulação de *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 e *S. cerevisiae*, sugerindo uma notável distinção entre os elementos putativos de ambos. A análise da árvore filogenética, construída a partir das sequências de proteínas Stl1 de diferentes leveduras, evidenciou uma maior similaridade entre o transportador putativo de *W. anomalus* LBCM105 e *W. ciferrii*, e uma maior distância em relação a *S. cerevisiae*. Após caracterização do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105, foram realizadas análises da expressão gênica deste em condições de cultivo contendo glicose ou glicerol, como fonte de carbono. O gene *STL1* apresentou uma expressão 23,76 vezes maior em glicerol em relação à condição de meio contendo glicose. A avaliação do transporte de glicerol pela *W. anomalus* LBCM105 evidenciou um transporte ativo em condições de cultivo contendo glicose ou glicerol, no entanto, Stl1p foi induzida em presença de glicerol. Os resultados apresentaram dados relevantes quanto à possível identificação do transportador de glicerol em *W. anomalus* LBCM105, evidenciando um potencial significativo na aplicação biotecnológica quanto ao consumo de glicerol bruto, resíduo da indústria de biodiesel, uma vez que demonstrou ser bastante eficiente na captação de glicerol.

Palavras-chave: *Wickerhamomyces anomalus*, glicerol, *STL1*, transporte ativo.

Abstract

There are microorganisms capable of using glycerol as carbon source, being very attractive to convert crude glycerol, a byproduct generated from the production of biodiesel. It is known that *Saccharomyces cerevisiae* glycerol metabolism pathway is well defined and a proton symport system encoded by *STL1* is preferably used as the glycerol uptake when fermentable carbon sources are not present. This study aimed to identify the *STL1* gene that encodes a putative glycerol transporter in *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105, whose genome is not yet available in the database. The recognized and sequenced gene showed 1443 bp and 480 amino acids. The comparative analysis *in silico* of the promoter region identified putative transcription factors associated with the regulation of *STL1* gene from *W. anomalus* LBCM105 and *S. cerevisiae*, suggesting a remarkable distinction between the putative elements of both. A phylogenetic tree analysis was constructed using different *STL1* sequences from different yeasts showed less evolutionary distance between *W. anomalus* LBCM105 and *W. ciferrii* transporter, and a greater distance from *S. cerevisiae*. After characterizing the *W. anomalus* LBCM105 *STL1* gene, gene expression analyzes were made using conditions containing glucose or glycerol as carbon source. *STL1* showed a 23.76-fold higher expression in glycerol in relation to medium containing glucose. *W. anomalus* LBCM105 glycerol uptake evaluation showed an active transport in medium containing glucose or glycerol, however *Stl1p* was up-regulated in the presence of glycerol. The results demonstrate relevant data about the probable *W. anomalus* LBCM105 glycerol transporter characterization, indicating a significant potential for biotechnological applications as crude glycerol consumer, since it was very efficient in the uptake of glycerol.

Keywords: *Wickerhamomyces anomalus*, glycerol, *STL1*, active transport.

Sumário

1. Revisão de literatura.....	1
1.1 Glicerol.....	1
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e o metabolismo de glicerol	2
1.3 Transportador de glicerol em leveduras codificado pelo gene <i>STL1</i>	4
1.4 <i>Pichia</i> sp.....	5
1.5 <i>Pichia anomala</i> (<i>Wickerhamomyces anomalus</i>)	6
1.6 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> versus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. Materiais e métodos	11
3.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	11
3.2 Caracterização do gene <i>STL1</i> putativo em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	11
3.2.1 Extração do DNA genômico.....	11
3.2.2 Detecção do gene <i>STL1</i> em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105.....	12
3.2.3 Sequenciamento, caracterização das sequências de DNA e análises comparativas	13
3.3 Análise <i>in silico</i> da putativa região reguladora (promotor) do gene <i>STL1</i> putativo de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	14
3.4 Análise filogenética.....	14
3.5 Expressão do gene <i>STL1</i> de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105.....	15
3.5.1 Indução da expressão de <i>STL1</i> e extração de RNA total.....	15
3.5.2 Tratamento das amostras de RNA com DNase	16
3.5.3 Análise qualitativa da expressão do gene <i>STL1</i> por RT-PCR	16
3.5.4 Análise da expressão do gene <i>STL1</i> por PCR quantitativa (q-PCR)	17

3.6	Análise do transporte de [C ¹⁴] glicerol pela proteína Stl1	18
4.	Resultados e discussões.....	20
4.1	Caracterização do gene <i>STL1</i> putativo de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	20
4.2	Análise filogenética baseada na sequência do gene <i>STL1</i>	24
4.3	Análise <i>in silico</i> do promotor do gene <i>STL1</i> putativo em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	26
4.4	Expressão qualitativa do gene <i>STL1</i> putativo em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	29
4.5	Quantificação da expressão relativa do gene <i>STL1</i> putativo em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio contendo glicose ou glicerol.....	29
4.6	Transporte de glicerol em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105.....	33
5.	Conclusões	36
6.	Perspectivas.....	37
7.	Referências bibliográficas.....	38

Lista de figuras

- Figura 1.** Reação de transesterificação de um triglicerídeo-modelo (Geris *et al.*, 2007).....2
- Figura 2.** Vias envolvidas na assimilação da glicose e do glicerol, sob condições aeróbias: modelo *S. cerevisiae* (Merico *et al.*, 2010).4
- Figura 3.** Diagrama de Venn demonstrando comparação dos proteomas de *S. cerevisiae* e *W. anomalus* (Schneider *et al.*, 2012).8
- Figura 4.** Produtos de amplificação por PCR referente ao gene *STL1* de *S. cerevisiae*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos(A), e referente ao gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105, utilizando oligonucleotídeos iniciadores degenerados (B).21
- Figura 5.** Alinhamento entre a sequência parcial do gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105 (500 pb) e a sequência do gene *STL1* de *S. cerevisiae*. O alinhamento foi realizado utilizando-se o software Bioedit v7.2.5.....21
- Figura 6.** Sequência do gene *STL1* putativo de *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105. A sequência deduzida de aminoácidos é mostrada abaixo dos respectivos códons.23
- Figura 7.** Distância filogenética de proteínas SLT1 de diferentes leveduras. Árvore filogenética não enraizada baseada no alinhamento de sequências de proteínas Stl1 preditas.....25
- Figura 8.** Expressão qualitativa do gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105 em condições de cultivo contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono.30
- Figura 9.** Expressão relativa do gene *STL1* putativo em *W. anomalus* LBCM105 (A) e *S. cerevisiae* (B), em glicose ou glicerol.32
- Figura 10.** Transporte ativo de glicerol pelo transportador Stl1 de *W. anomalus* LBCM105 (A) e *S. cerevisiae* (B). Acúmulo de glicerol marcado ($[C^{14}]$ glicerol) em células de *W. anomalus* LBCM105 (A) e *S. cerevisiae* (B) crescidas em meio YP contendo glicerol 2% (●) ou glicose 2% (○).....35

Lista de tabelas

Tabela 1.	Oligonucleotídeos desenhados com base no gene <i>STL1</i> de <i>S. cerevisiae</i> BY4741	12
Tabela 2.	Oligonucleotídeos degenerados referentes ao gene putativo <i>STL1</i> de <i>W. anomalus</i> LBCM105	13
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados para verificar o tratamento das amostras de RNA com DNase	16
Tabela 4.	Oligonucleotídeos referentes ao gene <i>STL1</i> de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 e <i>W. anomalus</i> LBCM105 utilizados na técnica de qPCR.....	18
Tabela 5.	Fatores de transcrição putativos correspondentes à região promotora (1000 pb <i>upstream</i>) do gene <i>STL1</i> putativo em <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	27

Lista de Abreviaturas

<i>ACT1</i>	Gene codificador de β -actina
<i>ADH</i>	Gene codificador de álcool desidrogenase
Adr1p	Fator de transcrição de ligação ao DNA
ARS	<i>Agriculture Research Service</i>
Cat8p	Fator de transcrição de ligação ao DNA
CCCP	<i>Carbonyl cyanidine m-chlorophenyl hydrazone</i>
<i>DAK</i>	Gene codificador de dihidroxiacetonaquinase
<i>FPS1</i>	Gene codificador de um canal de aquagliceroporina
<i>GCY</i>	Gene codificador de glicerol desidrogenase
<i>GUT1</i>	Gene codificador de glicerolquinase
<i>GUT2</i>	Gene codificador de glicerol-3-fosfato desidrogenase
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol Response</i>
Hsf1p	Fator de transcrição responsivo ao estresse
<i>HXT</i>	<i>Hexose transport gene</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MAPK	MAP quinase – <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
PDC	Gene codificador de piruvato descarboxilase
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(5-feniloxazol)-benzeno
<i>STL1</i>	Gene codificador de um <i>sugar transporter-like</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
YP	<i>Yeast extract + meat peptone</i>

1. Revisão de literatura

1.1 Glicerol

O composto orgânico 1, 2, 3-propanotriol, ou comumente nomeado por glicerol, e comercialmente conhecido como glicerina, é classificado como um poliálcool (Rivaldi *et al.*, 2008). Este composto em sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico. Como resíduo da produção de biodiesel, usualmente referenciado como glicerol bruto, caracteriza-se por ser um líquido viscoso, pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, metanol ou etanol, triglicérides, polímeros e água (Ooi *et al.*, 2004).

O glicerol é um composto abundante na natureza, uma vez que é componente estrutural de vários lipídeos, como também, um importante intermediário no metabolismo de organismos procariotos e eucariotos (Brisson *et al.*, 2001). Ademais, como já é descrito na literatura, existem alguns micro-organismos capazes de utilizarem o glicerol como fonte de carbono e energia o que os torna bastante atrativos como bioconversores do glicerol bruto gerado a partir da produção de biodiesel (Lages *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2009).

O biodiesel tem recebido uma atenção nos últimos anos devido à diminuição das reservas de petróleo, além dos impactos ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis (Fan *et al.*, 2010). Apesar do biodiesel representar uma alternativa renovável e ambientalmente segura para a substituição dos combustíveis fósseis, ao mesmo tempo, a sua produção gera como principal subproduto o glicerol bruto, representando aproximadamente 10% do volume final (Fan *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). A projeção é que em 2016 a produção mundial do biodiesel chegará a 37 bilhões de barris, implicando em cerca de 4 bilhões de barris de glicerol bruto (Anand & Saxena, 2011). No entanto, uma vez que a purificação do glicerol bruto requer processos dispendiosos, sendo economicamente desvantajoso, a sua utilização apresenta grandes oportunidades para novas aplicações (Yang *et al.*, 2012).

Além das suas importâncias estrutural e energética, o glicerol também desempenha uma importante função no controle osmótico celular, sendo assim considerado um soluto compatível (Silva *et al.*, 2009). Em resposta a perda de pressão de turgor, a célula é capaz de acumular solutos compatíveis no citoplasma que são capazes de amenizar os efeitos promovidos pela condição de estresse (Silva *et al.*, 2009). Embora haja variações entre espécies, o acúmulo de solutos compatíveis é geralmente regulado pela cascata de sinalização

via MAP quinase (MAPK). Em leveduras, a via HOG (*High Osmolarity Glycerol Response Pathway*), que regula os níveis intracelulares de glicerol, é o sistema com maior compreensão envolvendo a osmo-indução em resposta ao estresse em leveduras (Brisson *et al.*, 2001).

O glicerol pode ser produzido tanto por fermentação microbiana, como por síntese química a partir de matéria-prima petroquímica, ou pode ser recuperado como um produto secundário da produção de sabão a partir de gordura (Wang *et al.*, 2001), além de ser o principal subproduto obtido na transesterificação de óleos vegetais e/ou gordura animal na produção de biodiesel (Figura 1) (Brisson *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2009).

Devido às suas características físico-químicas, o glicerol na sua forma pura possui inúmeras aplicações industriais, como na terapêutica, diagnóstico e produção de insumos (Wang *et al.*, 2001). No entanto, estudos sobre a utilização do glicerol na sua forma bruta é de grande relevância para o âmbito econômico e ambiental. Dentro deste contexto, a caracterização de micro-organismos capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono e convertê-lo a produtos de maior valor agregado, por processos biotecnológicos, representa uma interessante alternativa para a viabilização do seu uso, considerando o atual cenário de crescente produção de biodiesel.



