



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica**

**Identificação e expressão heteróloga de transportadores de xilose em  
*Saccharomyces cerevisiae***

**VICTOR MENDES HONORATO**

**BRASÍLIA - DF**

**2019**

**VICTOR MENDES HONORATO**

**IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TRANSPORTADORES  
DE XILOSE EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica para a obtenção do título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo  
Moreira de Almeida

Coorientadora: Dra. Débora Trichez

**BRASÍLIA - DF**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Honorato, Victor Mendes

Identificação e expressão heteróloga de transportadores de xilose em  
*Saccharomyces cerevisiae* - Brasília, 2019

98 p

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Coorientadora: Dra. Débora Trichez

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília

1. Engenharia Genética 2. Transportador; 3. Xilose; 4. *Saccharomyces cerevisiae*; 5. *Saitoella complicata*

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Victor Mendes Honorato**, matrícula nº **17/0090345**, intitulada “**Identificação e expressão heteróloga de transportadores de xilose em *Saccharomyces cerevisiae***”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 13 de março de 2019.

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida  
Presidente de Banca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Betania Ferraz Quirino  
Membro Titular

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Membro Titular IB/UnB

Dra. Jessica Carvalho Bergmann  
Membro Suplente

Em 13 de março de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a meus pais, Waldir e Silvana, e a meu irmão, Matheus, que apesar de não entenderem muito o que eu faço ou o porquê de utilizar tantos nomes estranhos, sempre me apoiaram e me deram forças para continuar trilhando esse caminho. A última seção dessa história é para vocês.

Ao meu orientador Dr. João Ricardo, pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa e desenvolver esse projeto durante dois anos. Muito obrigado por toda ajuda, paciência e por sempre estar com as portas da sua sala abertas para me orientar.

Aos meus colegas e amigos de laboratório. Em especial à Débora, pelo auxílio durante todo esse período, você foi parte fundamental para que essa história fosse contada. À Bárbara, por me acolher quando entrei no laboratório e me ensinar não apenas como pode ser legal ficar até as nove da noite no laboratório, mas também em como encarar a ciência de forma realista e edificante. À Luana, por compartilhar todas as felicidades e perrengues de se fazer um mestrado. Ao Henrique, Clara, Talita, Fernanda, Jessica, Carlos e Paula, sou extremamente grato a todos pelo companheirismo e apoio dentro e fora da bancada.

Aos meus amigos de Marista, por toda a amizade desde que somos criança e por serem meu apoio em todas as dificuldades.

Aos meus amigos de UnB, que estão ao meu lado desde que decidi trilhar o caminho acadêmico. Em especial à Ana, que considero uma irmã, e nunca deixou esse elo se quebrar.

À Nadinne, por me acompanhar durante esses dois anos, por todo carinho e paciência (muita paciência). Você foi muito importante para me manter nos trilhos e fazer com que eu valorizasse cada dia mais meu trabalho. Muito obrigado.

Aos meus podcasts!

À Embrapa Agroenergia e todos os seus funcionários, por me proporcionar a oportunidade e estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro para desenvolvimento desse trabalho e sua apresentação em eventos científicos.

Aos membros da banca examinadora, à Universidade de Brasília e a todos os professores que me ajudaram durante essa pós-graduação.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 <b>BIORREFINARIAS.....</b>	17
1.2 <b>CONVERSÃO DE AÇÚCARES EM PRODUTOS DE INTERESSE .....</b>	21
1.3 <b>CENÁRIO BRASILEIRO .....</b>	22
1.4 <b>DESAFIOS PARA A UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....</b>	23
1.5 <b>SACCHAROMYCES CEREVISIAE .....</b>	24
1.6 <b>UTILIZAÇÃO DE XILOSE POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....</b>	24
1.7 <b>TRANSPORTE DE XILOSE.....</b>	27
1.8 <b>TRANSPORTADORES DE XILOSE EM S. CEREVISIAE .....</b>	31
1.9 <b>TRANSPORTADORES DE XILOSE EM OUTROS ORGANISMOS .....</b>	34
1.10 <b>CRIAÇÃO DA LINHAGEM EBY.VW4000 .....</b>	35
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
2.1 <b>OBJETIVO GERAL.....</b>	36
2.2 <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	36
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 <b>MEIOS DE CULTURA E TAMPÕES.....</b>	37
3.2 <b>LINHAGENS .....</b>	39
3.3 <b>SELEÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA POSSÍVEIS TRANSPORTADORES.....</b>	40
3.4 <b>CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO .....</b>	40
3.5 <b>TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....</b>	42
3.6 <b>EXTRAÇÃO PLASMIDIAL .....</b>	43
3.7 <b>TRANSFORMAÇÃO DE S. CEREVISIAE.....</b>	43
3.8 <b>VERIFICAÇÃO DOS TRANSFORMANTES POR PCR DE COLÔNIA .....</b>	43
3.9 <b>CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LINHAGENS RECOMBINANTES.....</b>	45

3.9.1	Teste de crescimento em placas contendo diferentes fontes de carbono .....	45
3.9.2	Acúmulo de xilose intracelular .....	45
3.9.3	Curva de crescimento em glicose .....	46
3.9.4	Fermentações com alta densidade celular .....	47
3.10	<b>DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR</b> .....	47
3.11	<b>ANÁLISE DE METABÓLITOS</b> .....	48
3.12	<b>CONSTRUÇÃO DE MODELOS TRIDIMENSIONAIS</b> .....	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
4.1	<b>SELEÇÃO DOS GENES PUTATIVOS CODIFICANTES PARA TRANSPORTADORES</b> .....	50
4.2	<b>CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO</b> .....	58
4.3	<b>EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES EM <i>S. CEREVISIAE</i></b> .....	60
4.4	<b>CARACTERIZAÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLACA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO</b> .....	60
4.5	<b>ACÚMULO DE XILOSE INTRACELULAR</b> .....	63
4.6	<b>AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS EBY-CANTA E EBY-SAICO EM GLICOSE</b> .....	65
4.7	<b>FERMENTAÇÕES COM ALTA DENSIDADE CELULAR</b> .....	67
4.8	<b>MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DOS TRANSPORTADORES</b> .....	74
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>RESUMO PARA PÚBLICO GERAL</b> .....	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>87</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Conceito básico de uma biorrefinaria. ....	18
<b>Figura 2.</b> Organização e composição da biomassa lignocelulósica.....	20
<b>Figura 3.</b> Vias metabólicas da utilização de xilose. ....	25
<b>Figura 4.</b> Tipos de transporte realizados por proteínas membro da superfamília MFS.....	28
<b>Figura 5.</b> Modelo estrutural do transportador GLUT3.....	29
<b>Figura 6.</b> Representação do modelo "Clamp-and-Switch".....	30
<b>Figura 7.</b> Árvore filogenética com os 63 genes codificantes para transportadores de membrana prospectados nesse trabalho. ....	51
<b>Figura 8.</b> Alinhamento das sequencias de transportadores selecionados nesse trabalho .....	54
<b>Figura 9.</b> Predição dos domínios transmembrana dos transportadores utilizados nesse trabalho por meio do software PRALINE .....	56
<b>Figura 10.</b> Predição da estrutura secundária dos transportadores utilizados nesse trabalho.....	57
<b>Figura 11.</b> Estratégia utilizada na clonagem dos genes de transportadores em plasmídeo de expressão em <i>S. cerevisiae</i> .....	59
<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) confirmando a clonagem dos genes de transportadores em plasmídeo episossomal p425-GDP utilizando os sítios de restrição BamHI e PstI. ....	59
<b>Figura 13.</b> Crescimento de linhagens EBY-Transportador em meio sólido contendo apenas um açúcar como fonte de carbono.....	62
<b>Figura 14.</b> Capacidade de internalização de xilose por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> transformadas com genes putativos para transportadores de xilose. ....	64
<b>Figura 15.</b> Curva de crescimento de linhagens (A) EBY-Saico, (B) EBY-Canta e (C) EBY-p425Ø em glicose .....	66
<b>Figura 16.</b> Eletroforese com os produtos da PCR de colônia para confirmação da presença dos genes <i>xyIA</i> , <i>XKS1</i> e Saico na levedura EBY-XIXK-Saico. ....	68
<b>Figura 17.</b> Fermentação de EBY-XIXK-Saico (A,B) e EBY-XIXK-p425Ø (C, D) em meio YNB, suplementado com histidina e contendo xilose como única fonte de carbono .....	69

<b>Figura 18.</b> Co-fermentação das linhagens EBY-XIXK-Saico (A, B, C e D) e EBY-XIXK-p425Ø (E, F, G e H).....	71
<b>Figura 19.</b> Consumo de açúcares por EBY-XIXK-Saico (A, B, C e D) e EBY-XIXK-p425Ø (E, F, G e H).....	72
<b>Figura 20.</b> Representação tridimensional dos transportadores utilizados nesse trabalho .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de diferentes matérias primas lignocelulósicas .....	21
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros cinéticos dos principais transportadores endógenos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc) envolvidos no transporte de xilose. ....	32
<b>Tabela 3.</b> Linhagens de leveduras utilizados nesse trabalho.....	39
<b>Tabela 4.</b> Vetores utilizados nesse trabalho .....	41
<b>Tabela 5.</b> Protocolo para digestão plasmidial. ....	42
<b>Tabela 6.</b> Protocolo para reação de ligação.....	42
<b>Tabela 7.</b> Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho. ....	44
<b>Tabela 8.</b> Reagentes utilizados no preparo de uma reação de PCR. ....	45
<b>Tabela 9.</b> Quantidades de xilose e glicose utilizadas nas fermentações com alta densidade celular. ....	47
<b>Tabela 10.</b> Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências utilizadas nesse trabalho.....	50
<b>Tabela 11.</b> Genes que codificam para transportadores selecionados nesse trabalho. ....	52
<b>Tabela 12.</b> Plasmídeos de expressão em <i>S. cerevisiae</i> construídos nesse trabalho. ....	58
<b>Tabela 13.</b> Co-fermentação de xilose e glicose pela linhagem EBY.VW4000 transformada com plasmídeos contendo os genes para o aproveitamento de xilose via XI-XK, além do transportador Saico. ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água destilada
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Água deionizada
<b>DO600<sub>nm</sub></b>	Densidade ótica à 600nm
<b>Hxt</b>	Transportador de hexose
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>SB</b>	Tampão sódio e ácido bórico
<b>XDH</b>	Xilitol desidrogenase
<b>XI</b>	Xilose isomerase
<b>XK</b>	Xiluloquinase
<b>XR</b>	Xilose redutase
<b>YNB</b>	Base nitrogenada para levedura
<b>YPM</b>	Extrato de levedura, peptona e maltose

## RESUMO

A implementação de biorrefinarias é uma etapa essencial na busca por uma economia circular, bem como na diminuição da dependência por combustíveis fósseis. Nesse contexto, a biomassa lignocelulósica se apresenta como uma promissora fonte de energia em biorrefinarias, uma vez que se trata de uma matéria prima extremamente abundante e rica em açúcares que podem ser convertidos em biocombustíveis e uma ampla gama de compostos químicos. A xilose é o segundo açúcar mais abundante em biomassas lignocelulósicas, ficando atrás apenas da glicose. A eficiente utilização dessa pentose por microrganismos ainda é um dos grandes desafios que permeiam a utilização da biomassa em biorrefinarias.

*Saccharomyces cerevisiae* é um dos principais organismos utilizados em processos fermentativos industriais. Entre os desafios relacionados à utilização dessa levedura para conversão de xilose em bioprodutos está o transporte de xilose. Nesse trabalho, foram prospectados genes putativos codificantes para novos transportadores de açúcares, em especial a xilose. Três novos genes codificantes para transportadores foram clonados em plasmídeos episomais e inseridos na levedura *S. cerevisiae* EBY.VW4000. A linhagem expressando o gene codificante para o transportador denominado Saico apresentou a recuperação de crescimento em glicose, bem como a capacidade de internalizar xilose. Para avaliar a capacidade de consumo de xilose pela linhagem expressando o transportador Saico, foi construída uma linhagem contendo também o gene *xylA* (xilose isomerase de *Piromyces* sp), o qual permite o catabolismo de xilose por *S. cerevisiae*. Essa nova linhagem, em altas densidades celulares (5 - 10 g.L<sup>-1</sup>), foi capaz de fermentar xilose e glicose concomitantemente, produzindo xilitol (rendimento de 0,62 ± 0,07 g por g de xilose) e etanol, enquanto a linhagem apenas com a via da isomerização não conseguiu consumir xilose ou glicose nas mesmas condições fermentativas.

Nesse trabalho foi descoberto um novo transportador de açúcares. Esse transportador é originário do fungo *Saitoella complicata*, e apresenta uma identidade 46,42% de similaridade com o transportador Hxt11 de *S. cerevisiae*. Essa novidade abre possibilidades para construções de linhagens mais robustas, com o objetivo de evitar o perfil diáuxico observado geralmente em *S.*

*cerevisiae*. O consumo simultâneo de glicose e xilose é essencial para a diminuição do tempo de fermentação, aumentando a produtividade do processo e diminuindo as chances de contaminações generalizadas.

Palavras-chave: Engenharia genética, transportador, xilose, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saitoella complicata*

## ABSTRACT

The implementation of biorefineries is an essential step towards the development of a more circular economy, as well as to the decrease fossil fuels dependence. In this context, lignocellulosic biomass is a promising feedstock once it is rich in sugars that can be converted into different biofuels and chemical compounds. Following glucose, xylose is the second most abundant sugar in plant biomass, and its efficient utilization by microorganisms is still a major challenge to the implementation of biorefineries for lignocellulosic biomass.