Figura 1. Reação de transesterificação de um triglicerídeo-modelo (Geris *et al.*, 2007).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* e o metabolismo de glicerol

Tradicionalmente, a levedura *S. cerevisiae* é conhecida como levedura cervejeira e de panificação. Ao longo de 8.000 anos esta levedura desempenha um importante papel na produção e conservação de alimentos devido a sua capacidade de fermentar glicose, produzindo etanol e dióxido de carbono (Schneiter, 2004). Durante séculos, *S. cerevisiae* tem sido utilizada para a produção de alimentos e bebidas alcoólicas, e hoje, é amplamente aplicada na indústria farmacêutica com fins biotecnológicos (Ostergaard *et al.*, 2000). Atualmente, *S. cerevisiae* é um dos micro-organismos eucariotos mais estudado, o qual

possui o estatuto GRAS (*Generally Regarded as Safe*) e ampla aplicação industrial (Ostergaard *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas, *S. cerevisiae* tem sido um organismo modelo muito utilizado em pesquisas de bases genéticas e moleculares (Bell & Dutta, 2002). Tal se deve ao completo sequenciamento do genoma de *S. cerevisiae*, e do elevado grau de conservação de seus mecanismos celulares fundamentais de replicação, recombinação, divisão celular e metabólico entre a maioria dos eucariotos, incluindo os mamíferos (Schneiter, 2004).

Embora a glicose seja a fonte de carbono preferencial de *S. cerevisiae*, esta levedura é capaz de utilizar o glicerol em condições aeróbias. Porém, as vias envolvidas na assimilação do glicerol podem se diferenciar de acordo com a espécie, sendo a membrana a primeira barreira para sua utilização na célula microbiana (Nevoigt & Stahl, 1997; Wang *et al.*, 2001). A captação de glicerol em *S. cerevisiae* pode acontecer por dois mecanismos diferentes, dependendo das condições de crescimento. Quando em presença de glicose, o glicerol permeia a célula por transporte facilitado, dependente de um canal protéico, produto do gene *FPS1*. Uma vez que o transporte do glicerol por difusão passiva ocorre em ambos os sentidos, o mecanismo dependente do canal Fps1p demonstrou ser mais importante para exportação do que captação do glicerol sob condição de choque hiposmótico (Tamás *et al.*, 1999). Por outro lado, em meios de crescimento contendo etanol, glicerol ou acetato, um sistema simporte de prótons é preferencialmente utilizado na captação do glicerol (Lages & Lucas, 1997). Ferreira e colaboradores (2005) reportaram o gene *STL1* (*Sugar transporter-like*) como o responsável pelo transporte ativo de glicerol em *S. cerevisiae*. Outras leveduras, como *Debaryomyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Zygosaccharomyces rouxii* também apresentaram transporte ativo de glicerol por simporte glicerol/H⁺ ou simporte glicerol/Na⁺ (Lages *et al.*, 1999).

A seguir, a Figura 2 apresenta a via de metabolização do glicerol em *S. cerevisiae*, segundo Merico e colaboradores (2010). Após a internalização do glicerol, a sua metabolização pode proceder por duas vias, fosforilativa ou oxidativa, respectivamente, via da glicerol-3-fosfato e via da dihidroxiacetona. O primeiro mecanismo envolve a glicerol quinase, codificada por *GUT1*, convertendo o glicerol a glicerol-3-fosfato, e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, localizada na superfície externa da mitocôndria, codificada por *GUT2*. Na outra via, o glicerol é primeiramente convertido a dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (*GCY*) e, posteriormente, a dihidroxiacetona fosfato pela dihidroxiacetona quinase (*DAK*) (Merico *et al.*, 2010).

uma proteína localizada na membrana plasmática sendo a mesma reprimida em presença de glicose. Por outro lado, em condições indutivas, este transportador desempenha um importante papel na rápida acumulação do glicerol por aumentar o aporte de glicerol no citoplasma (Lages & Lucas, 1997; Holst *et al.*, 2000). Em condições de estresse osmótico *STLI* é induzido por um mecanismo Hog1p- e Hot1p-dependente (Rep *et al.*, 2000).

Todavia, Hedges e colaboradores (1995) demonstraram que em *S. cerevisiae* Cat8p, um fator de transcrição que regula um subconjunto de genes gliconeogênicos quando fontes de carbono não fermentáveis estão disponíveis no meio celular, induz *STLI* (Haurie *et al.*, 1995). Adicionalmente, em outro trabalho Ferreira & Lucas (2007), foi demonstrado uma alta expressão de *STLI* a 37°C em *S. cerevisiae*, sendo esta super-expressão acompanhada de uma hiper-atividade de Stl1p, resultando também em uma alta velocidade de absorção ativa de glicerol. Neste mesmo trabalho, observou-se que sob estas mesmas condições, houve uma menor repressão em presença de glicose, em nível de expressão e atividade da proteína. Ainda assim, Tulha e colaboradores (2010) observaram que em *S. cerevisiae* a combinação de baixas temperaturas e a presença de glicerol extracelular promove uma alta indução de Stl1p, aumentando os níveis intracelulares de glicerol, promovendo assim uma melhor sobrevivência da célula.

1.4 *Pichia* sp

O gênero de leveduras *Pichia* ssp. apresenta um dos maiores números de espécies e, inclui alguns dos organismos mais interessantes tanto do ponto de vista laboratorial, como industrial (Rodriguez *et al.*, 1995). Este gênero tem apresentado grande relevância científica, sendo assim utilizado em diversas pesquisas devido às suas características de biologia celular, assim como, por suas aplicações biotecnológicas na produção de proteína terapêutica e alimentos a partir de fermentação, como no uso de agente de controle biológico e biocombustível (Walker, 2011). Além disso, espécies de *Pichia* têm demonstrado serem excelentes hospedeiras para a expressão de genes heterólogos, como por exemplo, aqueles relacionados à produção da enzima invertase, com o rendimento equivalente ou maior do que aqueles obtidos por *Saccharomyces* (Walker, 2011). Dentre essas, a espécie *Pichia anomala* exibe uma ampla diversidade no que diz respeito ao seu habitat natural, morfologia de crescimento, metabolismo, tolerância ao estresse osmótico e propriedades antimicrobianas (Walker, 2011).

1.5 *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*)

A levedura *P. anomala* foi descrita pela primeira vez por Hansen em 1894, que a nomeou como *Saccharomyces anomalus*. Em 1919, Sydow & Sydow a renomearam como *Hansenula anomala*, transferindo-a de gênero. Posteriormente, Kurtzman (1984) a reclassificou como *P. anomala*, e mais tarde, em outro trabalho do mesmo autor, a mesma foi reclassificada como pertencente ao gênero *Wickerhamomyces* (Kurtzman, 2011). Todavia, a consolidação de sua classificação taxonômica parece ainda ser alvo de questionamentos, uma vez que no *The First International Pichia anomala Symposium*, realizado em 2010, alguns autores argumentaram novamente sobre a legitimidade das classificações (Naumov & Naumova, 2010; Passoth *et al.*, 2011). Desta forma, considerando que o atual momento consiste em um período de transição no que se refere ao reconhecimento e consequente estabelecimento da classificação vigente, o presente trabalho passou a utilizar *Wickerhamomyces anomalus* embora em alguns trechos da revisão a classificação *Pichia anomala* foi mantida em acordo aos trabalhos referenciados. Ainda assim, informações sobre a fisiologia, metabolismo, assim como as bases genéticas de *P. anomala*, estão disponíveis de forma limitada, não sendo ainda bem caracterizadas, uma vez que os primeiros relatos sobre a fisiologia geral, caracterização genética, bem como sua manipulação genética, foram publicados por Naumov e colaboradores (2001), Grevesse e colaboradores (2003) e Fredlund e colaboradores (2004) (*apud* Passoth *et al.*, 2006).

Pichia anomala é uma espécie de levedura ascomicética e heterotática, que pode se reproduzir de forma assexuada por brotamento, ou sexuadamente pela formação de ascósporos *hat-shaped* (Kurtzman, 1998). Como demonstrado por Hoog (1996), *P. anomala* é classificada como micro-organismo de nível de biossegurança 1, considerada assim segura para indivíduos saudáveis. *P. anomala* já foi isolada em diversos habitats como, por exemplo, sementes de plantas, cascas de frutas, tecidos humanos, produtos lácteos e de panificação, águas residuais, secreções de árvores e ambientes marinhos (Walker, 2011). Por consequência, esta espécie apresenta uma notável robustez fisiológica em relação à tolerância a condições de estresse ambiental, como baixo e alto pH (2.0 – 12.4), estresse osmótico, temperaturas entre 3° C e 37° C, metabolização de diferentes tipos de nutrientes, bem como condições restritas de oxigênio (Fredlund *et al.*, 2002; Passoth *et al.*, 2006).

Em estudos prévios, cepas de *P. anomala* foram capazes de atuar como agentes de biocontrole (Passoth *et al.*, 2006; Schnurer & Jonsson, 2011; Olstorpe, 2010; Jijakli, 2011; Passoth *et al.*, 2011). Nestes estudos, cepas de *P. anomala* apresentaram perfil competitivo

capazes de inibir uma ampla variedade de outros micro-organismos. Destaca-se também em estudo realizado por Passoth e colaboradores (2009), que *P. anomala* apresentou atividade antifúngica, inibindo de forma eficiente o crescimento de bolor em grãos úmidos hermeticamente armazenados. Outra habilidade caracterizada em *P. anomala* foi a atividade antimicrobiana, relacionada com a biossíntese de compostos voláteis como, acetato de etila, acetato de isoamila e propionato de etila, e com a produção de toxinas *killer* (Schneider *et al.*, 2012). Segundo Satyanarayana & Kunze (2009), proteínas *killer* são frequentemente correlacionadas a glucanases que são capazes de converter beta-glucano, um componente estrutural da parede celular de leveduras e fungos, à moléculas de glicose. Desta forma, observou-se que glucanases oriundas de cepas de *P. anomala* podem ser usadas para melhorar a síntese biotecnológica de proteínas recombinantes, produzidas por outras leveduras, através da lise controlada da parede celular da respectiva levedura, com a liberação da proteína. Além disso, os derivados da toxina de *P. anomala* podem ser usados também para a produção de novas vacinas.

Ademais, *P. anomala* é conhecida por melhorar o sabor, a textura, o rendimento e a segurança dos produtos agrícolas, através de sua competição com fungos indesejáveis, sendo alvo de diversos pesquisadores de diferentes áreas como, meio ambiente, indústria e ciências médicas (Jijakli, 2011; Olstorpe, 2010). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e o Serviço de Pesquisa Agrícola (ARS), a levedura *P. anomala* compete com o fungo *Aspergillus flavus* inibindo o seu crescimento e o apodrecimento das nozes (Passoth *et al.*, 2006; Passoth *et al.*, 2011). Outras aplicações com potencial biotecnológico de *P. anomala* incluem a biorremediação ambiental, biofármacos e biocombustíveis (Polonelli *et al.*, 2011; Walker, 2011).

Quanto ao crescimento e a sobrevivência de *P. anomala* nos diversos ambientes, foi observado a necessidade de uma rápida adaptação do seu metabolismo energético, de condições aeróbicas para condições limitadas de oxigênio, ou seja, regulação da respiração e fermentação (Fredlund *et al.*, 2004). Desta forma, foi demonstrado também que a influência da limitação de oxigênio na regulação do metabolismo energético em *P. anomala* afeta não só o seu crescimento, mas também a atividade antimicrobiana e o sistema de biocontrole (Passoth *et al.*, 2006).

Contudo, não se encontra dados sobre o metabolismo de glicerol em *W. anomalus* (*P. anomala*) descritos na literatura científica. Dentro deste contexto, o estudo aprofundado do mecanismo metabólico do glicerol nesta levedura, que apresenta um grande potencial

biotecnológico, como documentado por vários autores, corroborou com o objetivo deste presente projeto.