*Saccharomyces cerevisiae* is one of the main organisms involved in fermentative industrial processes. The transport of xylose is a major bottleneck in the utilization of this yeast for the conversion of xylose into bioproducts. In this work, new putative genes coding for xylose transporters were prospected. Three new genes were cloned in episomal plasmids and inserted in the EBY.VW4000 *Saccharomyces cerevisiae* strain. The strain containing the gene coding for the Saico transporter was able to recover growth on glucose phenotype, as well as the ability to internalize xylose. To evaluate xylose consumption capacity, a strain harbouring not only the Saico transporter, but also the genes *xyIA* (coding for *Piromyces* sp. xylose isomerase) and *XKS1*, introducing a xylose catabolism pathway was constructed. This new strain, under high cell densities (5 - 10 g.L<sup>-1</sup>), was able to simultaneously consume glucose and xylose, producing xylitol (with a productivity of 0,62 ± 0,07 g per g of xylose) and ethanol, while the negative control strain was not able of consuming any of the sugars in the same conditions.

In this work, a new sugar transporter was discovered. This transporter is originally from the fungus *Saitoella complicata*, and presents an identity 46,42% similar to Hxt11 from *S. cerevisiae*. This novel transporter opens up possibilities for the construction of more robust strains, with the objective of avoiding the diauxic profile generally observed in *S. cerevisiae* when using glucose and xylose simultaneously. The co-fermentation of both sugars is essential for reducing fermentation time, optimizing the process productivity and decreasing chances of bacterial contamination.

Keywords: Genetic engineering, transporter, xylose, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saitoella complicata*

# 1 INTRODUÇÃO

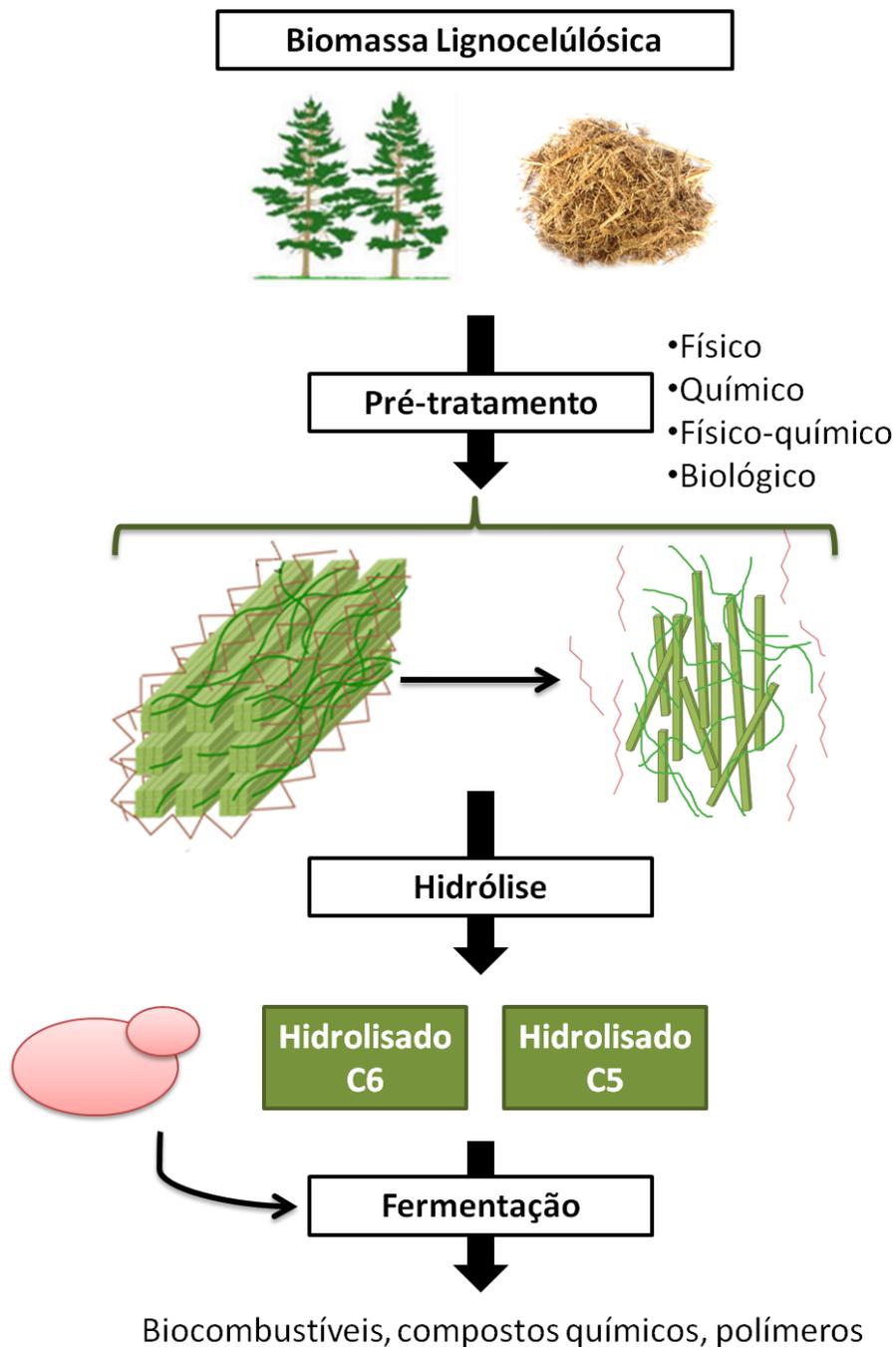
## 1.1 BIORREFINARIAS

A vasta utilização de combustíveis fósseis ao longo dos anos foi responsável pela geração de diversos problemas, sejam eles de natureza ambiental, socioeconômica e até mesmo geopolítica. A fim de diminuir a dependência pela utilização do petróleo para a obtenção de biocombustíveis e outros compostos químicos, vem-se buscando novas fontes renováveis ao redor do mundo. Nesse contexto, a implementação de biorrefinarias tem se tornado cada vez mais atraente, sendo trabalhada por diversos grupos.

O conceito de biorrefinaria é baseado na integração de processos para a utilização de biomassa e sua conversão em combustíveis, energia e compostos químicos (Almeida *et al.* 2012). Esse é um conceito que vai de encontro à ideia de uma economia circular, fundamentada na diminuição de resíduos e poluição, reutilização de materiais e energia, bem como na regeneração gradativa da biosfera (Ellen MacArthur Foundation 2013).

A importância da implementação de biorrefinarias pode ser confirmada pela criação de uma tarefa específica a esse tema pela Agência Internacional de Energia (IEA 2009). O crescente número de publicações relacionadas a esse tema também vem aumentando exponencialmente na última década, sendo que maior parte dessas publicações está relacionada ao desenvolvimento de novas tecnologias e processos (Bauer *et al.* 2017).

Em resumo, em uma biorrefinaria a matéria prima passa por processos de pré-tratamento para a liberação de açúcares, que posteriormente serão utilizados pelos microrganismos, as fábricas vivas, para sua conversão em produtos de interesse (Hong & Nielsen 2012) (Figura 1).



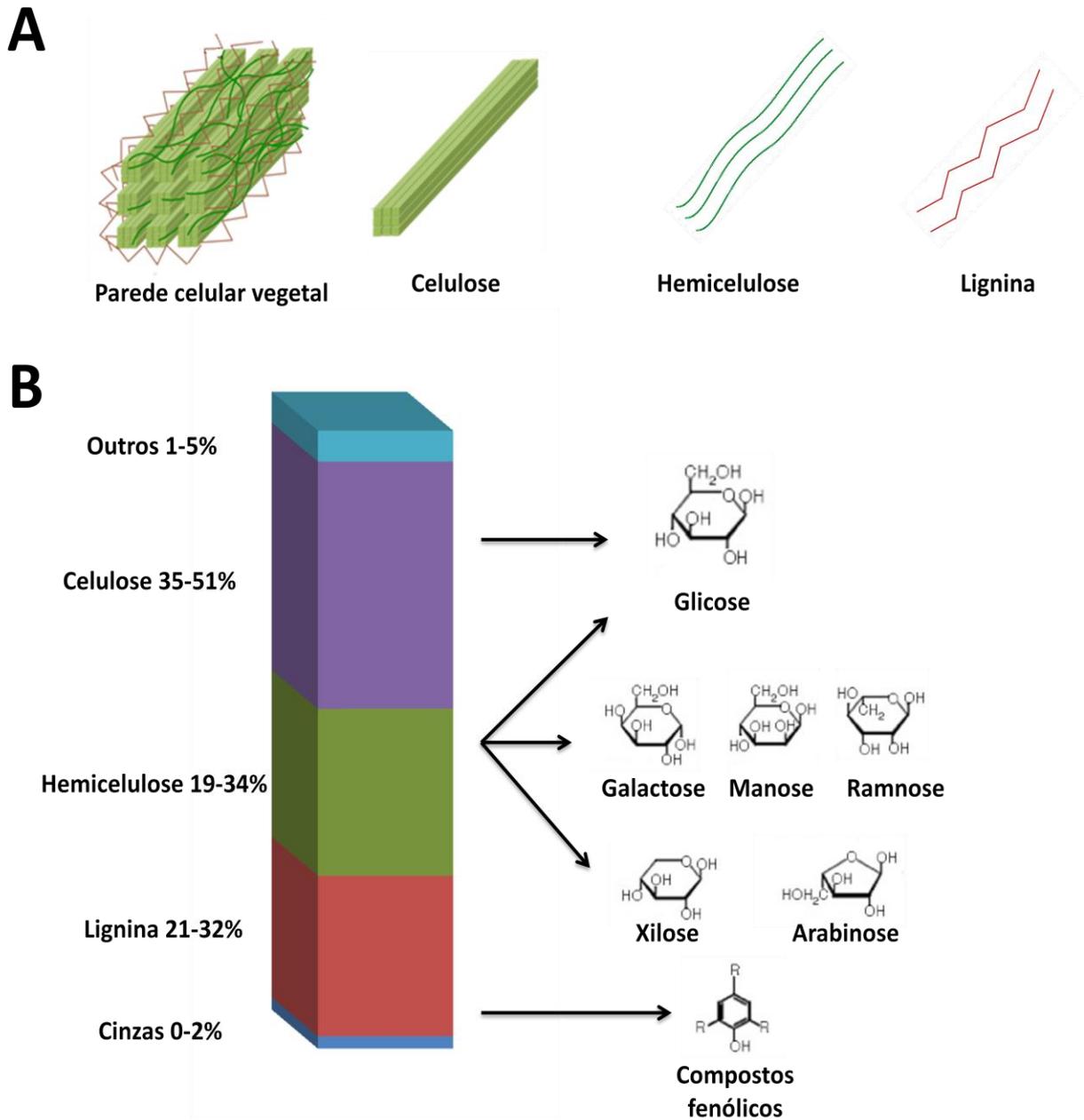
**Figura 1. Conceito básico de uma biorrefinaria.** A biomassa vegetal é pré-tratada e hidrolisada para liberação de açúcares que serão fermentados por microrganismos para a obtenção de compostos químicos. A partir do pré-tratamento e hidrólise de celulose são obtidos hidrolisados C6, ricos em hexoses, enquanto pela hemicelulose são obtidos C6 e C5, ricos em hexoses e pentoses, respectivamente. Importante citar que durante os passos de pré-tratamentos a hemicelulose e lignina podem ser solubilizadas, facilitando a ação de enzimas hidrolíticas no passo posterior. Adaptado de Hong & Nielsen 2012.

Para a implementação desses sistemas de produção, a utilização de biomassa lignocelulósica é uma alternativa que vem sendo amplamente avaliada, devido seu alto potencial renovável e energético. Entre as vantagens de se utilizar essa biomassa estão: a maior equidade em sua distribuição geográfica quando comparada à distribuição de combustíveis fósseis; a diminuição da competição com a indústria alimentícia (Nordhoff 2007); o baixo custo; seus processos associados são extremamente menos nocivos ao meio ambiente que a queima de combustíveis fósseis, entre outros (Hahn-Hagerdal *et al.* 2006).

A biomassa é proveniente principalmente de resíduos agroindustriais, como, por exemplo, bagaço e palha de cana de açúcar, palha de milho, palha de trigo, entre outros. Sua composição é essencialmente fibras de celulose envoltas por hemicelulose intercaladas com lignina (Figura 2A). A celulose compreende entre 35 a 51% dessa biomassa e é composta por monômeros de glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas formando uma longa cadeia polissacarídica (Saha 2004, Almeida *et al.* 2007).

A hemicelulose, por sua vez, representa 19 a 34%, sendo um polímero heterogêneo formado por pentoses e hexoses (Figura 2B). As pentoses, representam até 20% dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, sendo a xilose o segundo carboidrato mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da glicose. Isso representa seu alto potencial para ser utilizado em biorrefinarias, principalmente por ser o principal açúcar na hemicelulose em várias biomassas (Tabela 1) (Saha *et al.* 2004, Almeida *et al.* 2011).

A lignina é uma macromolécula complexa, composta principalmente por unidades de fenilpropano, ligadas comumente por ligações éter. Representando cerca de 21 a 32%, essa estrutura tem a função de conferir integridade e proteção à lignocelulose (Figura 2) (Saha 2004, Almeida *et al.* 2007).



**Figura 2. Organização e composição da biomassa lignocelulósica.** A. Organização da biomassa lignocelulósica, composta por fibras de celulose envoltas por hemicelulose intercalada com lignina. B. Composição percentual dos componentes da biomassa lignocelulósica, bem como os monômeros presentes em cada porção. Adaptado de Almeida *et al.* 2007.

**Tabela 1. Composição de diferentes matérias primas lignocelulósicas.** Estão representadas as porcentagens de diferentes polissacarídeos componentes dessa biomassa. NR = Não reportado. Adaptado de Almeida *et al.* 2011.

Material	Glucana	Manana	Galactana	Xilana	Arabinana	Lignina	Referência
Palha de milho (Americna)	36.1	1.8	2.5	21.4	3.5	17.2	Ohgren <i>et al.</i> 2007
Palha de milho (Italiana)	36.8	0.3	2.9	22.2	5.5	21.2	Ohgren <i>et al.</i> 2007
Bagaço de cana-de-açúcar	43.3	NR	NR	24.3	2.0	22.8	Carrasco <i>et al.</i> 2010
Palha de trigo	41.2	NR	NR	26.1	-	19.1	Rémond <i>et al.</i> 2010
Palha de arroz	34.2	NR	NR	24.5	NR	11.9	Wiselogel 1996

A fim de se disponibilizar os monômeros dessa matéria prima para processos de conversão, a biomassa deve passar por processos de pré-tratamento e hidrólise. O pré-tratamento é a etapa que visa diminuir a recalcitrância da biomassa e liberar os polímeros para a ação de enzimas hidrolíticas, que quebram os polímeros nos monômeros (Figura 1). Esse pré-tratamento pode ser de diversos tipos, como: físico, químico, físico-químico e biológico. Cada um desses pré-tratamentos apresenta vantagens e desvantagens próprias, fazendo com que o tipo de pré-tratamento utilizado deve ser escolhido de acordo com os processos em que o material será empregado (Sharma *et al.* 2017).

## 1.2 CONVERSÃO DE AÇÚCARES EM PRODUTOS DE INTERESSE

Os monômeros obtidos a partir dos processos de pré-tratamento e hidrólise da biomassa podem ser convertidos em uma ampla gama de compostos. A crescente utilização de diferentes leveduras, *Saccharomyces* e

não-*Saccharomyces* como *Komagataella phaffii*, *Scheffersomyces stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* vem ampliando cada vez mais a diversidade dos compostos obtidos, bem como possibilitando variações nos processos fermentativos e substratos utilizados. Isso se deve ao fato de que cada microrganismo apresenta suas vias metabólicas e padrões regulatórios próprios (Mattanovich *et al.* 2014).

Apesar do bioetanol ainda ser o produto de maior protagonismo, na tentativa de obter maiores rendimentos e mais energia, combustíveis como butanol e isobutanol vem crescendo no cenário biotecnológico. Além da obtenção de biocombustíveis, leveduras também podem ser utilizadas como fábricas de proteínas heterólogas. A levedura metilotrófica *K. phaffii* apresenta enorme potencial nessa área, sendo responsável pela produção de compostos que podem ser utilizados em diversos setores, como por exemplo na indústria farmacêutica e alimentícia (Mattanovich *et al.* 2014). Ácidos orgânicos, isoprenoides e metabólitos secundários são exemplos de compostos obtidos que apresentam vasta utilização na sociedade moderna.

### 1.3 CENÁRIO BRASILEIRO

Segundo dados da Associação de Combustíveis Renováveis (Renewable Fuels Association - RFA), o Brasil é o segundo maior produtor de etanol no mundo, sendo responsável por 26% da produção mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos.

O etanol pode ser de primeira geração, quando é obtido a partir de fontes vegetais, como a cana-de-açúcar e milho, o que leva a um embate com a utilização dessas fontes voltadas para o setor alimentício (UNCTAD 2016). Por outro lado, o etanol de segunda geração, é assim denominado quando obtido a partir da biomassa lignocelulósica, proveniente principalmente de resíduos agroindustriais, como o bagaço da cana-de-açúcar e palha de milho (Dias *et al.* 2012, Jansen *et al.* 2017).

Grande parte do etanol produzido no Brasil é de primeira geração, o que resulta em altas quantidades de resíduos produzidos. Na safra 2015/16, foram produzidos 166,40 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar

(IEA 2017). Isso ilustra o grande potencial que o Brasil apresenta para a utilização da biomassa lignocelulósica.

#### 1.4 DESAFIOS PARA A UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Entre as principais desvantagens e desafios encontrados na realização dos pré-tratamentos abordados anteriormente, estão as condições extremas empregadas, bem como a produção de compostos inibitórios, tóxicos aos microrganismos fermentadores (Figura 2B) (Klinke *et al.* 2004, Palmqvist & Hahn-Hagerdal 2000). Os compostos: 2-furaldeído (furfural) e 5-hidróximetil-2-furaldeído (HMF) são dois dos principais compostos inibitórios (Palmqvist & Hahn-Hagerdal 2000). Eles são gerados pela degradação de hexoses e pentoses devido às grandes temperaturas e pressões empregadas nos diferentes tipos de pré-tratamento (Palmqvist & Hahn-Hagerdal 2000). Além deles, os ácidos metanoico e levulínico, gerados pela degradação do furfural e HMF, bem como compostos fenólicos produzidos pela quebra da lignina, são responsáveis por inibir a atividade de leveduras (Ulbritch *et al.* 1984, Palmqvist & Hahn-Hagerdal 2000).

Outros desafios da utilização da lignocelulose estão ligados à incapacidade dos principais microrganismos utilizados em processos industriais, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, fermentarem pentoses eficientemente para a obtenção de bioetanol (Moyses *et al.* 2016). Essa incapacidade pode estar ligada a uma ausência de vias metabólicas endógenas no microrganismo, como é o caso de *S. cerevisiae*. Existem leveduras capazes de fermentar xilose até a produção de bioetanol. No entanto, as enzimas da via metabólica utilizam diferentes cofatores, o que gera um desbalanço metabólico, secreção de xilitol e redução do consumo de xilose (ver tópico 1.6).

Outro desafio e etapa limitante na utilização de hidrolisados lignocelulósicos para obtenção de produtos por *S. cerevisiae*, sobretudo o bioetanol, é o transporte de xilose. Esse trabalho se direcionará ao estudo e otimização dessa etapa nesse microrganismo.

## 1.5 **SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

A levedura *S. cerevisiae* é um dos principais modelos de estudo existentes. Entre organismos eucariotos, o genoma de *S. cerevisiae* foi o primeiro a ser completamente sequenciado (Goffeau *et al.* 1996). Além disso, esse microrganismo é amplamente utilizado em diversos processos industriais, como por exemplo na produção de pães, cervejas, vinhos e biocombustíveis, fazendo com que esses processos já sejam voltados e adaptados para a utilização dessa levedura. Esses aspectos, associados à alta disponibilidade de ferramentas biotecnológicas, como plasmídeos e protocolos próprios, faz com que *S. cerevisiae* seja uma plataforma altamente atrativa a ser utilizada em diferentes ramos de pesquisas científicas (Giersch & Finnigan 2017).

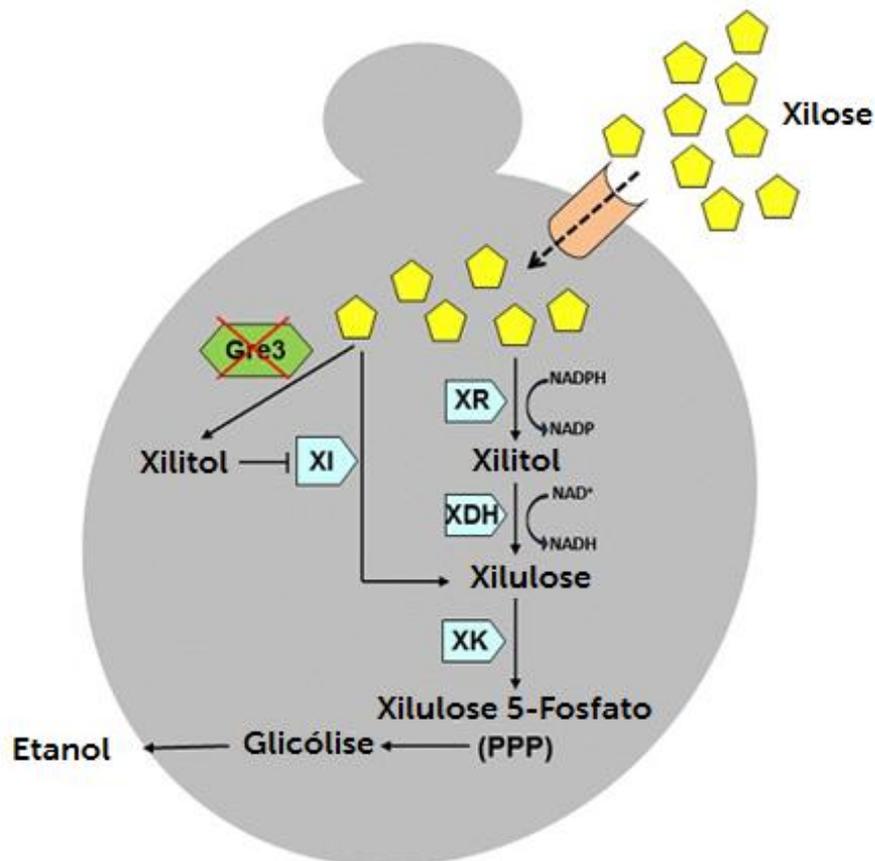
Diversas características nativas dessa levedura justificam o alto potencial de sua utilização no estabelecimento de uma biorrefinaria baseada na utilização de biomassa lignocelulósica. Uma delas é capacidade de crescer sob diferentes condições de aeração, em especial condições de anaerobiose, observada em reatores durante processos industriais (Paes & Almeida 2014). A tolerância a baixos níveis de pH também é uma característica vantajosa, uma vez que diminui as chances de contaminações bacterianas (Paes & Almeida 2014). Outro diferencial dessa levedura é a tolerância a alguns compostos tóxicos gerados no processo de pré-tratamento da biomassa.

Entretanto, apesar de ser capaz de utilizar a maior parte das hexoses presentes na biomassa lignocelulósica, essa levedura é incapaz de fermentar as pentoses disponibilizadas nessa matéria-prima, seja por motivos metabólicos, ou pelo transporte desses monômeros para o meio intracelular.

## 1.6 **UTILIZAÇÃO DE XILOSE POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Apesar do alto potencial industrial de *S. cerevisiae*, a inabilidade de fermentar pentoses naturalmente ainda é um desafio para sua utilização no

aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Por esse motivo, diversos grupos de pesquisa direcionaram esforços para a obtenção de linhagens recombinantes capazes de fermentar esse açúcar. Existem duas vias metabólicas principais para a utilização de xilose: a via da Xilose Redutase - Xilitol Desidrogenase (XR-XDH) e a via da Xilose Isomerase (XI) (Figura 3).



**Figura 3. Vias metabólicas de utilização de xilose.** Estão representadas as vias da Xilose Redutase - Xilitol Desidrogenase e da Xilose Isomerase. Adaptado de Moyses *et al.* 2016.

Em geral, a via XR-XDH é encontrada naturalmente em leveduras e fungos filamentosos. Nessa via a xilose entra na célula e é convertida em xilitol pela enzima xilose redutase. Em leveduras, essas enzimas são codificadas pelo gene *XYL1* e utilizam NADPH e/ou NADH, com uma maior preferência pelo primeiro (Lee 1998, Kuyper *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2012). Em seguida, o xilitol é oxidado a xilulose por meio da enzima xilitol desidrogenase, codificada pelo gene *XYL2*. Por sua vez, essa enzima utiliza  $NAD^+$  exclusivamente. Dessa

maneira, é gerado um desbalanço de cofatores, resultando em um acúmulo de xilitol e diminuindo a produção de etanol (Kuyper *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2012).

A via da xilose isomerase, codificada pelo gene *xyIA*, por sua vez, é encontrada principalmente em bactérias, apesar de ser descrita em algumas poucas espécies de fungos, tais como *Piromyces* sp. (Harhangi *et al.* 2003, Kuyper *et al.* 2003). Essa via apresenta a vantagem de converter a xilose diretamente para xilulose por meio de isomerização. Dessa maneira, diminui-se o acúmulo indesejado de xilitol, bem como o desbalanço de cofatores, uma vez que essa enzima não utiliza cofatores na reação (Kuyper *et al.* 2004, Kuyper *et al.* 2005). De forma geral, o uso da via XI é benéfico por produzir menos xilitol e obter maiores rendimentos quando comparados com a via XR-XDH (Li *et al.* 2016b). Por outro lado, a utilização da via XR-XDH é responsável por obter maiores taxas de produtividade em comparação com a via XI (Li *et al.* 2016b).

Basicamente, as duas vias se baseiam na conversão da xilose em xilulose, que será fosforilada a xilulose-5-fosfato pela enzima xiluloquinase e seguirá os passos do metabolismo pela via das pentoses-fosfato e glicólise (Moyses *et al.* 2015). A fim de permitir a utilização de xilose por *S. cerevisiae*, foram realizados diversos trabalhos envolvendo engenharia genética voltada para a expressão de genes codificando para as enzimas das vias metabólicas (Chu & Lee 2007, Moyses *et al.* 2015).