1.6 *Wickerhamomyces anomalus* versus *Saccharomyces cerevisiae*

Em um prévio trabalho de Schneider e colaboradores (2012) o sequenciamento parcial de *W. anomalus* DSM 6766 possibilitou análises metabólicas e filogenéticas comparativas entre espécies de leveduras. Neste estudo, as análises genéticas comparativas demonstraram que *W. anomalus* NRRL Y-366 compartilha cerca de 1799 proteínas com *S. cerevisiae* S288C (Figura 3).

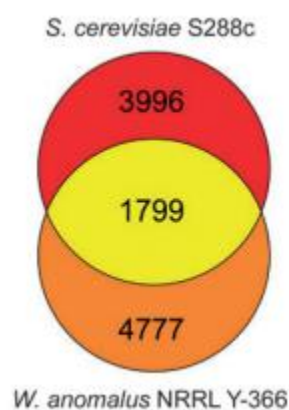


Figura 3. Diagrama de Venn demonstrando comparação dos proteomas de *S. cerevisiae* e *W. anomalus* (Schneider *et al.*, 2012).

Todavia, apesar das semelhanças compartilhadas entre *P. anomala* e *S. cerevisiae*, a regulação do metabolismo respiro-fermentativo destas leveduras parece ser distinto (Fredlund *et al.*, 2004). Passoth e colaboradores (2006) observaram que culturas de *P. anomala* sob condições aeróbias e na presença de alta concentração de açúcar fermentável utilizaram essencialmente o metabolismo de respiração contrastando com *S. cerevisiae*, cuja respiração e fermentação podem ser reguladas pela disponibilidade de açúcar no meio. Em culturas de *S. cerevisiae* um pulso de glicose ($> 6,0 \times 10^{-3}M$) induz rapidamente a uma fermentação alcoólica por ativar imediatamente as enzimas álcool desidrogenase (*ADH*) e piruvato descarboxilase (*PDC*) (De Deken, 1966). Contudo, a regulação por glicose em *S. cerevisiae* é uma exceção em relação à maioria das leveduras que respondem preferencialmente à disponibilidade de oxigênio do que a concentração de glicose (Fredlund *et al.*, 2004). Ainda no estudo de Passoth e colaboradores (2006), a via fermentativa de *P. anomala* foi apenas

utilizada em condições limitantes de oxigênio, confirmando assim que *P. anomala* é uma levedura que preferencialmente faz respiração, sendo o oxigênio o principal regulador de seu metabolismo energético, uma vez que a presença de glicose não reprimiu a respiração e nem impossibilitou a utilização de fontes alternativas de carbono. Neste contexto, *P. anomala* é considerada uma levedura *Crabtree*-negativa enquanto *S. cerevisiae*, via de regra, é considerada *Crabtree*-positiva.

Considerando a ampla capacidade de utilização do glicerol como fonte de carbono e energia por muitos micro-organismos, tornando-os bastante atrativos como bioconversores do glicerol bruto gerado a partir da produção de biodiesel, e diante da importância do transportador *STL1* na compreensão e otimização do metabolismo de glicerol em leveduras, o presente estudo optou por caracterizar uma levedura eficiente na utilização de glicerol como fonte de carbono. No recente trabalho de Conceição e colaboradores (2015), foi realizado um *screening* da coleção de leveduras isoladas de dornas de cachaça do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/UFOP (LBCM), avaliadas quanto ao possível potencial biotecnológico apresentado pelos isolados, dentre eles com base no crescimento em glicerol e quanto as variáveis existentes no glicerol bruto, como a presença de sais, álcoois e determinada faixa de pH. O isolado inicialmente identificado como LBCM105 e posteriormente identificado pelo sequenciamento da região ITS como *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*), foi selecionado por apresentar o melhor desempenho de crescimento em glicerol. Neste estudo *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105 foi capaz de crescer em meio YP contendo 25% (v/v) de glicerol tornando assim nosso objeto de estudo no presente projeto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar o gene *STL1*, codificador de um transportador ativo de glicerol, em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar o gene e o promotor *STL1* putativos de *W. anomalus* LBCM105;
- b) Analisar a expressão do gene *STL1* putativo em *W. anomalus* LBCM105 em meio contendo glicerol ou glicose;
- c) Avaliar o transporte de glicerol em *W. anomalus* LBCM105 cultivada em meio contendo glicerol ou glicose.

3. Materiais e métodos

3.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Neste trabalho foram utilizadas as cepas de leveduras: *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105 pertencente à coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/UFOP e *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, pertencente à coleção Euroscarf.

As leveduras foram cultivadas em meio YP, contendo 1% (p/v) de extrato de levedura (*Yeast Extract Powder* – Himedia) e 2% (p/v) de peptona (*Meat Peptone* – Himedia). Como fontes de carbono foram adicionadas ao meio 2% (p/v) de glicose (Vetec) ou glicerol p.a. (Vetec). Para o preparo do YP sólido, foi acrescentado 1,5% (p/v) de ágar (Merck) ao meio. As células foram incubadas a 30 °C, sob agitação a 200 rpm em condição aeróbia.

3.2 Caracterização do gene *STL1* putativo em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

3.2.1 Extração do DNA genômico

As leveduras *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105 foram crescidas em placas de Petri contendo meio YP glicose 2% e incubadas a 30°C por 72 h. Após este período, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio YP glicose 2% e incubado a 30°C, sob agitação a 200 rpm (*shaker* New Brunswick Model G25), por 24 h. Alíquotas de 2 mL dessa cultura foram coletadas e centrifugadas por 2 min a 3000 g (Micro-centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de água destilada. A suspensão de células foi novamente centrifugada por 2 min a 3000 g (Micro-centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de estabilização (Sorbitol 1M, EDTA-Na₂ 2 mM, pH 7,4). Em seguida foram adicionados 30 µL de liticase 5U.L⁻¹ e incubou-se por 60 min a 37°C. Foram adicionados 200 µL de tampão de lise (TRIS-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 0,1M, pH 7,5) e em seguida adicionados 10 µL de SDS 10%. A mistura foi incubada a 65°C por 20 min. Foram adicionados 160 µL de solução de acetato de potássio 5M e os tubos permaneceram a -20°C por toda a noite. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 10000 rpm (Micro-centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e igual volume de isopropanol foi adicionado. Os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 30 min e, em seguida, foram centrifugados por 5 min a 12000 g

(Micro-centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com etanol 70% (v/v). Após evaporação do etanol, o sedimento foi ressuspendido em 30 µL de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore). As amostras foram mantidas a -20 °C até as próximas análises.

O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Sigma) 1% (p/v) em tampão TAE (Tris-base 0,4 M; EDTA 0,5 M; pH 8,0). O gel foi corado em brometo de etídio (1µg.mL⁻¹) por 30 min e logo após, foi fotografado (Fotodocumentador AlphaImager® Mini).

3.2.2 Detecção do gene *STL1* em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

Para verificar a presença ou ausência do gene *STL1* em *W. anomalus* LBCM105, foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Inicialmente, foram utilizados oligonucleotídeos desenhados com base na sequência da ORF do gene *STL1* de *S. cerevisiae* depositada nos bancos de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – número de acesso NC_001136.10) e SGD (*Saccharomyces Genome Database* – número de acesso S000002944), ver Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa *IDT* – *Integrated DNA Technologies* (Belo Horizonte – MG/Brasil).

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados com base no gene *STL1* de *S. cerevisiae* BY4741

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
<i>STL1 – FW</i>	TCCGAATTCATGATAAAAATTATCGAA
<i>STL1 – RV</i>	GACCTCGAGTCAACAAAATTTGCTTT

Posteriormente, foram desenhados os oligonucleotídeos degenerados (Tabela 2) referentes ao gene *STL1* com base nas sequências de aminoácidos das seguintes leveduras: *S. cerevisiae* (nº de acesso P39932), *Millerozyma farinosa* (*Pichia sorbitophila* - nº de acesso XP 004195829.1), *Candida albicans* (nº de acesso EEQ46634), *Scheffersomyces stipitis* (nº de acesso ABN65745), uma vez que o genoma de *W. anomalus* não está completamente sequenciado ou disponível. Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio do programa *Primer 3 Plus* disponível em sua página na internet (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

Tabela 2. Oligonucleotídeos degenerados referentes ao gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
<i>STL1 Pa – FW</i>	GGGTTTGGTTATGATCAAGGT
<i>STL1 Pa – RV</i>	GATCTACCAGCAGTTTCTGG

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, o qual continha 1 µL de DNA genômico (50 ng), 1 µL de cada oligonucleotídeos (5 µM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 5 µL de tampão 5X (Promega), 0,2 µL da Taq DNA polimerase (Promega) e 15,8 µL de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore).

As condições de amplificação utilizando os oligonucleotídeos da Tabela 1 foram: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 2 min, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 1 min e 30 s. Depois do último ciclo houve uma extensão final a 72°C por 5 min.

Para os oligonucleotídeos da Tabela 2, foram utilizadas as mesmas condições de reação descritas acima, alterando-se nos ciclos da PCR o tempo da desnaturação a 94°C para 1 min, a temperatura de anelamento dos oligos foi a 48°C e a extensão a 72°C foi por 1 min e 50 s. As análises dos produtos amplificados foram realizadas segundo descrito no final do item 3.2.1, utilizando-se o marcador de 10 Kb (MassRuler DNA Ladder Mix – ThermoScientific) como padrão.

Para enviar os produtos de PCR para sequenciamento, as bandas foram recortadas do gel e os fragmentos do DNA foram purificados com o Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup* - MECHEREY-NAGEL, segundo as instruções do fabricante.

3.2.3 Sequenciamento, caracterização das sequências de DNA e análises comparativas

Os produtos de PCR purificados referentes ao gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 foram enviados para sequenciamento na empresa Myleus Biotechnology, localizada em Belo Horizonte – MG, Brasil. As reações de sequenciamento foram realizadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

Com base na sequência parcial do gene *STL1* de *W. anomalus* obtida pelo sequenciamento anterior foi possível obter a sequência completa deste gene, que foi realizado pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), situado em Campinas – SP, Brasil, uma vez que até o presente momento este laboratório detém a

sequência parcial do genoma de *W. anomalus* LBCM105. Para a síntese da biblioteca foi utilizado o kit *Nextera DNA Sample Preparation*. As reações de sequenciamento foram processadas utilizando-se a plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) e o *MiSeq Reagent Kit V2*, num total de 300 ciclos, resultando em 150 pb a cada leitura. O laboratório CTBE está realizando a montagem do genoma completo de *W. anomalus* LBCM105.

Para caracterização das sequências, procedeu-se a busca por sequências similares nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLAST e o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o *software BioEdit*, versão 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>).

3.3 Análise *in silico* da putativa região reguladora (promotor) do gene *STL1* putativo de *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

No intuito de investigar possíveis distinções regulatórias entre o gene *STL1* putativo em *W. anomalus* LBCM105 e o gene *STL1* em *S. cerevisiae* uma análise *in silico* foi realizada. A putativa região reguladora do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 foi analisada através do site Yeastract (<http://www.yeastract.com/>). Sequências de 1000 pb *upstream* ao gene *STL1* em *W. anomalus* LBCM105 e em *S. cerevisiae* S288C foram analisadas quanto a presença de sequências consensos de reconhecimento dos fatores de transcrição presentes no banco de dados do Yeastract e os resultados foram comparados e correlacionados. Para tanto, foram considerados tanto os fatores de transcrição já documentados como também os fatores de transcrição putativos referentes a região promotora do gene *STL1* em *S. cerevisiae* S288C. Além disso, a substituição de uma ou duas bases nas sequências consensos foram consideradas.

3.4 Análise filogenética

A fim de inferir a distância evolutiva entre as espécies foram realizados múltiplos alinhamentos entre as sequências de aminoácidos de *STL1* de *S. cerevisiae* (NP_010825.3); *Kluyveromyces lactis* (CAG98957.1); *Z. rouxii* (CAR30744.1); *Yarrowia lipolytica* (XP_502271.1); *W. ciferrii* (XP_011274863.1); *W. anomalus* (KP856970); *C. albicans* (EEQ46634); *C. dubliniensis* (CAX41301.1); *P. sorbitophila* (*M. farinosa*) (PISO0A00352g); *Debaryomyces hansenii* (XP_459387.2); *C. tenuis* (XP_006687420.1),

utilizando-se o programa CLUSTALW versão 2.1. As sequências foram agrupadas com base no método Neighbor Joining. A matriz de distância obtida foi utilizada na construção da árvore filogenética pelo programa Mega 6.