Entre as estratégias de inserção dos genes codificantes para as enzimas da via XR-XDH em *S. cerevisiae*, pode ser destacada a expressão de genes originários de *Pichia stipitis* (atualmente denominada *Scheffersomyces stipitis*), que é a mais usualmente expressa, juntamente com a superexpressão do gene *XKS1*, codificante para a xiluloquinase de *S. cerevisiae*, permitindo o consumo de xilose e produção de etanol (Eliasson *et al.* 2000). No entanto, o desbalanço de cofatores citado anteriormente é uma grande preocupação para a utilização dessa via. A alteração de preferência dos cofatores e a adição de aceptores de elétrons estão entre algumas das tentativas de se esquivar desse problema (Moyses *et al.* 2015).

Já para a via de aproveitamento via XI, o gene *xyIA* do fungo *Piromyces* sp. foi o primeiro a ser expresso e apresentar alta atividade em *S. cerevisiae* (Harhangi *et al.* 2003, Kuyper *et al.* 2003). No entanto, a formação

de xilitol e baixas atividades da xiluloquinase fizeram com que estratégias adicionais fossem utilizadas nesses casos. Entre elas estão: a superexpressão do gene *XKS1* e de alguns genes da via das pentoses-fosfato, bem como a deleção do gene *GRE3*, que codifica uma aldose redutase inespecífica endógena em *S. cerevisiae* (Kuyper *et al.* 2015).

## 1.7 TRANSPORTE DE XILOSE

Como dito anteriormente, o transporte de xilose para o meio intracelular é uma das etapas essenciais no processo fermentativo por microrganismos (Moyses *et al.* 2016, Sharma *et al.* 2018). A fim de entender o funcionamento dos transportadores em microrganismos, primeiro é necessário o entendimento geral acerca dessas proteínas, suas estruturas e funcionamentos.

O transporte de açúcares através de membranas celulares é considerado o primeiro passo para a realização das principais atividades metabólicas de um organismo. As estruturas responsáveis por esse passo são proteínas de membrana, pertencentes principalmente à superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (Quistgaard *et al.* 2016). O termo MFS foi citado primeiramente em 1993 quando análises bioinformáticas de diferentes grupos de proteínas revelaram que todos faziam parte de uma grande superfamília de transportadores (Marger & Saier 1993). Em 2012, essa superfamília já era composta por 74 famílias, distribuídas em praticamente todos os filos de organismos existentes (Reddy *et al.* 2012).

Esses transportadores podem ser divididos em três grupos baseado no modo de transporte: i) uniporte, no qual apenas um substrato é transportado, ii) antiporte, no qual um cosubstrato é transportado na direção contrária ao substrato principal e iii) simporte, no qual o substrato é transportado com um íon acoplado (Figura 4).



**Uniporte**



**Simporte**

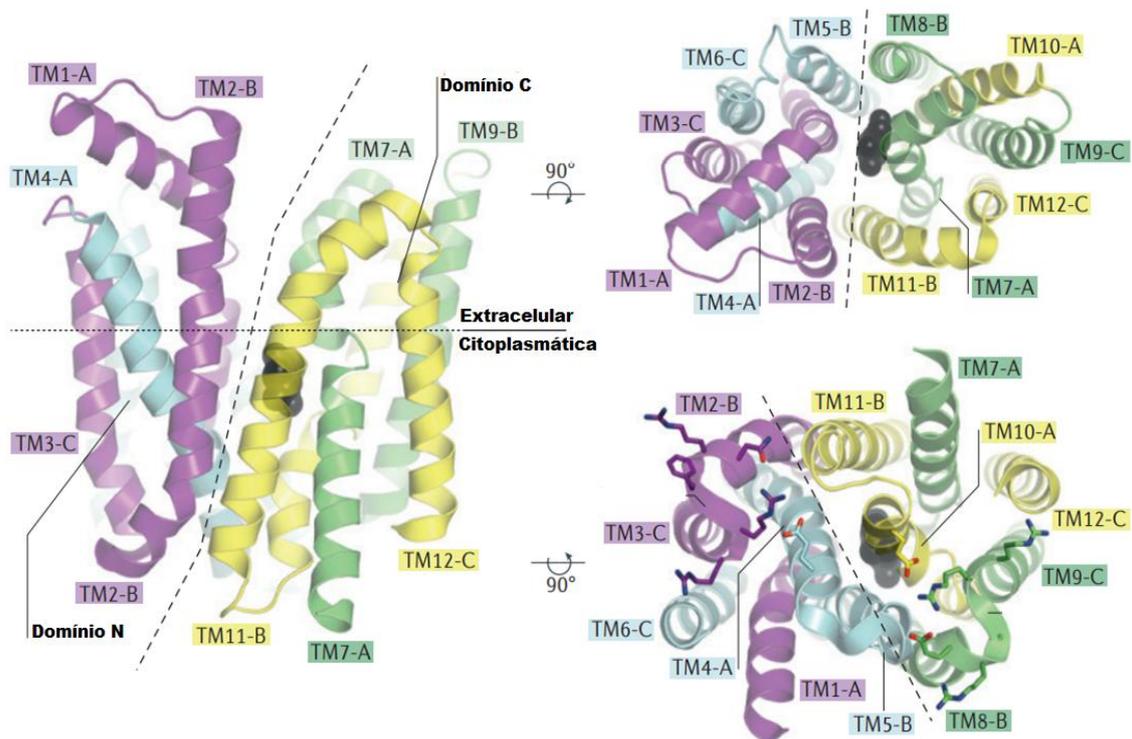


**Antiporte**

**Figura 4. Tipos de transporte realizados por proteínas da superfamília MFS.** As proteínas podem transportar apenas uma molécula principal (Uniporte) ou uma molécula acoplada a um cosubstrato na mesma direção (Simporte) ou em direções contrárias (Antiporte) através da membrana celular. O círculo preto representa o substrato principal transportado, como uma molécula de açúcar. O círculo cinza representa o cosubstrato, como por exemplo um íon. Adaptado de Quistgaard *et al.* (2016).

Dentro dessa super-família, a maior e mais importante, envolvida no transporte de açúcar nos mais variados seres vivos é a família Sugar Porter (Saier Jr 2002). A estrutura dos transportadores pertencentes à essa família é muito bem definida e conservada (Saier Jr 2002).

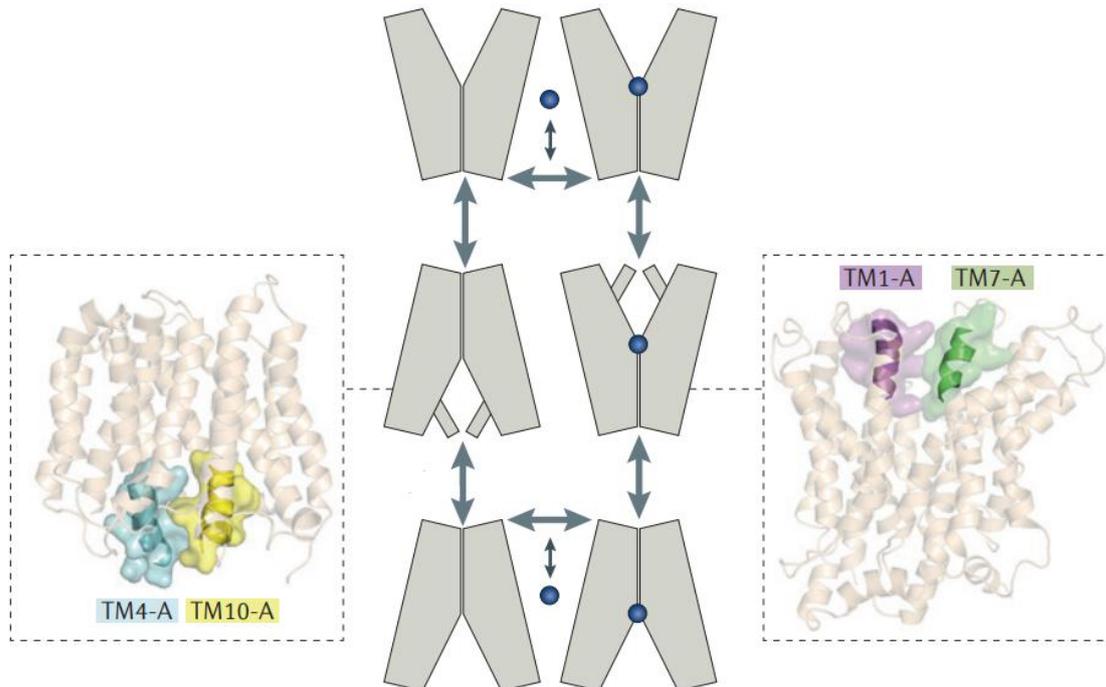
Essas proteínas são divididas em dois domínios, o domínio N-terminal, composto por 6 segmentos transmembrana (TM1 a 6) e o domínio C-terminal, também composto por 6 segmentos (TM7 a 12) (Figura 5) (Hirai *et al.* 2002, Yan *et al.* 2015, Quistgaard *et al.* 2016). Esses segmentos são hélices, agrupadas em quatro grupos de três segmentos (TMs 1,2,3, TMs 4,5,6, TMs 7,8,9 e TMs 10,11,12), nas quais os primeiros segmentos (TMs1, 4, 7 e 10) estão posicionados no centro da estrutura (Quistgaard *et al.* 2016) (Figura 5).



**Figura 5. Modelo estrutural do transportador GLUT3.** O transportador de glicose GLUT3 pode ser usado como modelo para representar os demais membros da família Sugar Porter. Estão representadas as visões: lateral (esquerda), extracelular (direita superior) e citoplasmática (direita inferior). Em roxo está representado a primeira trinca de segmentos transmembrana (TMs 1, 2 e 3), em azul claro a segunda trinca (TMs 4, 5 e 6), em verde a terceira (TMs 7, 8 e 9) e em amarelo está representado a quarta trinca (TMs 10, 11 e 12). As esferas negras representam o substrato transportado, no caso, a glicose. Adaptado de Quistgaard *et al.* 2016.

Sabe-se que durante a passagem de um substrato através de uma membrana ocorrem ciclos de mudanças conformacionais na proteína. O modelo clássico aceito é chamado de "Rocker-Switch model" (Quistgaard *et al.* 2016). Nesse modelo, a estrutura rígida da proteína alterna entre dois estados conformacionais, podendo estar aberta para o meio intracelular ou aberta para o meio extracelular (Quistgaard *et al.* 2016). Essas mudanças ocorrem por meio da rotação dos eixos dos domínios N e C da proteína como estruturas rígidas.

Um modelo mais recente, chamado de "Clamp and Switch model", sugere a existência de uma conformação ocluída (Quistgaard *et al.* 2016). Esse modelo sugere que essas mudanças são muito mais complexas, envolvendo uma torção dos primeiros segmentos transmembrana de cada trinca (TMs 1, 4, 7 e 10), além de torções nos segmentos seguintes (Quistgaard *et al.* 2016) (Figura 6).



**Figura 6. Representação do modelo "Clamp-and-Switch".** Esse modelo sugere um ciclo de estados conformacionais que um transportador deve passar durante o transporte de um substrato. Esses estados são (de cima para baixo): exterior aberto; interior ocluído e exterior ocluído; interior aberto. Nas caixas tracejadas estão destacadas as porções intracelulares dos segmentos transmembrana TM4 e TM10, bem como as porções extracelulares das hélices TM1 e TM7, que são responsáveis pelos estados ocluídos do transportador. Adaptado de Quistgaard *et al.* 2016).

Outra característica presente em todos os membros da família Sugar Porter é o domínio helical intracelular (ICH). Esse domínio é caracterizado por 3-4 hélices entre os domínios N e C, além de uma pequena hélice no domínio

C-terminal. Acredita-se que esse domínio exerce função importante na oclusão do portão intracelular do transportador (Sun *et al.* 2012, Yan 2015).

## 1.8 TRANSPORTADORES DE XILOSE EM *S. CEREVISIAE*

O transporte de açúcares em *S. cerevisiae* é realizado essencialmente pelos transportadores de hexose (Hxt1 a Hxt17 e Gal2) e por transportadores específicos de maltose (Brondjik *et al.* 2001, Alper *et al.* 2016). Os transportadores de hexose são membros da família Sugar Porter, assim como o transportador GLUT3, exemplificado na seção anterior (Figura 5).

Os transportadores HXT apresentam alta afinidade a glicose, sendo também capazes de transportar outros açúcares, como xilose e galactose com menor afinidade. Em *S. cerevisiae*, são existentes 18 transportadores de hexose, dos quais Hxt1 a Hxt7 e Gal2 são responsáveis pela internalização de glicose por meio de difusão facilitada, caracterizando um uniporte (Reinfeberger *et al.* 1997, Moyses *et al.* 2016). Eles podem ser divididos entre transportadores de alta afinidade: Hxt6, Hxt7 e Gal2, apresentando uma constante de Michaelis (Km) entre 1 e 2 mM de glicose (Reinfeberger *et al.* 1997, Moyses *et al.* 2016). Existem também transportadores de afinidade intermediária, com o Km por volta de 10 mM, como Hxt2, Hxt4 e Hxt5 (Reinfeberger *et al.* 1997, Moyses *et al.* 2016). E por último, existem transportadores de baixa afinidade por glicose, com o Km entre 50 e 100 mM, entre eles estão Hxt1 e Hxt3 (Reinfeberger *et al.* 1997, Moyses *et al.* 2016).

Entre esses transportadores, sabe-se que Hxt1, Hxt4, Hxt5, Hxt7 e Gal2 também são capazes de transportar xilose (Hamacher *et al.* 2002). No entanto, a afinidade e velocidade de reação para esse substrato é muitas vezes menor quando comparado com os mesmos parâmetros para glicose. Como exemplo, podemos citar os transportadores Gal2 e Hxt7, que apresentam um Km de 1,5 e 0,5 mM por glicose, enquanto essas constantes são de 225,6 e 200,3 mM para o transporte de xilose (Tabela 2) (Farwick *et al.* 2014).

**Tabela 2. Parâmetros cinéticos dos principais transportadores endógenos de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) envolvidos no transporte de xilose.** Adaptado de Moyses et al. 2016

Transportador	Linhagem/ Construção plasmidial	Glicose		Xilose		Referência
		Km (mM)	Vmax (nmol .min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	Km (mM)	Vmax (nmol .min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	
<b>ScHxt1</b>	H2219/pYX212-HXT1	NR	NR	880 ± 8	750 ± 94	Saloheimo <i>et al.</i> 2007
<b>ScHxt4</b>	H2219/pYX212-HXT4	NR	NR	170 ± 120	190 ± 23	Saloheimo <i>et al.</i> 2007
<b>ScHxt7</b>	EBY.VW4000/pRS62N-HXT	0.5 ± 0.1	26 ± 1.1	200.3 ± 13.2	67 ± 2	Farwick <i>et al.</i> 2014
<b>ScHxt7 (N370S)</b>	EBY.VW4000/pRS62N- HXT7-N370S	10.8 ± 1.0	47.3 ± 1.2	169.9 ± 26.3	24.1 ± 1.6	Farwick <i>et al.</i> 2014
<b>ScHxt11</b>	DS68625/pRS313-HXT11	33.4 ± 2.1	156.4 ± 7.6	84.2 ± 10.0	84.6 ± 2.4	Shin <i>et al.</i> 2015
<b>ScHxt11 (N366T)</b>	DS68625/pRS313-HXT11- N366T	194.4 ± 47.9	238.6 ± 7.4	46.7 ± 2.7	76.2 ± 4.8	Shin <i>et al.</i> 2015
<b>ScGal2</b>	EBY.VW4000/pRS62N-GAL2	1.5 ± 0.2	27.2 ± 0.9	225.6 ± 115.8	91.3 ± 3.2	Farwick <i>et al.</i> 2014
<b>ScGal2 (N376F)</b>	EBY.VW4000/pRS62N- GAL2-N376F	ND	ND	91.4 ± 8.9	37.3 ± 1.3	Young <i>et al.</i> 2013

Essa disparidade entre afinidades faz com que, em meios contendo os dois açúcares, a levedura comece a consumir xilose apenas quando a glicose está praticamente esgotada do meio. O consumo em duas fases é denominado como consumo diáuxico (Aduse-Opoku & Mitchell 1988, Kuyper *et al.* 2005). Essa inibição competitiva do consumo de xilose na presença de glicose é indesejada em processos industriais, uma vez que contribui para a diminuição da produtividade e eficiência na formação de produtos (Apel *et al.* 2016).

A fim de abordar essa questão, diversas estratégias foram utilizadas a fim de permitir um consumo eficiente de xilose por *S. cerevisiae*. Entre elas, destacam-se a otimização de transportadores endógenos para o transporte de xilose, utilizando-se de métodos de evolução adaptativa e alterações mutagênicas (Apel *et al.* 2016). Entre os casos de melhor sucesso, foram realizadas alterações mutagênicas de aminoácidos nos transportadores Hxt7 e Gal2, resultando na diminuição da inibição do transporte de xilose na presença de glicose (Farwick *et al.* 2014). Estudos envolvendo transportadores endógenos de *S. cerevisiae* também revelaram a capacidade de alguns transportadores críticos, como Hxt11, de promover o crescimento dessa levedura na presença de xilose (Shin *et al.* 2011). Outras estratégias mais ousadas, como a criação de uma proteína quimérica composta pela porção N-terminal de Hxt3 e C-terminal de Hxt6 também permitiu, juntamente com a inserção de uma via de catabolismo de xilose, o crescimento de *S. cerevisiae* nessa pentose (Nijland *et al.* 2014).

Algo em comum nesses trabalhos foi a observação que a asparagina na posição 370 de Hxt7 é um resíduo conservado em diferentes transportadores, e que sua mutação geralmente é responsável por alterações de seus parâmetros cinéticos, favorecendo o transporte de xilose, enquanto a afinidade por glicose diminui. Isso indica uma importância nessa região para o transporte desses açúcares, abrindo ainda mais o leque de estudos a serem feitos a partir de transportadores já nativos de *S. cerevisiae* (Tabela 2) (Young *et al.* 2013, Farwick *et al.* 2014, Shin *et al.* 2015).

## 1.9 TRANSPORTADORES DE XILOSE EM OUTROS ORGANISMOS

Outra estratégia é a expressão de transportadores heterólogos. Alguns organismos como *S. stipitis*, *Candida intermedia*, *Arabidopsis thaliana*, entre outros, utilizam naturalmente a xilose. Entre essas espécies, algumas realizam o transporte por meio de difusão facilitada e outras por simporte (Moyses et al. 2016, Sharma et al. 2018).

A difusão facilitada, realizada pelos Hxt, é um tipo de transporte passivo, no qual uma molécula atravessa uma membrana de acordo com um gradiente de concentração, sem a utilização de energia (Reinfenberger et al. 1997, Alberts et al. 2010). Por outro lado, o simporte é um tipo de transporte ativo no qual uma molécula é transportada contra um gradiente de concentração utilizando energia (Alberts et al. 2010). Os transportadores de açúcar do tipo simporte são considerados transportadores ativos secundários, no qual a energia utilizada não advém do ATP, e sim do gradiente eletroquímico gerado pelos íons H<sup>+</sup> no interior e exterior da célula (Ramos et al. 1976, Alberts et al. 2010, Iancu et al. 2013).

Tendo em vista a habilidade em transportar xilose, diversos estudos foram direcionados para o isolamento de genes codificantes para transportadores de xilose em outras espécies e posterior expressão em *S. cerevisiae*. Entre os diversos transportadores heterólogos expressos em *S. cerevisiae*, alguns merecem ser destacados. Entre eles, os transportadores An25, de *Neurospora crassa*, e Xyp29, de *S. stipitis* foram os únicos facilitadores com atividade exclusiva para xilose ( $K_m = 175.7 \pm 21.4$  e  $56 \pm 9.4$ , respectivamente) (Du et al. 2010). O transportador Xut1, também nativo de *S. stipitis*, merece destaque, uma vez que foi capaz de transportar xilose com uma afinidade e velocidade maior de reação do que para o transporte de glicose (Ferreira et al. 2013).

## 1.10 CRIAÇÃO DA LINHAGEM EBY.VW4000

Para a realização de estudos de transportadores, o desenvolvimento de linhagens específicas, sem os transportadores nativos de *S. cerevisiae* foi uma etapa essencial. Isso é vantajoso por permitir uma análise individual dos transportadores, esclarecendo suas atividades cinéticas e seus efeitos fisiológicos nessa levedura (Solis-Escalante *et al.* 2015).

Nesse contexto, a linhagem EBY.VW4000 é considerada uma das mais populares, sendo a base de muitos estudos envolvendo o transporte de açúcares nessa levedura. Esta linhagem foi obtida a partir da linhagem laboratorial CEN.PK2-1C, na qual a deleção dos 18 transportadores de hexose (Hxt 1-17 e Gal2), bem como de outros 3 transportadores foi responsável por abolir completamente o crescimento dessa levedura em glicose, frutose, galactose ou manose (Wieczorke *et al.* 1999). O crescimento em maltose não foi afetado por essas deleções, possibilitando a utilização desse açúcar pela levedura. Ela apresenta marcas de seleção auxotróficas para histidina, leucina, triptofano e uracila, possibilitando a utilização de múltiplos plasmídeo (Wieczorke *et al.* 1999).

No entanto, apesar de ser essencial na análise funcional e cinética de novos transportadores, as muitas deleções realizadas implicaram em grandes alterações no genoma dessa levedura (Solis-Escalante *et al.* 2015). Desse modo, essa linhagem não é capaz de apresentar alta capacidade e eficiência fermentativa, fazendo com que os transportadores sejam inseridos em linhagens mais robustas a fim de analisar seu efeito em condições fermentativas mais severas.

Apesar desses esforços, ainda não foi encontrado um transportador capaz de realizar o transporte de xilose a níveis que permitam a cofermentação com glicose de forma eficiente, ou seja, com cinéticas semelhantes para ambos os açúcares.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Melhorar geneticamente linhagens de *S. cerevisiae* para eficiente cofermentação de glicose e xilose por meio da expressão de novos transportadores.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar e caracterizar novos transportadores de açúcar.
- Analisar o perfil fermentativo de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* expressando novos transportadores na presença de glicose e/ou xilose.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MEIOS DE CULTURA E TAMPÕES

##### Tampão de Eletroforese SB 20X

8 g de NaOH

45 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, para um pH 8.0

Completar com dH<sub>2</sub>O para um volume total de 1 L

##### Tampão Hidrogenoftalato de Potássio (5X)

25,5 g de Hidrogenoftalato de potássio

5,5 g de KOH

pH ajustado para 5,5

Completar com dH<sub>2</sub>O para 500 mL

Esterilizado por autoclave

##### LB

1% Cloreto de Sódio

0,5% Extrato de Levedura

1% Peptona

pH 7,2 (ajustado com NaOH)

2% Ágar Bacteriológico em caso de meio sólido

Suplementação com 100 ug/mL de ampicilina quando necessário

Esterilizado por autoclave

##### YPM

1% Extrato de Levedura

2% Peptona

2% Maltose

pH: 7,2

2% Ágar Bacteriológico em caso de meio sólido

##### YNB 10X

1,7% YNB (Sigma-Aldrich®) sem sulfato de amônia e sem aminoácidos

5% Sulfato de Amônia  
Esterilizado por autoclave

YNBGHU

YNB 1X

2% Glicose

Histidina 100 mg.L<sup>-1</sup>

Uracila 100 mg.L<sup>-1</sup>

YNBMH

YNB 1X

2% Maltose

Histidina 100 mg.L<sup>-1</sup>

YNBMHU

YNB 1X

2% Maltose

Histidina 100 mg.L<sup>-1</sup>

Uracila 100 mg.L<sup>-1</sup>

HISTIDINA E URACILA

Utilizados em concentração final 100 mg.L<sup>-1</sup>

Esterilizados por filtro de 0,2 µm

SOLUÇÃO ESTOQUE DE AÇÚCAR (200 g.L<sup>-1</sup>) (MALTOSE, GLICOSE, XILOSE, SACAROSE, FRUTOSE)

Maltose, Glicose, Xilose, Sacarose e Frutose

60 g de açúcar

Completar para 300 mL de dH<sub>2</sub>O

Esterilizado por autoclave

### 3.2 LINHAGENS

As linhagens de microrganismos utilizadas nesse trabalho estão listadas na Tabela 3. A linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* EBY.VW4000 foi utilizada como organismo base para as outras linhagens construídas (Wieczorke *et al.* 1999). Essa linhagem não apresenta os principais transportadores de hexose (Hxt 1-16 e Gal2), sendo incapaz de crescer em qualquer fonte de açúcar, senão maltose. Ademais, EBY.VW4000 apresenta 4 marcas de seleção auxotrófica: histidina, leucina, triptofano e uracila.

Para os fins de clonagem e amplificação de plasmídeos construídos, a linhagem de bactéria utilizada foi a linhagem de *Escherichia coli* DH10B.

**Tabela 3. Linhagens de leveduras utilizados nesse trabalho.**

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Referência</b>
<b>EBY.VW4000</b>	CEN.PK2-1C hxt13::loxP hxt15::loxPhxt16::loxP hxt14::loxP hxt12::loxP hxt9::loxP hxt11::loxP hxt10::loxP hxt8::loxP hxt4-1-5::loxP hxt2::loxP hxt3-6-7::loxP gal2::(ura3/FOA)stl1::loxP agt1::loxP mph2(ydl247w)::loxP mph3(yjr160c)::loxP	Wieczorke <i>et al.</i> 1999
<b>EBY – Hxt11</b>	EBY.VW4000; p424-GPD, p425-GPD- Hxt11	Este trabalho
<b>EBY – Canta</b>	EBY.VW4000; p424-GPD, p425-GPD- Canta	Este trabalho
<b>EBY – Saico</b>	EBY.VW4000; p424-GPD, p425-GPD- Saico	Este trabalho
<b>EBY – Torde</b>	EBY.VW4000; p424-GPD, p425-GPD- Torde	Este trabalho
<b>EBY – p425Ø</b>	EBY.VW4000; p424-GPD, p425-GPD	Este trabalho
<b>EBY – XIXK – Saico</b>	EBY.VW4000; p424-GPD-XI, p425-GPD- Saico, p426-TEF-XK	Este trabalho
<b>EBY – XIXK – p425Ø</b>	EBY.VW4000; p424-XI, p425, p426-TEF- XK	Este trabalho

### 3.3 SELEÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA POSSÍVEIS TRANSPORTADORES

Para seleção dos genes utilizados nesse trabalho, foi feita uma análise filogenética utilizando como transportador de referência o transportador Hxt11 de *S. cerevisiae* (Código JGI: 5480|Sacce1) (Shin *et al.* 2015). Sessenta e duas sequências de 28 diferentes organismos, sobretudo fungos, foram recuperadas por análises de similaridade com Hxt11. Essas análises foram conduzidas utilizando o modelo de correção Poisson. Foi então construída uma árvore filogenética por meio de alinhamento no programa MAFFT (Nakamura *et al.* 2018) e construção por meio do software fasttree (Price *et al.* 2009).