3.5 Expressão do gene *STL1* de *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

3.5.1 Indução da expressão de *STL1* e extração de RNA total

As leveduras *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105 foram cultivadas em triplicata em meio YP glicose 2% ou YP glicerol 2%, incubadas a 30°C, sob agitação a 200 rpm (*shaker* New Brunswick Model G25), até atingirem DO_{600nm} 0,8 (a partir de DO_{600nm} inicial 0,2). Foram coletados 2 mL das culturas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no ultra-freezer a -80°C. Para a extração propriamente dita, as células foram lavadas com 1 mL de água DEPC [água purificada (Sistema Milli-Q Millipore) e DEPC 0,1% (v/v)], centrifugadas a 3000 g por 10 min e ressuspensas em 300 µL de fenol:água comercial (BioAgency®), seguida da adição de 300 µL de TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5%, pH 7,5). Os tubos foram incubados em bloco térmico a 70°C por 1 h, sendo agitados vigorosamente em Vórtex, a cada 10 min. As amostras foram centrifugadas a 16000 g (micro-centrífuga Eppendorf 5415D), por 5 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo eppendorf. Em seguida, foram adicionados 200 µL de fenol:água comercial (BioAgency®), e novamente as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e adicionaram-se 300 µL de clorofórmio (Sigma). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 16000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e adicionaram-se 25 µL de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,3) e 1 mL de etanol 100% (Sigma) resfriado. As amostras foram incubadas por toda a noite a -80°C. No dia seguinte, realizou-se a centrifugação a 16000 g por 20 min e o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% (Sigma), seco e ressuspensado em 30 µL de água DEPC. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão NBC (ácido bórico 1 M; citrato de sódio 20 mM; NaOH 100 mM; pH 7,5) e formaldeído 6,7%. O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg.mL⁻¹) por 30 min e, em seguida fotografado (Fotodocumentador AlphaImager® Mini). Por último, a concentração total de RNA foi determinada a 260 e 280 nm utilizando-se espectrômetro (NanoDrop 2000, ThermoScientific) e as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

3.5.2 Tratamento das amostras de RNA com DNase

Para a análise da expressão qualitativa de *STL1* por RT-PCR, primeiramente tratou-se as amostras de RNA com DNase. A reação foi realizada para um volume final de 10 μL , o qual continha 2 μL de RNA total ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de tampão 10X RNase-free (Promega), 1 μL de DNase RNase-free (Promega) e 6 μL de água DEPC [água purificada (Sistema Milli-Q Millipore) e DEPC 0,1%], e incubada a 37°C por 1 h em banho-maria. Ao final de 1 h foi adicionado 1 μL de DNase *stop-solution* (Promega) e incubou-se as amostras novamente a 65°C por 10 min em banho-maria. Para verificar o tratamento das amostras com DNase, e averiguar a contaminação por DNA genômico, foi realizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando oligonucleotídeos referente ao gene constitutivo *ACT1*, que codifica a β -actina, como controle (Tabela 3). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μL , o qual continha 1 μL de RNA tratado ($200\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de cada oligonucleotídeo (5 μM), 1 μL de dNTP (10 mM), 5 μL de tampão 5X (Promega), 0,2 μL de Taq DNA polimerase (Promega) e 15,8 μL de água DEPC (água purificada (Sistema Milli-Q Millipore) e DEPC 0,1%). As condições de amplificação foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 1 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s. Depois do último ciclo houve um período de extensão final a 72°C por 10 min. A análise do produto amplificado foi realizada segundo descrito no final do item 3.2.1.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para verificar o tratamento das amostras de RNA com DNase

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
<i>ACT1 – FW</i>	CGTCTGGATTGGTGGTTCT
<i>ACT1 – RV</i>	GTGGTGAACGATAGATGGAC

3.5.3 Análise qualitativa da expressão do gene *STL1* por RT-PCR

Para preparo da primeira fita de cDNA, inicialmente adicionou-se 1 μL de oligo(dT) *primer* (Promega) a 5 μL de RNA tratado (1 μg), e incubou em Termociclador (T100™ ThermalCycler – BioRad) a 70°C por 5 min e depois a 4°C por 5 min. Para a síntese do cDNA foi preparado um mix de reação com volume final de 14 μL , que posteriormente foi

adicionado à mistura inicial de 6 µL de volume que contém o RNA (1 µg). Esse mix foi composto por 7,5 µL de água purificada (Sistema Milli-Q Millipore), 4 µL de tampão ImProm-II™ 5X (Promega), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL RNasin® (Promega) e 1 µL de Transcriptase Reversa ImProm-II™. As condições de amplificação no Termociclador (T100™ ThermalCycler – BioRad) foram as seguintes: uma etapa inicial de anelamento a 25°C por 5 min, seguida de uma etapa de extensão a 42°C por 1 h e 30 min, e uma última etapa de inativação da transcriptase reversa a 70°C por 15 min.

Para verificar a expressão qualitativa do gene *STL1* em *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105, foi utilizada a técnica de RT-PCR, utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 2 sendo que os referentes ao gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 (STL1Pa) foram desenhados com base na sequência parcial do gene obtido por sequenciamento da empresa Myleus Biotechnology, e com auxílio do programa *Primer 3 Plus*.

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL, como descrito a seguir, utilizando como molde 1 µL do cDNA (50 ng). As condições de amplificação foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 2 min, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C para *S. cerevisiae* BY4741, e 48°C para *W. anomalus* LBCM105, por 45 s, e extensão a 72°C por 1 min e 30 s. Depois do último ciclo houve uma extensão final a 72°C por 5 min. A análise do produto amplificado foi realizada segundo descrito no final do item 3.2.1.

3.5.4 Análise da expressão do gene *STL1* por PCR quantitativa (q-PCR)

Os cDNAs sintetizados de acordo com o item 3.5.3 foram submetidos às reações de PCR quantitativo em tempo real (q-PCR), realizadas no equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems) e utilizando o kit SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystems). Para cada reação de 20 µL de volume final, foram utilizados 10 µL de SYBR Green Master Mix 2X, 1 µL de ambos os oligonucleotídeos (FW/RV 10 µM), 6 µL de água DEPC e 2 µL de cDNA. A placa foi selada com filme selador para microplaca de PCR 96 poços, centrifugada e inserida no equipamento ABI 7500. A reação foi submetida às seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Os testes para a eficiência de amplificação e validação dos experimentos foram realizados como descrito por Pfaffl (2001). O cálculo da quantificação relativa foi realizado de acordo com o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001). As medições das

quantidades de mRNA do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 e *S. cerevisiae*, obtidas com tratamento de cada amostra, foram normalizadas com o valor de C_T apresentado pela amplificação do mRNA de β -actina obtido em corrida com a mesma amostra. A quantificação relativa da expressão do gene *STL1* e da β -actina foi determinada por $\Delta\Delta C_t$. Para cada amostra (em triplicata) foram determinados os valores de expressão quantitativa relativa definidos como $2^{-\Delta\Delta C_t(STL1)}$. O nível de expressão do gene alvo *STL1* foi normalizado de acordo com o gene constitutivo *ACT1* utilizando a fórmula $2^{-C_t(STL1)}/2^{-C_t(ACT1)}$. Os oligonucleotídeos utilizados no q-PCR estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos referentes ao gene *STL1* de *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105 utilizados na técnica de qPCR

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
<i>STL1 Pa – FWa</i>	ACCGCCACTATTCAGTTTG
<i>STL1 Pa – RVa</i>	TGAACCTTCCAAGTTGACCA
<i>STL1 Sc– FW</i>	CAAGGGTTGATGGCAAGTCT
<i>STL1 Sc– RV</i>	CCTGCACTACAGTTGCGTGT

3.6 Análise do transporte de $[C^{14}]$ glicerol pela proteína *Stl1*

As leveduras *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105 foram crescidas a 30°C em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de meio YP glicose 2% ou YP glicerol 2%, sob agitação a 200 rpm (*shaker* New Brunswick Model G25), até atingirem DO_{600nm} 0,8 (a partir de inoculo inicial com DO_{600nm} 0,2). Este volume foi centrifugado por 5 min a 3750 rpm (Allegra™ X-12R Centrifuge – Beckman Coulter). O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas e centrifugadas por mais duas vezes com 30 mL de água destilada gelada, por 5 min a 3750 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão Tris-citrato 100 mM (pH 5), para um volume final de 900 μ L (~30 mg.mL⁻¹). Então, 100 μ L da suspensão de células foram adicionados a 100 μ L de tampão Tris-citrato 100 mM (pH 5), e incubada a 25°C por 5 min, sob agitação com barra magnética. A análise do transporte iniciou-se com a adição de 40 μ L do $[C^{14}]$ glicerol (500 mM; ~100 dpm.nmol⁻¹). Assim, em tempos determinados (0; 5; 10; 15; 20; 30; 45 e 60 min) 10 μ L desta mistura foram coletados e imediatamente filtrados em membrana (GF-6 25mm Macherey-Nagel). A membrana foi lavada com 10 mL de água gelada e, então, introduzida em frascos contendo

líquido de cintilação (Naftaleno 10%; PPO 0,7%; POPOP 0,03%; q.s.p. 1,4-dioxano). Ao final dos 60 min, foram adicionados 12 μL do proton-ionóforo CCCP 50 μM (*carbonyl cyanidine m-chlorophenyl hydrazone* – $\text{C}_9\text{H}_5\text{ClN}_4$ - SIGMA) e 10 μL de amostra foram coletados a cada 2 min, até ao máximo de 10 min, e tratados como descrito no passo anterior. As amostras foram analisadas no cintilador (Beckman LS 6000 SC) para que a radioatividade fosse medida, conforme Lages & Lucas (1995). Para o cálculo do peso seco celular, 100 μL da suspensão de 900 μL ($\sim 30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão Tris-citrato, em triplicata, foram acondicionados em papel alumínio e incubados em estufa a 80°C por 24 h, e posteriormente, pesados em balança analítica.

4. Resultados e discussões

4.1 Caracterização do gene *STL1* putativo de *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

Diante da notável eficiência de *W. anomalus* LBCM105 em crescer em glicerol, o presente trabalho propôs isolar e caracterizar o gene do transportador de glicerol, *STL1*. Tendo em vista a limitada caracterização da biologia molecular de *W. anomalus* foi adotado como estratégia inicial o emprego da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores gerados a partir da sequência do gene *STL1* de *S. cerevisiae* BY4741. Ao se analisar o produto de PCR em gel de eletroforese foi observado a ausência da banda referente ao produto de amplificação por PCR (Figura 4A), sugerindo assim, que possivelmente a sequência do gene *STL1* é pouco conservada ou apresenta baixa identidade com a sequência de *STL1* de *S. cerevisiae*. Portanto, com base nas possíveis sequências de aminoácidos da proteína Stl1 de outras espécies de leveduras, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores degenerados para *W. anomalus* LBCM105 e uma nova reação de PCR foi realizada. Neste ensaio foi possível observar, a partir do gel de eletroforese, a presença de uma banda de amplificação de tamanho aproximado de 1300 pb (Figura 4). Tamanhos similares a esse produto de amplificação, referente ao gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105, foram observados previamente nas leveduras *S. cerevisiae*, *M. farinosa*, *C. albicans* e *S. stipitis*, 1710 pb, 1767 pb, 1641 pb e 1587 pb, respectivamente. Cujas sequências de aminoácidos das respectivas proteínas foram utilizadas como base para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores degenerados.