Também foi construída uma matriz de similaridade utilizando o software MegaX (Kumar *et al.* 2018), na qual sequências com maior homologia são mais próximas a 0 e sequências com menor homologia são mais próximas a 1.

Em seguida, foram realizadas análises de alinhamento entre as sequências proteicas estudadas utilizando o software PRALINE (Heringa 1999). Esse alinhamento permitiu a identificação de aminoácidos correspondentes à asparagina na posição 366 de Hxt11. Para a síntese comercial dos genes, todos os transportadores tiveram essa asparagina mutada para uma treonina. O programa PRALINE também foi utilizado para uma predição dos domínios transmembrana e estrutura secundária dos transportadores analisados (Krebs & Dander 1983, Jones 1999, Kall *et al.* 2005).

### 3.4 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

Os vetores utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 4.

Os genes de transportadores foram sintetizados por empresa privada (GenOne Biotechnologies) e clonados em plasmídeo de expressão de *Komagataella phaffii*, pGAPZB.

Para expressão em *S. cerevisiae*, os genes foram clonados em plasmídeo episomal de expressão p425, controlado pelo promotor constitutivo GPD e terminador CYC1 (Mumberg *et al.* 1995). Esse plasmídeo é caracterizado por apresentar a marca de seleção auxotrófica *TRP1*, responsável por restaurar a síntese de triptofano a organismos auxotróficos

para essa marca. O plasmídeo também apresenta a marca de resistência a ampicilina, permitindo *E. coli* crescer na presença desse antibiótico.

As restrições dos genes dos transportadores, bem como a linearização do plasmídeo p425-GPD foram feitas com as enzimas PstI e BamHI.

Foram utilizadas enzimas *Fast Digest Restriction Enzyme* (Thermo Scientific) e os protocolos foram realizados de acordo com o manual do fabricante (Tabela 5). Os fragmentos da reação de restrição foram analisados por eletroforese, utilizando gel de agarose 0,8% (m/v), tampão SB 1X e 90 V. Para análise dos géis eletroforéticos, foi utilizado o marcador molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

Em seguida, os fragmentos de interesse foram purificados por meio do kit Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction Kit. Após purificados, os fragmentos foram ligados por meio de enzima T4 DNA Ligase 5 Weiss U/μL (Thermo Scientific), também seguindo o protocolo descrito no manual do fabricante (Tabela 6), e transformados em *Escherichia coli* para amplificação dos plasmídeos.

**Tabela 4. Vetores utilizados nesse trabalho**

Plasmídeo	Descrição	Referência
<b>p424 – GPD</b>	P <sub>GPD-T<sub>CYC</sub></sub> , ampR, <i>TRP1</i> , 2 μ origin	Mumberg <i>et al.</i> 1995
<b>p425 – GPD</b>	P <sub>GPD-T<sub>CYC</sub></sub> , ampR, <i>LEU2</i> , 2 μ origin	Mumberg <i>et al.</i> 1995
<b>p424 – XI</b>	P <sub>GPD-XI<i>Piromyces</i>-T<sub>CYC</sub></sub> , ampR, <i>TRP1</i> , 2 μ origin	Paes 2015
<b>p426 – XK</b>	P <sub>TEF-XK<i>Saccharomyces</i>-T<sub>CYC</sub></sub> , ampR, <i>URA3</i> , 2 μ origin	Paes 2015

**Tabela 5. Protocolo para digestão plasmidial.**

Componente	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água Milli-Q	14
10X Tampão Fast Digest	2
DNA Plasmidial (até 1 $\mu\text{g}$ )	2
Enzima FastDigest	1
Volume final	20

**Tabela 6. Protocolo para reação de ligação.**

Componente	Quantidade
Vetor Linearizado	100 ng
Inserto	3 : 1 (inserto : vetor)
T4 DNA Ligase 5 Weiss U/ $\mu\text{L}$ (Thermo Scientific)	1 Weiss U
ddH <sub>2</sub> O	Para volume total = 20 $\mu\text{L}$

### 3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A transformação bacteriana foi realizada utilizando protocolo padrão de biologia molecular (Maranhão 2016). Foram utilizadas bactérias *E. coli* da linhagem DH10B eletrocompetentes. Foram adicionados 100 - 200 ng do plasmídeo ou da reação de ligação, as células foram incubadas em gelo por 5 minutos, transferidas para cubetas de eletroporação e foi aplicado um pulso de 1800 V. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de meio LB, a suspensão foi passada para um microtubo de 1,5 mL e incubado a 37°C por 1 hora. Passado o tempo de incubação, as células foram plaqueadas em meio LB com o antibiótico apropriado e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

### 3.6 EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Após o processo de transformação, os plasmídeos foram extraídos de *E. coli* por meio de minipreparação. Foi utilizado o kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit, da empresa Thermo Scientific, seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.7 TRANSFORMAÇÃO DE *S. CEREVISIAE*

As transformações de levedura nesse trabalho foram realizadas por choque térmico. O protocolo utilizado foi adaptado de Gietz & Schiestl (2007). Foi feito um pré-inóculo de *S. cerevisiae* em 5 mL de meio YPM, que foi incubado overnight a 28°C e 200 rpm. No dia seguinte, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 50 mL de YPM. As células foram crescidas por 3 gerações para alcançarem a densidade celular desejada. Após centrifugação a 4000 g por 5 minutos, as células foram ressuspensas em água estéril e alíquotas de 1 mL foram feitas em tubos Eppendorf de 1,5 mL. As alíquotas foram centrifugadas à velocidade máxima em centrífuga de bancada, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de LiAc 100 mM e incubado a 30°C por 15 minutos. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada, o sobrenadante retirado e foram adicionados, nessa ordem: 240 µL de PEG (50% p/v), 36 µL de LiAc 1 M, 52 µL de ssDNA 2 mg/mL, 30 µL de água Milli-Q e 400-700 ng de DNA a ser utilizado. Após a adição dos reagentes, a suspensão foi vortexada vigorosamente, incubada a 30°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de 20 minutos a 42°C. Em seguida, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspendido em água estéril e incubado a 30°C por 2 horas. As células foram então plaqueadas em meio de seleção adequado.

### 3.8 VERIFICAÇÃO DOS TRANSFORMANTES POR PCR DE COLÔNIA

A seleção de transformantes foi feita por meio de seleção auxotrófica no caso de leveduras ou pela resistência a antibiótico, para a seleção de bactérias. Também foram realizadas reações de PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase) de colônia. Para bactérias, uma colônia foi inoculada diretamente no tubo de reação de PCR e as etapas de desnaturação foram feitas a 98°C. Para leveduras, as colônias foram inoculadas inicialmente em 10 µL de NaOH 0,02 M em tubo de PCR incubados a 99°C por 10 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 2 minutos em centrífuga de bancada. Foram utilizados 2 µL dos sobrenadantes como DNA molde. Os oligonucleotídeos e condições utilizadas estão especificados nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7. Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.**

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Descrição	Referência
p423-F	caccagaacttagtt tcgac	Amplificação do promotor GPD a partir de sua região 3'	Paes 2015
p423-R	gcgtgaatgtaagc gtgac	Amplificação do terminador CYC a partir de sua região 5'	Paes 2015
SpeI - <i>xyIA</i> – F	gtggccca gccggc caaaatgg ctaaggaatatttc	Amplificação do gene <i>XyIA</i> a partir de sua região 3'	Kuyper <i>et al.</i> 2003
Sal - <i>xyIA</i> –R	aatctagatattg gtacatggcaacaatag	Amplificação do gene <i>XyIA</i> a partir de sua região 5'	Kuyper <i>et al.</i> 2003
SpeI 5'- <i>XKS1</i> -F	gactagtatgt tgtgttcagtaattcag	Amplificação do gene <i>XKS1</i> a partir de sua região 3'	Kuyper <i>et al.</i> 2005
3' <i>XKS1</i> - SalI-R	tcagtcgac atcttagatgagagtctttcc	Amplificação do gene <i>XKS1</i> a partir de sua região 5'	Kuyper <i>et al.</i> 2005

**Tabela 8. Reagentes utilizados no preparo de uma reação de PCR.**

Reagente	Volume ( $\mu\text{L}$ )
5X GoTaq Reaction Buffer	5
dNTPs 10mM	1
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3
Primer Forward 10 $\mu\text{M}$	1
Primer Reverse 10 $\mu\text{M}$	1
Enzima GoTaq (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Promega)	0,125
DNA Molde	2
Água	11,875
Total	25

### 3.9 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LINHAGENS RECOMBINANTES

#### 3.9.1 Teste de crescimento em placas contendo diferentes fontes de carbono

A partir de células recém-plaqueadas, as leveduras foram crescidas em 5 mL de meio YNBMHU por 24 horas. Foram feitas duas lavagens e as células foram ressuspensas em água para a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  final ser igual a 2. Foram feitas diluições seriadas de 10, 100 e 1000x. Dessas diluições, foram plaqueados 20  $\mu\text{L}$  em placas contendo os meios sólidos desejados: YNB suplementado com histidina e uracila, contendo como fonte de carbono 20  $\text{g.L}^{-1}$  de maltose, ou de frutose, ou de glicose, ou de sacarose, ou 40  $\text{g.L}^{-1}$  de xilose. As placas foram mantidas em estufa a 28°C. Após 7 dias de crescimento, as placas foram analisadas por contador de colônia automático Scan® 1200 (Interscience™) e fotografadas utilizando o software Scan®, da mesma marca.

#### 3.9.2 Acúmulo de xilose intracelular

As leveduras foram recuperadas a partir de estoque de glicerol mantido a -80°C e plaqueadas em meio sólido YNB contendo 2% de maltose e 100

$\mu\text{g.L}^{-1}$  de histidina e uracila (YNBMHU). Nesse momento foram utilizadas as leveduras EBY-Transportador, nas quais os plasmídeos inseridos conferem a habilidade de produzir triptofano e uracila, suprimindo as necessidades auxotróficas da linhagem. As placas foram incubadas em estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. Então, foram feitos pré-inóculos em 5 mL de meio YNBMHU e incubados a  $28^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm por 48 horas. Os inóculos foram transferidos para 50 mL do mesmo meio. Após 24 horas de crescimento nas mesmas condições, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água destilada estéril e inoculadas em 50 mL de meio YNB + Xilose ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) + Histidina + Uracila em Erlenmeyer de 125 mL. As células foram crescidas a  $28^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm, sendo retiradas alíquotas de 5 mL nos tempos: 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 24 horas após o inóculo. As alíquotas foram lavadas duas vezes em água destilada, ressuspensas em água deionizada e mantidas em shaker a  $37^{\circ}\text{C}$  e 250 rpm durante 48 horas. A concentração celular durante o experimento foi de aproximadamente  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Os sobrenadantes das suspensões celulares foram analisados em HPLC. Xilose e xilitol foram medidos para a análise do açúcar acumulado intracelularmente. (Hector *et al.* 2008, Du *et al.* 2010, Wang *et al.* 2015a)

### 3.9.3 Curva de crescimento em glicose

Para teste de crescimento em glicose como única fonte de carbono, as linhagens testadas foram recuperadas de estoque a  $-80^{\circ}\text{C}$  e plaqueadas em meio YNB + Maltose + His + Ura e crescidas por 48 horas em estufa a  $28^{\circ}\text{C}$ . Foi então feito um pré-inóculo em 10 mL de meio YNBMHU, crescido por 48 horas em shaker a  $28^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm. As células foram então lavadas duas vezes e transferidas para 50 mL de meio YNB + Glicose ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) + His + Ura (YNBGHU) em frascos Erlenmeyer de 125 mL e foram incubados em shaker a  $28^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm. A cada 24 horas de experimento foram retiradas alíquotas para determinação de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  e metabólitos.

### 3.9.4 Fermentações com alta densidade celular

Nessa etapa, foram utilizadas as linhagens EBY-XIXK-Saico e EBY-XIXK-p425Ø, as quais carregam três plasmídeos, necessitando apenas a suplementação com histidina. As linhagens foram inoculadas em 10 mL de meio YNBMH em tubo Falcon de 50 mL e incubadas em shaker a 200 rpm e 28°C por 24 horas. As células foram então transferidas para 250 mL do mesmo meio de crescimento em Erlenmeyer aletado de 1 L. Após 48 horas de crescimento, as células foram lavadas duas vezes, as densidades celulares foram uniformizadas, buscando-se trabalhar com  $DO_{600nm} = 15$  (6,6 g.L<sup>-1</sup> de células). As células foram então inoculadas em 50 mL de meio YNB, suplementado com histidina e xilose e/ou glicose, em frascos de 125 mL. Foram realizadas fermentações e cofermentações com diferentes quantidades de açúcares, conforme descrito na Tabela 9.

**Tabela 9. Quantidades de xilose e glicose utilizadas nas fermentações com alta densidade celular.**

<b>Tipo de Fermentação</b>	<b>Xilose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Cofermentação</b>	5	5
	20	20
	20	10
	30	15
<b>Fermentação</b>	10	0
	15	0

As fermentações foram realizadas em triplicata a 28°C e 200 rpm.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR

A metodologia a seguir foi adaptada de Knychala 2017.

Para determinação da biomassa celular da linhagem de *S. cerevisiae* utilizada nesse trabalho, foi realizado um pré-inóculo em 10 mL de meio YPM, crescido a 28°C e 200 rpm por 24 horas. As células foram então inoculadas em 100 mL do mesmo meio em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Após 24 horas de

crescimento, a  $DO_{600nm}$  foi medida. Volumes de 5, 10 e 15 mL, em duplicata, foram filtrados em membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu m$  por meio de bomba à vácuo. As membranas foram pesadas antes da filtração das células. Após duas lavagens com água destilada, as membranas foram secadas em estufa a 55°C por 72 horas. Dessa maneira foi possível obter o peso seco das células em  $g.L^{-1}$  ( $X_{g.L^{-1}}$ ) e o Fator de Conversão (FC) a ser utilizado nos experimentos (Equações 1 e 2).

$$(1) X_{g.L^{-1}} = [(m_{mc} - m_m) / V] \cdot 1000$$

$X_{g.L^{-1}}$  = Peso seco das células em  $g.L^{-1}$ ;

$m_{mc}$  = massa da membrana com células filtradas, em gramas;

$m_m$  = peso da membrana antes da filtragem, em gramas;

V = Volume filtrado em mL

$$(2) FC = X_{g.L^{-1}} / DO_{600nm}$$

FC = Fator de conversão de  $DO_{600nm}$  para massa seca em  $g.L^{-1}$ ;

$DO_{600nm}$  = Absorbância medida a 600 nm;

Logo, para os próximos experimentos, a absorbância das amostras foi medida a 600 nm, e então esse valor foi multiplicado pelo FC, obtendo-se assim a biomassa celular (Equação 3).

$$(3) B_{celular} = Abs_{600nm} \cdot FC$$

$B_{celular}$  = Biomassa celular, em  $g.L^{-1}$

$Abs_{600nm}$  = Absorbância da amostra a 600 nm.

### 3.11 ANÁLISE DE METABÓLITOS

Os metabólitos foram analisados por método HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Foram retiradas alíquotas de 1 mL dos experimentos realizados. Duzentos e cinquenta microlitros dessas alíquotas foram diluídos em 750  $\mu L$  de água deionizada, para uma diluição final de 4 vezes. As amostras foram analisadas em sistema HPLC para os metabólitos:

etanol, glicerol, glicose, xilose e xilitol. O equipamento usado foi o Acquity HPLC H Class Waters, equipado com coluna Aminex® HPX-87H (empresa Bio-Rad) mantida a 45°C durante a o processo de análise. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0,6 mL/minuto.

### 3.12 CONSTRUÇÃO DE MODELOS TRIDIMENSIONAIS

Os modelos tridimensionais dos transportadores foram construídos pelo portal RaptorX, utilizando a opção: RaptorX Structure Prediction (Peng & Xu 2011, Wang *et al.* 2012, Ma *et al.* 2013). As estruturas foram visualizadas e editadas por meio da utilização do software PyMol (Schrödinger©),

## 4 RESULTADOS

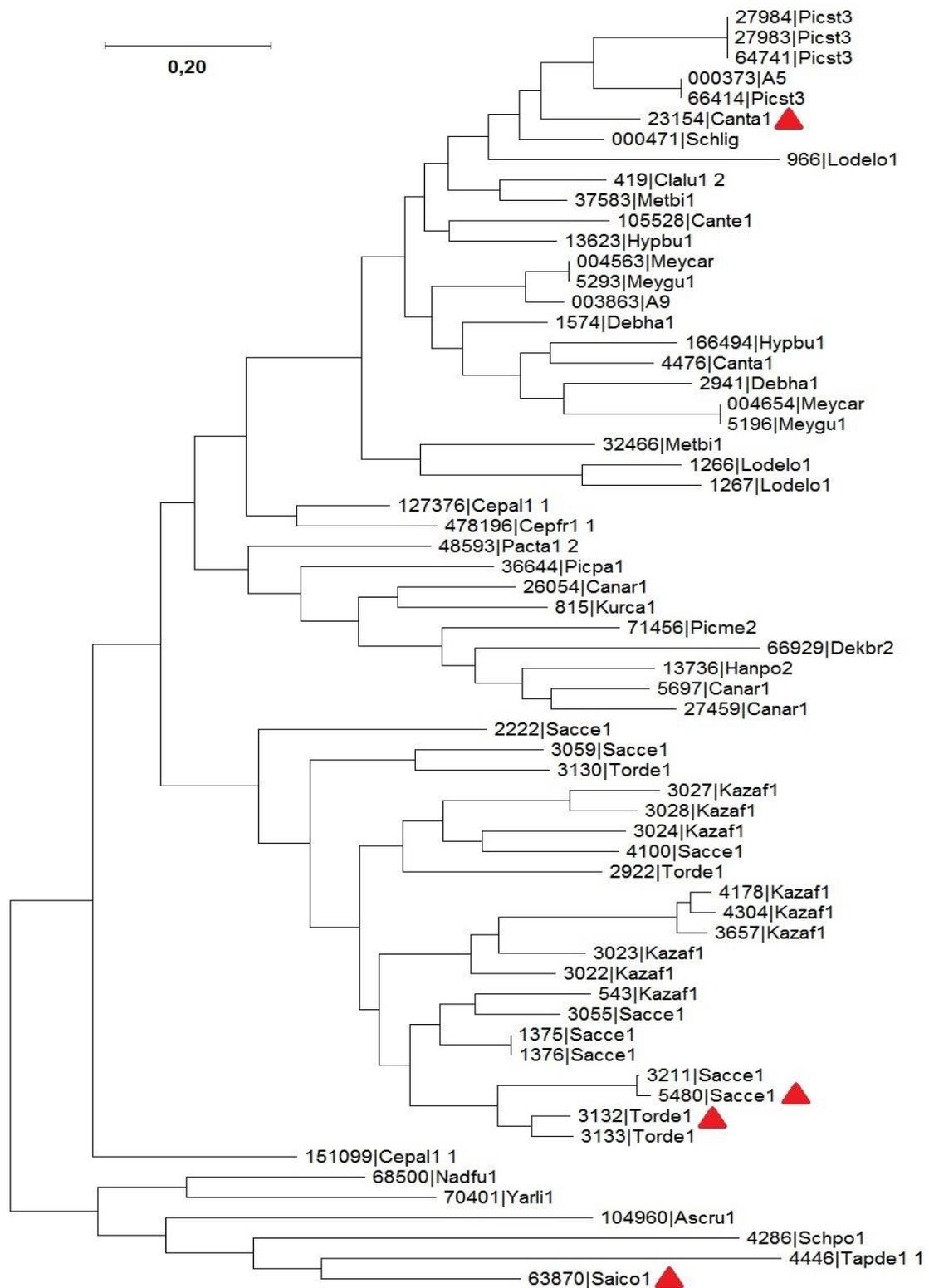
### 4.1 SELEÇÃO DOS GENES PUTATIVOS CODIFICANTES PARA TRANSPORTADORES

A fim de se escolher novos transportadores que permitam o transporte de xilose por *S. cerevisiae*, foram selecionados novos genes putativos a partir de uma análise de similaridade em banco de dados. Para isso, o transportador Hxt11 (Shin *et al.* 2011) foi utilizado como base para a identificação de genes semelhantes em fungos de interesse (Figura 7). Essa escolha foi baseada na associação desse transportador a uma maior afinidade por xilose do que por glicose, indicando seu potencial para a utilização no aproveitamento de hidrolisados lignocelulósicos, por meio de cofermentação dos açúcares (Shin *et al.* 2011).

A partir da árvore filogenética e matriz de distância construídas, foram escolhidos 3 genes putativos: um gene com homologia alta, um com homologia intermediária e um com baixa homologia em relação a Hxt11. Foram então escolhidos os transportadores: 132|Torde1, oriundo de *Torulaspota delbrueckii*, com alta homologia a Hxt11 (0,15 substituições por sítio), 23154|Canta1, pertencente a *Candida tanzawensis* de homologia intermediária (0,47 substituições por sítio) e 63870|Saico1, de *Saitoella complicata* e que apresenta baixa homologia ao gene de referência (0,74 substituições por sítio) (Figura 7) (Tabela 10) (Tabela 11).

**Tabela 10. Estimativas de divergência evolutiva entre as proteínas utilizadas nesse trabalho.** Na matriz estão retratados o número de substituições de aminoácidos por sítio.

	Hxt11	Torde	Canta	Saico
Hxt11				
Torde	0,15			
Canta	0,47	0,43		
Saico	0,74	0,74	0,75	



**Figura 7. Árvore filogenética com os 63 genes codificantes para transportadores de membrana prospectados nesse trabalho.** A árvore foi construída por meio de alinhamento em programa MAFFT e construída pelo software Fasttree (Nakamura *et al.* 2018; Price *et al.* 2009). Os triângulos vermelhos representam os genes utilizados nesse trabalho.

**Tabela 11. Genes que codificam para transportadores selecionados nesse trabalho.**

<b>Gene</b>	<b>Organismo de origem</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Mutação</b>	<b>NCBI Reference Sequence</b>
<i>HXT11</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida</i>	1727	N366T	NP_014486.1
<i>CANTA1</i>	<i>tanzawensis</i> ( <i>Suhomyces tanzawensis</i> )	1679	N354T	XP_020063167.1
<i>SAICO1</i>	<i>Saitoella complicata</i>	1502	N315T	XP_019026310.1
<i>TORDE1</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1727	N365T	XP_003681684.1

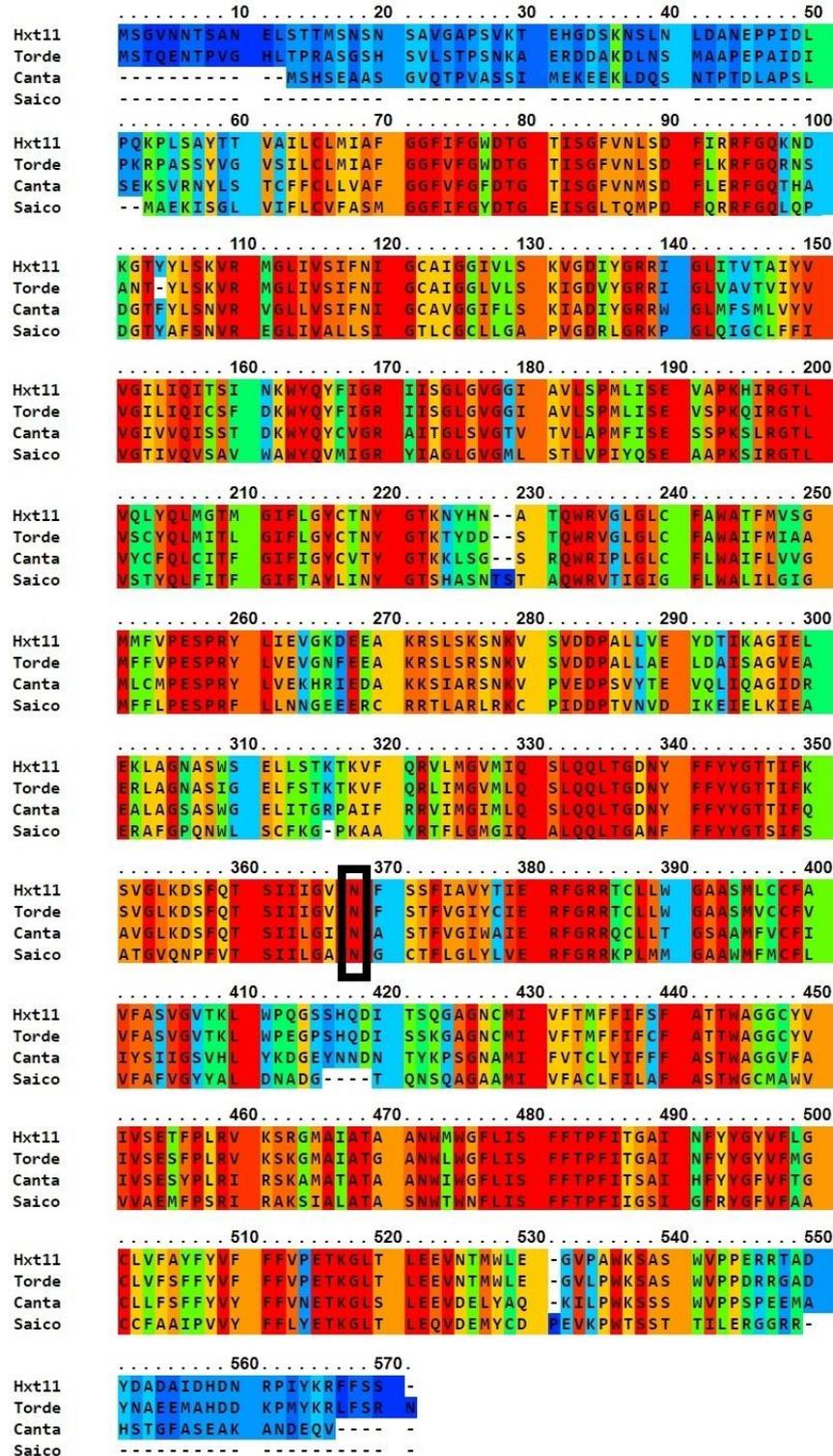
Foi demonstrado que uma mutação na treonina de posição 366 é responsável por alterar a cinética e afinidade do transportador Hxt11, aumentando a afinidade por xilose enquanto a afinidade por glicose diminuiu significativamente (Shin *et al.* 2011). Sendo assim, para identificar se este resíduo de aminoácido se encontrava conservado nas sequências selecionadas, por meio do software PRALINE, foi realizado um alinhamento entre as quatro sequências dos transportadores a serem trabalhados (Figura 8).