Com o intuito de confirmar a identidade da sequência obtida referente à *W. anomalus* LBCM105, o respectivo produto da PCR foi isolado e após purificação foi enviado para sequenciamento na empresa Myleus Biotechnology. Desta análise, foi obtida uma sequência parcial de 500 pb a qual foi submetida a análises utilizando a ferramenta BLASTN do NCBI. Homologias com sequências codificadoras de transportadores de açúcares em leveduras foram confirmadas, apresentando assim uma identidade de 87% com a sequência de *W. ciferrii* (nº de acesso: XM_011276561.1), 78% com a sequência de *C. dubliniensis* CD36 (nº de acesso: XM_002421097.1) e 78% com a sequência de *C. tenuis* ATCC 10573 (nº de acesso: XM_006687357.1). Em uma análise secundária da mesma sequência parcial do gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105, utilizando o *software* BioEdit, foi evidenciado uma identidade de 75% quando alinhada à sequência de *STL1* de *S. cerevisiae* (Figura 5).

Após confirmação da identidade da sequência obtida como correspondente ao gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105, a sequência parcial do gene *STL1* putativo (500 pb) foi utilizada como referência, para uma busca realizada no banco de dados do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) o qual possui, até o presente momento, o genoma parcial de *W. anomalus* LBCM105. Desta forma, foi possível analisar a sequência do gene *STL1* putativo a partir do genoma parcial de *W. anomalus* LBCM105 e esta apresentou 1443 pb e 480 aminoácidos (Figura 6). A sequência gênica *STL1* de *W. anomalus* foi depositada no GenBank, sob o número de acesso KP856970.

Em *S. cerevisiae* S288C o gene *STL1* apresenta 1710 pb, e o mesmo gene das outras leveduras, *W. ciferrii*, *C. dubliniensis* e *C. tenuis*, cujas similaridades entre a sequência de *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 foram mencionadas anteriormente, apresentam respectivamente, 1671 pb, 1641 pb e 1656 pb.

```

*
1 atggggttttgattggaaatcaagaacaaacacttcagggttaagt
  M G F D W K S R T N T S G L S
46 ggtagagccctcagagtctcagtcacattaactgccacattaggt
  G R A L R V S V T L T A T L G
91 ttctcattatfcggttatgatcaaggtttaatgtctggtttaatt
  F S L F G Y D Q G L M S G L I
136 actgggtcatgaatttaactatgaattcccagctactaaaggtaac
  T G H E F N Y E F P A T K G N
181 tctgttaaccaaggtgctgttacagcttggtatgaaattgggtgt
  S V N Q G A V T A C Y E I G C
226 ttctttgggtgctttatggccatgttttagaggtgaaagaattggt
  F F G A L F A M F R G E R I G
271 agaagaccattaatcatcttgggtgcttttattattatcattggt
  R R P L I I L G A F I I I I G
316 actttaatctcagtcactgcttatagagatgattgggggtactggt
  T L I S V T A Y R D D W G T G
361 caatttggtggttagagttattacaggtattggtaacgggata
  Q F V V G R V I T G I G N G I
406 aataccgccactattccagtttggcaatcagaaatgtctaaacca
  N T A T I P V W Q S E M S K P
451 gaaaaaagaggtatgttgggtcaacttgaagggttcagttggtgcc
  E K R G M L V N L E G S V V A
496 attgggtacttttgcgcttactgggttgattttggtatgtcttat
  I G T F V A Y W V D F G M S Y
541 gttacaattcttctcaatggagattcccagttgcattccaaatt
  V N N S S Q W R F P V A F Q I
586 ttctttgccttcttggttatgttgggtgccttacaattgccagaa
  F F A F F V M I G A L Q L P E
631 tctccaagatgggtattatcaaaaggtagaagagaagaagctggt
  S P R W L L S K G R R E E A V
676 ttcgttcttgctgctttaaatacagttccaattgatgatgaagggt
  F V L A A L N D V P I D D E G
721 gttgatgaagaagccactgctattcaagatgctgttgaaaaaggt
  V D E E A T A I Q D A V E K V
766 tctaaaaaacaattagttatcaaaaggttttctactgggtggtaaa
  S K K Q I S I K E V F T G G K
811 actcaacattttagaagaatgttggattggttcttcaactcaattt
  T Q H F R R M L I G S S T Q F
856 ttccaacaatttactgggttgaatgctgctatttattattcaact
  F Q Q F T G C N A A I Y Y S T
901 gttttatttgaacaaactattgggtttaaactggtaaattaccattg
  V L F E Q T I G L T G K L P L
946 atttttaggtggtgtttttgcaaccatttatgctttatccactatt
  I L G G V F A T I Y A L S T I
991 ccatcattcttttaattgaaaaattgggtagaagaacttggttt
  P S F F L I E K L G R R N L F
1036 ttgattgggtgctactgggtcaagggttgcattcattattactttt
  L I G A T G Q G C S F I I T F
1081 ggctgttttagttaaagatactactcaaaatgctaaagggtgctgct
  G C L V K D T T Q N A K G A A
1126 gttggtttattctgtttattggttttctttgcattcactatttta
  V G L F L F I V F F A F T I L
1171 ccattaccatgggtttatccaccagaaatcaatccattaagaaca
  P L P W V Y P P E I N P L R T
1216 agaactgttgccctcagctatttcaacatgtaccaattgggttaaca
  R T V A S A I S T C T N W L T
1261 aatttcgctggttggatgtttactccagttttcatccaaaacgac
  N F A V V M F T P V F I Q N D
1306 ggtttcgatgataaagcctctgcttcaattcctgatgctgaaaaa
  G F D D K A S A S I P D A E K
1351 gaaggtacttcaggtactgataccccagattctcaagaaataac
  E G T S G T D T P D S Q E N N
1396 aacaaccacagtggttattttgttaaaaaagggtgatgataatggt
  N N H S G L F V K K G D D N V
1441 taa 1443
*

```

Figura 6. Sequência do gene *STL1* putativo de *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105. A sequência deduzida de aminoácidos é mostrada abaixo dos respectivos códons. Asteriscos (*) representam os códons de iniciação e término da tradução.

4.2 Análise filogenética baseada na sequência do gene *STL1*

Com o intuito de investigar a relação filogenética entre o transportador putativo de glicerol *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 e o seus homólogos em outras leveduras, múltiplos alinhamentos foram realizados utilizando sequências de aminoácidos, disponíveis no *GenBank*. Para essa análise foram utilizadas as espécies *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Z. rouxii*, *Y. lipolytica*, *W. ciferrii*, *W. anomalus*, *C. albicans*, *C. dublinienses*, *P. sorbitophila* (*M. farinosa*), *D. hansenii* e *C. tenuis*. A árvore filogenética construída está representada na Figura 7.

Tendo em vista a árvore filogenética construída, foi possível estimar a distância evolutiva entre as espécies. Sendo assim, observou-se uma menor distância evolutiva entre as sequências correspondentes ao transportador putativo de glicerol de *W. anomalus* LBCM105 e o correspondente em *W. ciferrii*. Compreendeu-se também que essas leveduras estão inseridas em um mesmo clado em que estão presentes *C. albicans* e *C. dublinienses*, indicando, possivelmente, uma similaridade considerável em relação ao transportador. Por outro lado, é demonstrado uma distância notável entre *S. cerevisiae* e *W. anomalus* LBCM105, indicando uma evolução divergente do entre as duas espécies.

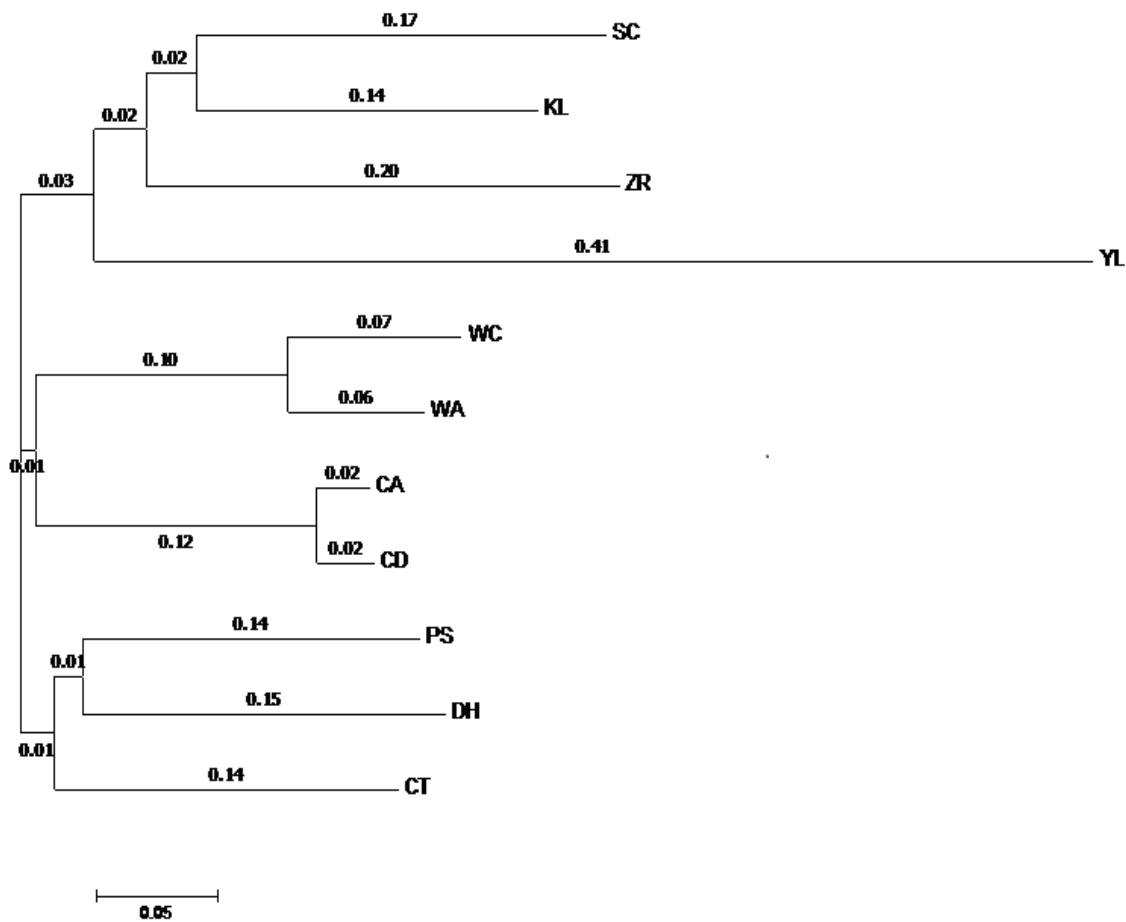


Figura 7. Distância filogenética de proteínas Stl1 de diferentes leveduras. Árvore filogenética não enraizada baseada no alinhamento de sequências de proteínas Stl1 preditas. Os alinhamentos foram realizados utilizando-se o programa CLUSTALW2. SC, *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010825.3); KL, *Kluyveromyces lactis* (CAG98957.1); ZR, *Zygosaccharomyces rouxii* (CAR30744.1); YL, *Yarrowia lipolytica* (XP_502271.1); WC, *Wickerhamomyces ciferrii* (XP_011274863.1); WA, *Wickerhamomyces anomalus* (KP856970); CA, *Candida albicans* (EEQ46634); CD, *Candida dubliniensis* (CAX41301.1); PS, *Pichia sorbitophila* (*Millerozyma farinosa*) (PISO0A00352g); DH, *Debaryomyces hansenii* (XP_459387.2); CT, *Candida tenuis* (XP_006687420.1). As sequências foram obtidas no banco de dados do GenBank.

4.3 Análise *in silico* do promotor do gene *STL1* putativo em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

Com o intuito de detectar diferenças regulatórias em *W. anomalus* LBCM105 e *S. cerevisiae* S288C as sequências de 1000 pb *upstream* dos genes *STL1* de ambas as cepas foram analisadas e os fatores de transcrição relacionados foram comparados. Os fatores de transcrição putativos envolvidos na regulação da expressão de *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 se encontram descritos na Tabela 5.

A partir das análises da sequência de 1000 pb *upstream* do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105, região promotora putativa, associou-se 28 distintos fatores de transcrição (Tabela 5 e anexo I). Dentre os fatores de transcrição diretamente relacionados ao metabolismo de carbono apenas Adr1p e Hsf1p foram, até então, confirmados em *S. cerevisiae* S288C. Sendo o primeiro fator reconhecido como ativador de expressão, e o segundo inibidor de expressão. Adr1p é um fator de transcrição requerido para a transcrição do gene *ADH2* enquanto Hsf1p é fator de transcrição envolvido na diauxia e na resposta de distintos estresses (<http://www.yeasttract.com/>).

Embora um amplo grupo de fatores de transcrição tenham sido relacionados ao promotor putativo do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 alguns fatores de transcrição descritos na regulação da expressão do gene *STL1* em *S. cerevisiae* S288C (anexo II) não foram associados ao promotor em análise. Como exemplo, Hedges e colaboradores (1995) demonstraram que Cat8p é um fator de transcrição que regula um subconjunto de genes quando a célula é crescida em fonte de carbono não fermentável. Sendo que *STL1* é induzido durante a etapa diáuxica de maneira Cat8p-dependente. Em acordo a isso, a atividade do transportador de glicerol em *S. cerevisiae* foi caracterizada por sofrer repressão em presença de glicose e induzido por fontes não-fermentáveis de carbono (Lages & Lucas, 1997). No entanto, em um primeiro momento, Cat8p não foi associado à sequência promotora putativa do *STL1* de *W. anomalus* LBCM105. Porém, quando a substituição de 1 base na sequência de reconhecimento em Cat8p foi considerada, potenciais sítios foram identificados.

Assim, a partir da análise *in silico* dos fatores de transcrição putativos de *STL1* de *W. anomalus* foi possível observar uma distinção notável em relação ao promotor do gene *STL1* de *S. cerevisiae* S288C (anexo III). Diante destes resultados, suscita-se a necessidade de estudos mais detalhados da região reguladora do gene *STL1*, com o intuito de esclarecer se tais diferenças entre essas espécies podem estar relacionadas com a eficiência de captação de glicerol por *W. anomalus* LBCM105.

Tabela 5. Fatores de transcrição putativos correspondentes à região promotora (1000 pb *upstream*) do gene *STL1* putativo em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

Sequências alvos: 1000 pb <i>upstream</i> do gene <i>STL1</i> de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105			
Fatores de transcrição putativos	Sequência consenso	Posição	Fita
Ace2p, Swi5p	ACCAGC	-474	F
Adr1p	TTGGRG	-841	R
Ash1p	YTGAT	-944	F
Ash1p	YTGAT	-872	F
Ash1p	YTGAT	-741	F
Ash1p	YTGAT	-720	F
Ash1p	YTGAT	-625	F
Ash1p	YTGAT	-10	R
Ash1p	YTGAT	-125	R
Ash1p	YTGAT	-579	R
Ash1p	YTGAT	-905	R
Azf1p	AAGAAAAA	-338	R
Azf1p	AAAAGAAA	-420	F
Azf1p	AAAAGAAA	-406	F
Cup2p	HTHNNGCTGD	-904	F
Cup2p	HTHNNGCTGD	-401	R
Cup2p	HTHNNGCTGD	-682	R
Cup2p	TCTTTTGCTG	-400	R
Fkh1p, Fkh2p	RTAAAYAA	-199	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-91	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-199	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-665	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-736	R
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-867	R
Gcn4p	TGATTCA	-719	F
Gcn4p	TGACTGA	-357	R
Gcr1p	CWTCC	-267	R
Hac1p	CAGCGTG	-691	F
Hac1p	CCAGC	-692	F
Hac1p	CCAGC	-473	F
Hac1p	CCAGC	-440	R
Hac1p	CCAGC	-598	R
Hap2p, Hap3p, Hap4p, Hap5p	TNATTGGT	-727	F
Hsf1p	NGAANNTTCN	-166	F
Hsf1p	NGAANNTTCN	-156	R
Mcm1p	DCCYWWNNRG	-122	F

Sequências alvos: 1000 pb <i>upstream</i> do gene <i>STL1</i> de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105			
Fatores de transcrição putativos	Sequência consenso	Posição	Fita
Mcm1p	CCYWWWNNRG	-121	F
Mot3p	CAGGYA	-662	F
Mot3p	AAGAGG	-794	R
Mot3p	ATGGAT	-908	R
Mot3p	TMGGAA	-31	R
Mot3p	TMGGAA	-117	R
Mot3p	AAGGWT	-700	F
Mot3p	AAGGWT	-901	R
Rgt1p	CGGANNA	-218	F
Rgt1p	CGGANNA	-228	R
Rgt1p	CGGANNA	-272	R
Rtg1p, Rtg3p	GGTAC	-660	F
Rtg1p, Rtg3p	GGTAC	-654	R
Skn7p	GGCYGGC	-446	F
Skn7p	GGCTGGC	-446	F
Skolp	TGACGTTT	-561	F
Stb5p	CGGNS	-230	F
Stb5p	CGGNS	-216	R
Stb5p	CGGNS	-228	R
Stb5p	CGGNS	-248	R
Stb5p	CGGNS	-262	R
Stb5p	CGGNS	-587	R
Ste12p	GGAAACA	-600	F
Stp2p	CNCACCNG	-393	F
Stp2p	CNCACCNG	-223	F
Tec1p	CATTCT	-888	F
Yap1p	TKACAAA	-58	R
Gsm1p	CGGNNNNNNNNCGG	-230	F
Gsm1p	CGGNNNNNNNNCGG	-216	R

4.4 Expressão qualitativa do gene *STL1* putativo em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

Tendo em vista os resultados que demonstraram uma melhor performance de crescimento em glicerol de *W. anomalus* LBCM105 quando comparado à *S. cerevisiae* (Conceição *et al.*, 2015), a expressão qualitativa do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 e de *S. cerevisiae* BY4741 foi avaliada cultivando-se as cepas em meio contendo glicose ou glicerol. O gene *STL1* em *W. anomalus* LBCM105 foi expresso em ambas as condições avaliadas, em meios contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono. Distintamente, a cepa *S. cerevisiae* BY4741 não apresentou expressão nas condições avaliadas (Figura 8).

A ausência de bandas de amplificação de *S. cerevisiae* BY4741 quando cultivada em glicose e glicerol pode indicar possíveis diferenças regulatórias entre as cepas avaliadas no presente estudo. Ademais, dados da literatura referentes ao *background* *S. cerevisiae* W303, apontam que a expressão de *STL1* pode ser induzida por fontes de carbono não fermentáveis e reprimida em presença de glicose (Lages & Lucas, 1997; Ferreira *et al.*, 2005), reforçando assim, a presença de possíveis distinções regulatórias entre diferentes *background* de *S. cerevisiae*. Por outro lado, *W. anomalus* LBCM105 foi capaz de expressar o gene *STL1* em ambas condições de indução, sugerindo uma ausência de repressão em presença de fonte de carbono fermentável. No entanto, deve se ressaltar que as concentrações das fontes de carbono necessárias para induzir ou reprimir determinadas expressões de genes podem variar entre cepas e condições de cultivo.

4.5 Quantificação da expressão relativa do gene *STL1* putativo em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105 e *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo glicose ou glicerol.

Para complementar a análise da expressão qualitativa do gene *STL1* em *W. anomalus* LBCM105 e *S. cerevisiae*, foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR). A amplificação do gene foi obtida usando como *template* o cDNA oriundo do RNA do cultivo de ambas as leveduras crescidas em meio YP contendo glicose 2% ou glicerol 2%. Então, foram realizados cálculos para se determinar o valor da relação da expressão do gene *STL1* em glicose pela expressão do mesmo em glicerol. Deste modo, os valores da expressão gênica em glicose foram padronizados para 1. Assim, valores de relações entre a expressão

do gene em glicose e glicerol maior que 1 indica que o gene foi mais expresso em meio contendo glicerol do que com glicose.

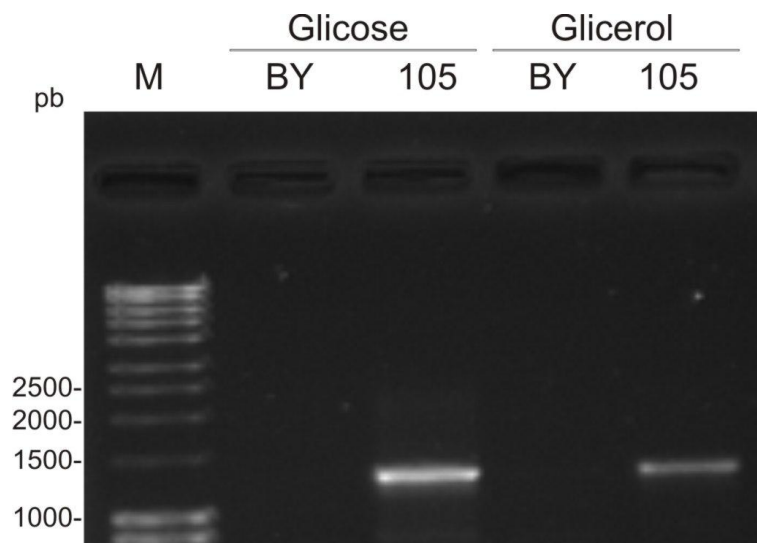


Figura 8. Expressão qualitativa do gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105 em condições de cultivo contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono. Produtos de amplificação do gene *STL1* de *S. cerevisiae* (BY) e *W. anomalus* LBCM105 (105). M – Marcador de peso molecular de 10 Kb - MassRuler DNA Ladder Mix – ThermoScientific.

O gene *STL1* putativo em *W. anomalus* LBCM105 apresentou uma expressão relativa de aproximadamente 23,76 vezes maior em glicerol em relação à condição de meio contendo glicose (Figura 9). Já em *S. cerevisiae* o gene *STL1* apresentou uma expressão relativa de aproximadamente 4,50 vezes maior em glicerol em relação à condição de meio contendo glicose (Figura 9). Assim, estes resultados sugerem que o gene *STL1* tanto em *W. anomalus* LBCM105 como em *S. cerevisiae* está sendo mais expresso em condição de presença de glicerol no meio.

Em trabalhos prévios, baseados em análises do transcriptoma por microarranjo, foi demonstrado que a transcrição do gene *STL1* em *S. cerevisiae* BY4741 é distintamente regulado, sendo induzida na presença de glicerol e reprimida na presença de glicose (Roberts & Hudson, 2006; Roberts Iii & Hudson, 2009). Entretanto, esse efeito não é regra para todas as leveduras, em *C. albicans* foi demonstrado que a captação de glicerol não foi afetada pela fonte de carbono no meio e nem por estresse osmótico, o mesmo foi observado em *D. hansenii* (Lucas *et al.*, 1990; Kayingo *et al.*, 2009). Em acordo a esses experimentos, Liu e colaboradores (2013) também mostraram que o gene que codifica o transportador de glicerol em *Pachysolen tannophilus* (*PtSTL1*) é constitutivamente expresso, não havendo interferência pela presença de glicose ou glicerol, segundo análises de expressão por qPCR.

Embora, os resultados obtidos neste trabalho quanto à expressão quantitativa de *STL1* induzido por glicerol em *W. anomalus* LBCM105 e *S. cerevisiae* BY4741 não permitam uma análise comparativa entre as duas espécies, sugerindoporém, que possivelmente *STL1* em *W. anomalus* LBCM105 seja mais expresso em glicerol, em relação à glicose, proporcionando uma maior eficiência de captação de glicerol.

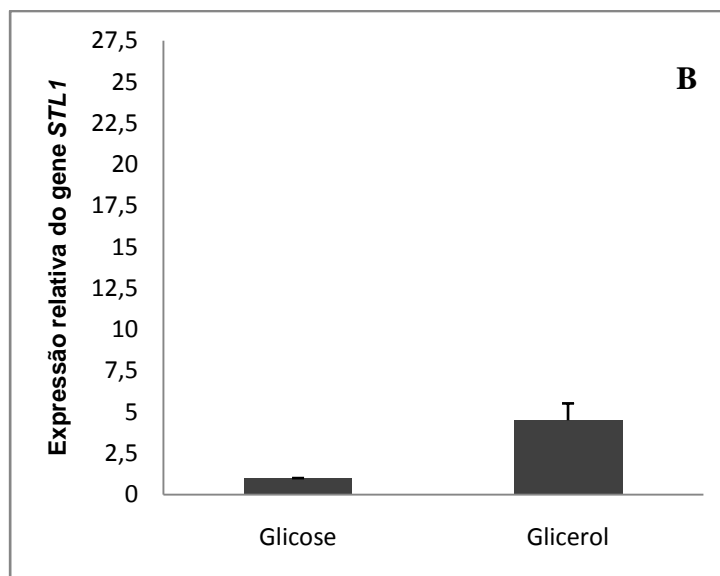
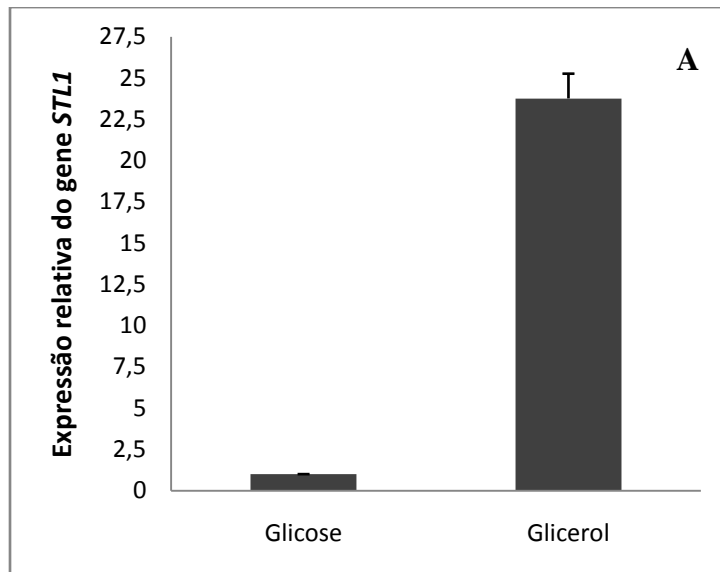


Figura 9. Expressão relativa do gene *STL1* putativo em *W. anomalus* LBCM105 (A) e *S. cerevisiae* (B), em glicose ou glicerol. A quantificação foi realizada pelo método de qPCR. Os valores resultantes são a média aritmética de quatro replicatas biológicas e seus desvios padrões. Foi utilizado como gene normalizador o gene *ACT1*.

4.6 Transporte de glicerol em *Wickerhamomyces anomalus* LBCM105

Com o intuito de caracterizar funcionalmente o gene *STL1*, como codificador do transportador de glicerol em *W. anomalus*, foi realizado um ensaio de transporte de glicerol em *W. anomalus* LBCM105 e em *S. cerevisiae* BY4741, como descrito por Lages & Lucas (1995). Neste ensaio, a atividade do transportador de glicerol (Stl1p) foi avaliada através da mensuração da concentração de interna e externa do glicerol marcado ($[C^{14}]$ glicerol) através da leitura da radioatividade em cintilador.

Assim, quando *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105 foram cultivadas em glicose as razões interna/externa de $[C^{14}]$ glicerol atingiram valores máximos de 0,86 e 2,01, respectivamente (Figura 10). Por outro lado, quando *S. cerevisiae* BY4741 e *W. anomalus* LBCM105 foram cultivadas em meio contendo glicerol, as razões interna/externa de $[C^{14}]$ glicerol atingiram valores máximos de 1,50 e 16,06, respectivamente (Figura 10). Os resultados demonstraram que em *W. anomalus* LBCM105 cultivada em glicerol e glicose, e *S. cerevisiae* BY4741 crescida em meio contendo glicerol, a razão interna/externa de $[C^{14}]$ glicerol, ultrapassou o equilíbrio, o que caracteriza, possivelmente, um transporte ativo. Com base nessas evidências, pode-se sugerir que em *W. anomalus* o sistema simporte de prótons para o transporte de glicerol seja mais eficiente e/ou que este transportador tenha uma maior afinidade pelo substrato, quando comparado à *S. cerevisiae* BY4741

Sabe-se que em *S. cerevisiae* a assimilação do glicerol pode ocorrer por dois mecanismos distintos, de acordo com o meio de crescimento. Sendo o transporte do glicerol por difusão facilitada adotado em presença de glicose. E, um sistema simporte de prótons, codificado pelo gene *STL1*, é utilizado para a captação de glicerol quando fontes não fermentáveis de carbono, como o glicerol, estão presentes (Lages & Lucas, 1997; Tamás *et al.*, 1999). Isto pode ser observado em *S. cerevisiae* BY4741, em que os resultados indicam a presença do transporte ativo induzido por glicerol. Dados da literatura constata a inativação da proteína Stl1 no *background* *S. cerevisiae* W303, quando crescida em glicose, e consequentemente, inibição do transporte do glicerol (Ferreira *et al.*, 2005). Contudo, observou-se que em condições em que a captação do glicerol demonstre ser um mecanismo vantajoso para a célula, a inibição do transporte por glicose pode ser superada sob várias condições como, por exemplo, em situação de estresse osmótico (Lages & Lucas, 1997; Ferreira *et al.*, 2005), altas temperaturas (Ferreira & Lucas, 2007) ou durante adaptação em baixas temperaturas (Tulha *et al.*, 2010). Estudos prévios demonstraram que em outras espécies de leveduras, mais halotolerantes que *S. cerevisiae*, como *P. sorbitophila* (Lages &

Lucas, 1995), *Z. rouxii* (van Zyl *et al.*, 1990) ou *D. hansenii* (Lucas *et al.*, 1990), o glicerol é preferencialmente transportado ativamente, estabelecendo e mantendo um gradiente de glicerol em condições de alta concentração salina. Distintamente, em *W. anomalus* LBCM105 notou-se uma possível predominância do transporte ativo tanto em presença de glicerol como de glicose.

No entanto, nenhuma proteína envolvida no transporte de glicerol em *W. anomalus* foi estudada ou identificada, e descrita na literatura. Este trabalho sugere que o produto codificado pelo gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 esteja envolvido no transporte ativo de glicerol. Sendo que, o sequenciamento completo do genoma de *W. anomalus*, bem como o desenvolvimento de ferramentas moleculares para a manipulação de seus genes, representam uma necessidade urgente para dar continuidade com os estudos de transporte de glicerol nesta levedura.

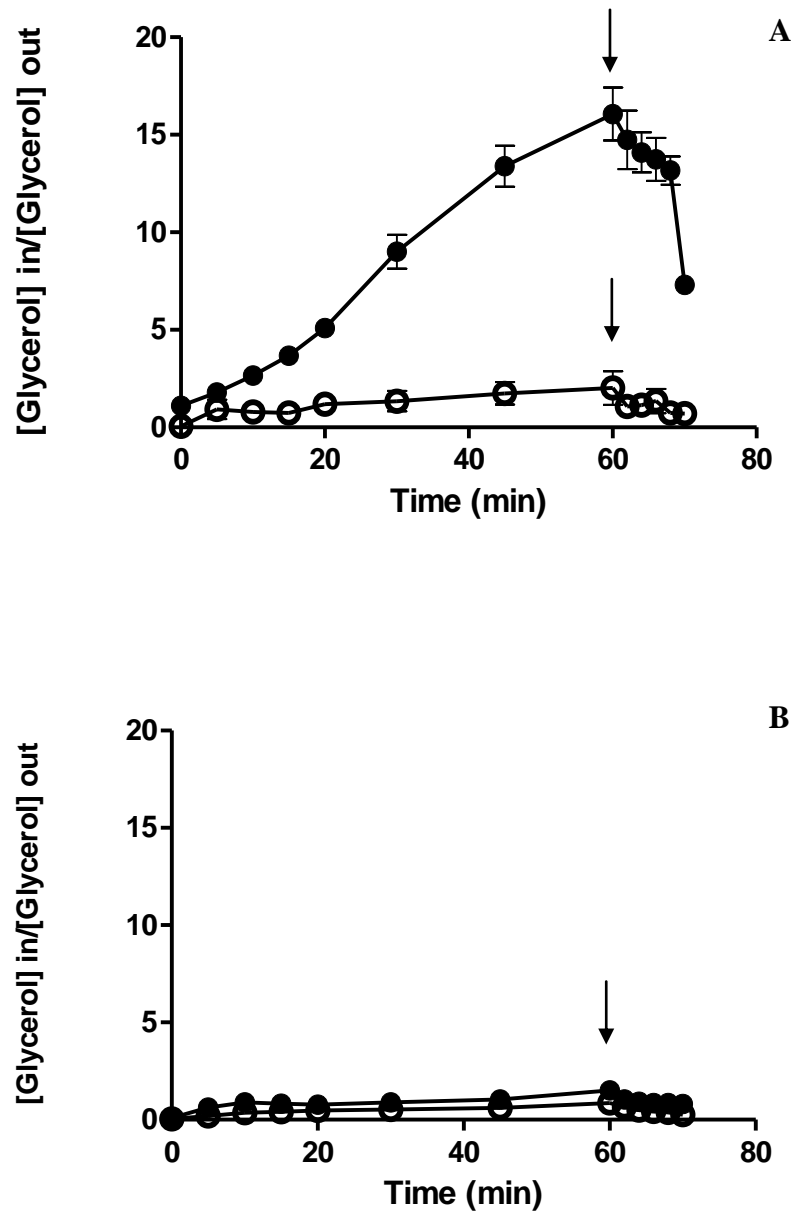


Figura 10. Transporte ativo de glicerol pelo transportador St11 de *W. anomalus* LBCM105 (A) e *S. cerevisiae* (B). Acúmulo de glicerol marcado ($[C^{14}]$ glicerol) em células de *W. anomalus* LBCM105 (A) e *S. cerevisiae* (B) crescidas em meio YP contendo glicerol 2% (●) ou glicose 2% (○). Após o crescimento, as células de *W. anomalus* LBCM105 e *S. cerevisiae* foram ressuspensas em tampão Tris-citrato (100 mM) e posteriormente à adição do glicerol marcado, alíquotas de 10 μ L foram coletadas ao longo do tempo. Seta indica o ponto em que foi adicionado o próton-ionóforo CCCP (50 μ M) na suspensão de células.

5. Conclusões

- O gene *STL1*, que codifica um transportador ativo de glicerol, de *W. anomalus* LBCM105 apresenta uma região codificadora de 1443 pb;
- As proteínas Stl1 deduzidas com base na sequência nucleotídica de *W. anomalus* LBCM105 e *W. ciferrii* apresentam uma menor distância evolutiva, e uma similaridade considerável com Stl1p de leveduras *C. albicans* e *C. dublinienses*, porém uma distância notável de *S. cerevisiae*;
- Os fatores de transcrição putativos encontrados na região reguladora (promotor) putativa do gene *STL1* de *W. anomalus* LBCM105 e de *S. cerevisiae* S288C apresentam uma acentuada distinção entre os fatores de transcrição putativos associados ao metabolismo de carbono, sugerindo que a regulação de ambos os promotores seja diferenciada;
- A expressão relativa do gene *STL1* em *W. anomalus* LBCM105 aumentou em condições contendo glicerol, quando comparada à condição contendo glicose, demonstrando que a expressão do gene é induzida por glicerol. Foi evidenciado ainda, que ocorre transporte ativo de glicerol pelo transportador de glicerol (Stl1p), quando *W. anomalus* LBCM105 é cultivada em glicerol ou glicose. Estes resultados implicam que Stl1p está sendo induzida na espécie *W. anomalus* em presença de glicerol;
- Este é o primeiro trabalho que relata o gene *STL1* como codificador de um transportador ativo de glicerol em *W. anomalus*.

6. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos, propõe-se que seja analisado o crescimento e o transporte de glicerol em *W. anomalus* LBCM105, cultivada em meio contendo algumas das variáveis presentes no glicerol bruto, como presença de sal e álcool. Sugere-se também que seja verificada a complementação de fenótipo em *S. cerevisiae* $\Delta stl1$ utilizando o gene *STL1* putativo de *W. anomalus* LBCM105. Em que a atividade do transportador codificado por esse gene caracterizou um transporte ativo. Desta forma, será possível avaliar a capacidade de crescimento em diferentes concentrações de glicerol, e também a eficiência do transporte de glicerol na cepa modificada, contribuindo para o desenvolvimento de uma cepa com amplo potencial biotecnológico, como para produção de bioetanol.

7. Referências bibliográficas

- ANAND, P.; SAXENA, R. K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New Biotechnol**, v. 00, p. 1 - 7, 2011.
- BELL, S. P.; DUTTA, A. DNA replication in eukaryotic cells. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 333-374, 2002.
- BRISSON, D.; VOHL, M. C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 23, n. 6, p. 534-42, Jun 2001.
- DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R.; SARAIVA, M. A. F.; DINIZ, R. H. S.; OLIVEIRA, J.; BARBOSA, G. D.; ALVAREZ, F.; DA MATA CORREA, L. F.; MEZADRI, H.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F.; LUCAS, C.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 237-246, 2015/02/01 2015.
- DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.
- DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 1966.
- DE HOOG, G. S. Risk assessment of fungi reported from humans and animals **Mycoses**, v. 39, p. 407-417, 1996.
- FAN, X.; BURTON, R.; ZHOU, Y. Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals—mini review. **Open Fuels Energy Sci J**, v. 3, p. 17-22, 2010.
- FERREIRA, C.; LUCAS, C. Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene *STL1* is overcome by high temperature. **FEBS letters**, v. 581, n. 9, p. 1923-7, May 1 2007.
- FERREIRA, C.; VAN VOORST, F.; MARTINS, A.; NEVES, L.; OLIVEIRA, R.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; LUCAS, C.; BRANDT, A. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 4, p. 2068-76, Apr 2005.
- FREDLUND, E.; BLANK, L. M.; SCHNURER, J.; SAUER, U.; PASSOTH, V. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5905-11, Oct 2004.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K. J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 395-402, Aug 2002.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C. D.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. D. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel from soybean oil: experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

HAURIE, V.; PERROT, M.; MINI, T.; JENÖ, P.; SAGLIOCCO, F.; BOUCHERIE, H. The Transcriptional Activator Cat8p Provides a Major Contribution to the Reprogramming of Carbon Metabolism during the Diauxic Shift in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 76-85, 2001.

HEDGES, D.; PROFT, M.; ENTIAN, K.-D. CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 4, p. 1915-1922, 1995.

HOLST, B.; LUNDE, C.; LAGES, F.; OLIVEIRA, R.; LUCAS, C.; KIELLAND-BRANDT, M. C. GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 108-124, 2000.

JIJAKLI, M. H. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 93-105, 2011.

KAYINGO, G.; MARTINS, A.; ANDRIE, R.; NEVES, L.; LUCAS, C.; WONG, B. A permease encoded by STL1 is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1547-1557, 2009.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th: Elsevier, 1998. ISBN 0080931278.

KURTZMAN, C. P. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 3, p. 209-217, 1984.

KURTZMAN, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 13-23, 2011.

LAGES, F.; LUCAS, C. Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. **Yeast**, v. 11, n. 2, p. 111-119, 1995.

LAGES, F.; LUCAS, C. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1322, n. 1, p. 8-18, 1997.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v. 145, n. 9, p. 2577-2585, 1999.

- LIU, X.; MORTENSEN, U. H.; WORKMAN, M. Expression and functional studies of genes involved in transport and metabolism of glycerol in *Pachysolen tannophilus*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 27, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 12// 2001.
- LUCAS, C.; DA COSTA, M.; VAN UDEN, N. Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Yeast**, v. 6, n. 3, p. 187-191, 1990.
- MERICO, A.; RAGNI, E.; GALAFASSI, S.; POPOLO, L.; COMPAGNO, C. Generation of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain with a high freeze tolerance and an improved ability to grow on glycerol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1037-1044, 2011.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. T. **Taxonomy and genetics of the yeast *Pichia/Hansenula anomala***. Presentation at the 1st *P. anomala* mini-symposium 2010.
- NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 231-241, 1997.
- OLSTORPE, M.; PASSOTH, V. *Pichia anomala* in grain biopreservation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 57-62, 2011.
- OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; YUNUS, W. M. Z. W. Glycerol residue-A rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v. 53, n. 1, p. 29-33, 2004.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.
- PASSOTH, V.; ERIKSSON, A.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; PIENS, K.; SCHNÜRER, J. Airtight storage of moist wheat grain improves bioethanol yields. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 16, 2009.
- PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. Ä.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006.
- PASSOTH, V.; OLSTORPE, M.; SCHNÜRER, J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 121-125, 2011.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1, 2001.

POLONELLI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; CONTI, S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 35-41, 2011.

REP, M.; KRANTZ, M.; THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8290-8300, 2000.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; DA SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel-Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Bio Tecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2008.

ROBERTS, G. G.; HUDSON, A. P. Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 276, n. 2, p. 170-186, 2006.

ROBERTS III, G. G.; HUDSON, A. P. Rsf1p is required for an efficient metabolic shift from fermentative to glycerol-based respiratory growth in *S. cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, n. 2, p. 95-110, 2009.

RODRIGUEZ, J.; PEREZ, J. A.; RUIZ, T.; RODRIGUEZ, L. Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. **Biochem. J**, v. 306, p. 235-239, 1995.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Springer, 2009. ISBN 1402082916.

SCHNEIDER, J.; RUPP, O.; TROST, E.; JAENICKE, S.; PASSOTH, V.; GOESMANN, A.; TAUCH, A.; BRINKROLF, K. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 3, p. 382-386, 2012.

SCHNEITER, R. **Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast**. Fribourg: Université di Fribourg Suisse: 2004.

SCHNÜRER, J.; JONSSON, A. *Pichia anomala* J121: a 30-year overnight near success biopreservation story. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 5-12, 2011.

SYDOW, H.; SYDOW, P. *Mykologische Mitteilungen*. **Annales Mycologici**, v. 17, p. 33-47, 1919.

TAMÁS, M. J.; HOHMANN, S. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: (Ed.). **Yeast Stress Responses**: Springer, 2003. p.121-200. ISBN 3540439269.

TULHA, J.; LIMA, A.; LUCAS, C.; FERREIRA, C. *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 82, 2010.

VAN ZYL, P. J.; KILIAN, S. G.; PRIOR, B. A. The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 231-235, 1990.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25-34, 2011.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 13, p. 1-10, 2012.

ZHAO, S.; DOUGLAS, N. W.; HEINE, M. J.; WILLIAMS, G. M.; WINTHER-LARSEN, H. C.; MEADEN, P. G. The STL1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is predicted to encode a sugar transporter-like protein. **Gene**, v. 146, n. 2, p. 215-9, Sep 2 1994.

Anexo I

Relação dos fatores de transcrição putativos

	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> LBCM105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C
1	Ace2p	Adr1p
2	Adr1p	Ash1p
3	Ash1p	Bas1p
4	Azf1p	Fkh1p
5	Cup2p	Fkh2p
6	Fkh1p	Gcn4p
7	Fkh2p	Gcr1p
8	Gcn4p	Gis1p
9	Gcr1p	Gln3p
10	Gsm1p	Hac1p
11	Hac1p	Mcm1p
12	Hap2p	Mot3p
13	Hap3p	Msn2p
14	Hap4p	Msn4p
15	Hap5p	Nrg1p
16	Hsf1p	Rgt1p
17	Mcm1p	Rim101p
18	Mot3p	Rph1p
19	Rgt1p	Rtg1p
20	Rtg3p	Rtg3p
21	Skn7p	Stb5p
22	Sko1p	Ste12p
23	Stb5p	Stp1p
24	Ste12p	Stp2p
25	Stp2p	Tec1p
26	Swi5p	Xbp1p
27	Tec1p	Yap1p
28	Yap1p	Yap3p
29		YER130C
30		Yrr1p

Anexo II

Fatores de transcrição documentados em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C		Evidências
1	Abf1p	IE
2	Ace2p	AE
3	Adr1p	AE
4	Aft1p	DNA, IE
5	Ash1p	AE
6	Bas1p	AE, IE
7	Cac2p	AE
8	Cat8p	AE
9	Cin5p	DNA, AE
10	Cup2p	IE
11	Gcn4p	IE
12	Gis1p	AE
13	Gzf3p	AE
14	Hap1p	AE
15	Hcm1p	AE
16	Hot1p	DNA, AE
17	Hpa2p	AE
18	Hsf1p	IE
19	Hst4p	AE
20	Mbp1p	AE
21	Met31p	AE
22	Mig3p	AE
23	Msn2p	DNA, AE, IE
24	Msn4p	DNA, AE, IE
25	Nrg1p	DNA
26	Oaf1p	IE
27	Otu1p	AE
28	Pip2p	IE
29	Rgm1p	AE
30	Rlm1p	AE
31	Rox1p	AE
32	Rpn4p	AE
33	Sfp1p	AE, IE
34	Skn7p	DNA
35	Sko1p	DNA
36	Smp1p	AE
37	Spt20p	IE
38	Ste12p	IE
39	Stp2p	AE
40	Sut1p	IE
41	Swi5p	IE
42	Tec1p	IE
43	Xbp1p	AE
44	Yap1p	AE, IE
45	Yap6p	DNA
46	Yox1p	DNA, AE
47	Yrm1p	DNA
48	Yrr1p	AE

DNA - evidência de ligação ao DNA; AE - ativador de expressão; IE - inibidor de expressão

Anexo III

Sequências alvos: 1000 pbupstream do gene *STL1* de *Saccharomyces cerevisiae* S288C

Fator de transcrição putativos	Sequência consenso	Posição	Fita
Adr1p	TTGGRG	-253	F
Ash1p	YTGAT	-946	F
Ash1p	YTGAT	-786	F
Ash1p	YTGAT	-608	F
Ash1p	YTGAT	-268	F
Ash1p	YTGAT	-92	F
Bas1p, Gcn4p	TGACTC	-631	F
Fkh1p, Fkh2p	RTAAAYAA	-108	F
Fkh1p, Fkh2p	RTAAAYAA	-43	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-880	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-108	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-43	F
Fkh1p, Fkh2p	RYMAAYA	-87	R
Fkh1p, Fkh2p	RYAAACAWW	-880	F
Gcn4p	TGASTCA	-631	F
Gcn4p	TGASTCA	-624	R
Gcr1p	CTTCC	-227	R
Gcr1p	CWTCC	-756	F
Gcr1p	CWTCC	-708	F
Gcr1p	CWTCC	-435	F
Gcr1p	CWTCC	-227	R
Gis1p	TWAGGGAT	-844	F
Gis1p, YER130C	AGGGG	-170	R
Gln3p	GATTAG	-914	R
Hac1p	CCAGC	-440	F
Mcm1p	DCCYWWNNRG	-585	F
Mcm1p	DCCYWWNNRG	-286	R
Mcm1p	CCYWWNNRG	-584	F
Mcm1p	CCYWWNNRG	-287	R
Mot3p	CAGGYA	-538	R
Mot3p	ATGGAT	-701	R
Mot3p	ATGGAT	-911	R
Mot3p	AAGGKA	-843	F
Mot3p	AAGGKA	-292	F
Mot3p	AAGGWT	-968	R
Msn2p, Msn4p, Nrg1p, Rph1p	CCCCT	-175	F
Nrg1p	CCCTC	-146	R
Rgt1p	CGGANNA	-691	F
Rtg1p, Rtg3p	GTCAC	-124	F

Stb5p	CGGNS	-824	F
Stb5p	CGGNS	-699	F
Stb5p	CGGNS	-691	F
Stb5p	CGGNS	-577	F
Stb5p	CGGNS	-559	F
Stb5p	CGGNS	-514	F
Stb5p	CGGNS	-505	F
Stb5p	CGGNS	-519	R
Stb5p	CGGNS	-545	R
Stb5p	CGGNS	-568	R
Stb5p	CGGNS	-591	R
Stb5p	CGGNS	-654	R
Ste12p	GGAAACA	-289	F
Stp1p, Stp2p	CGGCTC	-482	F
Tec1p	CATTCC	-824	R
Xbp1p	CTCGA	-482	R
Yap1p, Yap3p	TGACTCA	-631	F
Yrr1p	WCCGYKKWW	-383	F
Yrr1p	WCCGYKKWW	-446	R
Rim101p	TGCCAAG	-775	F
Rim101p	TGCCAAG	-877	R