Segundo o alinhamento, em todas as posições correlatas à posição 366 de Hxt11 se localizava uma asparagina. Logo, todas as sequências sintetizados para esse trabalho tiveram a asparagina mutada para uma treonina, resultando em: 23154|Canta1 Mutação: N354T; 63870|Saico1 Mutação: N315T; 5480|Sacce1 Mutação: N366T; 3132|Torde1 Mutação: N365T (Figura 8) (Tabela 11).

A partir desse alinhamento também foi possível observar o grau de similaridade entre as sequências de aminoácidos dos transportadores. Assim como a árvore e a matriz de distância indicaram, as proteínas Hxt11 e Torde são bastante similares, enquanto o transportador Canta apresenta menor similaridade entre os dois anteriores. Saico por sua vez é bastante diferente

das outras três proteínas (Figura 8). O alinhamento revelou, em porcentagem, as similaridades entre as sequências de aminoácidos prospectadas em relação a Hxt11, sendo elas: Torde: 78,98%; Canta: 55,58%; Saico: 46,42%. Esses resultados vão de acordo com as diferenças observadas na matriz de distância construída (Tabela 10).

Em geral, as regiões N e C terminal são as porções menos conservadas entre as proteínas (Figura 8).



**Figura 8. Alinhamento das sequências de transportadores selecionados nesse trabalho.** O alinhamento foi realizado pelo software PRALINE (Heringa 1999). Em destaque (caixa preta) estão os aminoácidos referentes à asparagina na posição 366 de Hxt11, os quais foram mutados para uma treonina nos genes sintetizados. Azul escuro: menos conservado (0); Verde: intermediário (5); Vermelho: mais conservado (10).

A partir da utilização do software PRALINE, também foi feita uma predição dos segmentos transmembrana dos transportadores estudados (Figura 9) (Kall *et al.* 2005). Foi observado que as 4 proteínas são compostas por 12 domínios transmembrana, sendo que as regiões correspondentes a esses domínios apresentam um grau de conservação relativamente alto (Figura 9). Em média, os segmentos transmembrana observados são compostos por 20 aminoácidos. É importante notar uma clara divisão entre os domínios N (composto pelos TMs 1 a 6) e C (TMs 7 a 12). Esses dois domínios são separados por uma região de 68 resíduos de aminoácidos, formadores do domínio ICH.

Também foi feita uma predição da estrutura secundária das proteínas. Assim como o esperado, a maior parte dessa região é formada por longas hélices, que vão formar uma estrutura tubular, pela qual passarão as moléculas transportadas. Também fica visível a presença de 4 hélices entre os dois domínios (Figura 10).

Acerca da estrutura geral da proteína, nota-se que os aminoácidos que flanqueiam os segmentos transmembrana são, em geral, aminoácidos bastante hidrofílicos como: arginina (R), treonina (T), aspartato (D), glutamina (Q) e ácido glutâmico (E). Isso indica que essas porções marginais provavelmente estão em contato com o citoplasma e matriz extracelular. Enquanto os segmentos transmembrana são caracterizados por aminoácidos mais hidrofóbicos, uma vez que não ficam em contato com o meio aquoso que cercam a membrana celular.

```

..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50
(PRED) Hxt11MSGVNNTSAN ELSTTMSNSN SAVGAPSVKT EHGDSKNSLN LDANEPPIDL
(PRED) TordeMSTQENTPVG HLTPRASGSH SVLSTPSNKA ERDDAKDLNS MAAPEPAIDI
(PRED) Canta----- --MSHSEAAS GVQTPVASSI MEKEEKLDQS NTPTDLAPSL
(PRED) Saico-----

..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
(PRED) Hxt11P[1]VTT VAILCLMIAF GGFIFGDTG TISGFVNLS D FIRRFQKND
(PRED) TordeP[1]YVG VSILCLMIAF GGFVFGDTG TISGFVNLS D FLKRFQQRNS
(PRED) CantaS[1]VLS TCFPCLLVAF GGFVFGDTG TISGFVNMS D FLERFQQTTHA
(PRED) Saico--MAEKISGL VIFLCVFASM GGFIFGDTG EISGLTQMPD FQRRFQQLQP

..... 110 ..... 120 ..... 130 ..... 140 ..... 150
(PRED) Hxt11KGTYYL[2]MGLIVSIFNI GCAIGGIVLS KVG[3]I GLITVTAIYV
(PRED) TordeANT-YL[2]MGLIVSIFNI GCAIGGLVLS KIGI[3]I GLVAVTVIYV
(PRED) CantaDGTFFYL[2]VGLLVSIFNI GCAVGGIFLS KIAI[3]N GLMFSMLVYV
(PRED) SaicoDGTAYAFSNVR EGLIVALLSI GTLCGCLLGA PVGDRLGRKP GLQIGCLFFI

..... 160 ..... 170 ..... 180 ..... 190 ..... 200
(PRED) Hxt11VGLIIQITSI[4]FVIGR IISGLGVGGI AVLSPMLISE VAI[5]TL
(PRED) TordeVGLIIQICSF[4]FVIGR IISGLGVGGI AVLSPMLISE VSI[5]TL
(PRED) CantaVGIVVQISS[4]T[5]CVGR AITGLSVGTV TVLAPMFI[5]SE SSI[5]TL
(PRED) SaicoVGTIVQVSAV WAWYQVMIGR YIAGLGVGML STLVPYQSE AAPKSI[5]RGT[5]L

..... 210 ..... 220 ..... 230 ..... 240 ..... 250
(PRED) Hxt11VQLYQLMGTM GIFLGYCTNY GTKNYHN--A[6]VGLGLC FAWATFMVSG
(PRED) TordeVSCYQLMITL GIFLGYCTNY GTKTYDD--S[6]VGLGLC FAWAIFMIAA
(PRED) CantaVYCFQLCITF GIFIGYCVTY GTKKLSG--S[6]IPLGLC FLWAI[6]FLVVG
(PRED) SaicoVSTYQLFITF GIFTAYLINY GTSHASNTST AQWR[6]TIGIG FLWALI[6]LGIG

..... 260 ..... 270 ..... 280 ..... 290 ..... 300
(PRED) Hxt11MFFVPESPRY LIEVGKDEEA KRSLSKSNKV SVDDPALLVE YDTIKAGIEL
(PRED) TordeMFFVPESPRY LVEVGNFEEA KRSLRSNKV SVDDPALLAE LDAISAGVEA
(PRED) CantaMLCMPESPRY LVEKHRIEDA KKSIA[6]RSNKV PVEDPSVYTE VQLIQAGIDR
(PRED) SaicoMFFLPESPRF LLNNGEEERC RRTLARLRKC PIDDP[6]TVNVD IKEIELKIEA

..... 310 ..... 320 ..... 330 ..... 340 ..... 350
(PRED) Hxt11EKLAGNASWS ELLSTKTK[7]VLMGVMIQ SLQQLTGDNY FFYVGTTFIFK
(PRED) TordeERLAGNASIG ELFSTKTK[7]LIMGVMLQ SLQQLTGDNY FFYVGTTFIFK
(PRED) CantaEALAGSASWG ELITGRPA[7]VIMGIMLQ SLQQLTGDNY FFYVGTTFIFQ
(PRED) SaicoERAFGPQNWL SCFKG-PKAA YR[7]TFLGMGIQ ALQQLTGANF FFYVGT[7]SIFS

..... 360 ..... 370 ..... 380 ..... 390 ..... 400
(PRED) Hxt11S[8]FQT SIIIGVNVFF SSFIAVYTI[9]E CLLW GAASMLCCFA
(PRED) TordeS[8]FQT SIIIGVNVFF STFVGIYCI[9]E CLLW GAASMVCCFV
(PRED) CantaA[8]FQT SIIIGVNVFA STFVGWAI[9]E CLLT GSAAMVCFI
(PRED) SaicoATGVQNP[8]EVT SIIIGAVNFG CTFELGLYLVE RFGRRK[9]PLMM GAAWMFMCFL

..... 410 ..... 420 ..... 430 ..... 440 ..... 450
(PRED) Hxt11VFASVGVTKL WPQGSSHQDI T[10]LMI VFTMFFIFSF ATTWAGGCYV
(PRED) TordeVFASVGVTKL WPEGSPHQDI S[10]LMI VFTMFFIFCF ATTWAGGCYV
(PRED) CantaYSIIIGSVHL YKDG[10]EYNNDN T[10]LMI FVTCLYIFFF ASTWAGGVFA
(PRED) SaicoVFAFVGYVAL DNADG---T QNSQAGA[10]AMI VFACLFILAF ASTWGCMAWV

..... 460 ..... 470 ..... 480 ..... 490 ..... 500
(PRED) Hxt11VSETFPLR[11]GMAIATA ANMMWGFLLIS FFTPFI[12]TG VYGVVFLG
(PRED) TordeVSESFPLR[11]GMAIATG ANNLWGFLLIS FFTPFI[12]TG VYGVVFMG
(PRED) CantaVSESYPLR[11]AMATATA ANNIWGFLLIS FFTPFI[12]TS VYGVVFTG
(PRED) SaicoVVAEMFPSRI RAK[11]SIALATA SNWTWNFLIS FFTPFI[12]IGSI GFRYGFVFAA

..... 510 ..... 520 ..... 530 ..... 540 ..... 550
(PRED) Hxt11CLVFAYFYVF FFV[11]PETKGLT LEEVNTMWLE -GVPAWKSAS WVPPERRTAD
(PRED) TordeCLVFSFFYVF FFV[11]PETKGLT LEEVNTMWLE -GVL[11]PWKSAS WVPPDRRGAD
(PRED) CantaCLLFSFFYVY FFV[11]NETKGLS LEEVDELYAQ -KIL[11]PWKSSS WVPPSPEEMA
(PRED) SaicoCFAAIPVVY FFV[11]YETKGLT LEQVDEMYCD PEVKP[11]WTSST TILERGRR-

..... 560 ..... 570 .....
(PRED) Hxt11YDADAIDHDN RPIYK[11]RFFSS -
(PRED) TordeYNAEEMAHDD KPMYK[11]R[11]FSR N
(PRED) CantaHSTGFASEAK ANDEQV----
(PRED) Saico-----

```

**Figura 9. Predição dos domínios transmembrana dos transportadores utilizados nesse trabalho (Kall et al. 2005). Os aminoácidos destacados em verde são as posições dos segmentos transmembrana, enumerados nas caixas pretas antes de cada segmento. Nota-se que os aminoácidos mutados estão presentes no domínio transmembrana 8 em todos os transportadores analisados.**

```

..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50
(PRED) Hxt11 MSGVNNNTSAN ELSTTMSNSN SAVGAPSVKT EHGDSKNSLN LDANEPPIDL
(PRED) Torde MSTQENTPVG HLTTPRASGSH SVLSTPSNKA ERDDAKDLNS MAAPEPAIDI
(PRED) Canta SEKSVRNYLS TCFCLLVAF GGFVFGFD TG TISGFVNLSD FLEHFGQTHA
(PRED) Saico----- --MSHSEAAS GQTPVASSI MEKEEKLDQS NTPDPLAPSL

..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
(PRED) Hxt11 P Q K P L S A Y T T V A I L C L M I A F G G F I F G W D T G T I S G F V N L S D F I R F F G Q K N D
(PRED) Torde P K R P A S S Y V G V S I L C L M I A F G G F V F G W D T G T I S G F V N L S D F L K R F G Q R N S
(PRED) Canta S E K S V R N Y L S T C F C L L V A F G G F V F G F D T G T I S G F V N M S D F L E H F G Q T H A
(PRED) Saico -- M A E K I S G L V I F L C V F A S M G G F I F G W D T G E I S G L T Q M P D F Q R R F G Q L Q P

..... 110 ..... 120 ..... 130 ..... 140 ..... 150
(PRED) Hxt11 K G T Y Y L S K V R M G L I V S I F N I G C A I G G I V L S K V G D I Y G R R I G L I T V T A I Y V
(PRED) Torde A N T - Y L S K V R M G L I V S I F N I G C A I G G L V L S K I G D V Y G R R I G L V A V T V I Y V
(PRED) Canta D G T F Y L S N V R V G L L V S I F N I G C A V G G I F L S K I A D I Y G R R W G L M F S M L V Y V
(PRED) Saico D G T Y A F S N V R E G L I V A L L S I G T L C G C L L G A P V G D R L G R K P G L Q I G C L F F I

..... 160 ..... 170 ..... 180 ..... 190 ..... 200
(PRED) Hxt11 V G I L I Q I T S I N K W Y Q Y F I G R I I S G L G V G G I A V L S P M L I S E V A P K H I R G T L
(PRED) Torde V G I L I Q I C S F D K W Y Q Y F I G R I I S G L G V G G I A V L S P M L I S E V S P K Q I R G T L
(PRED) Canta V G I V Q I S S T D K W Y Q Y C V G R A I T G L S V G T V T V L A P M F I S E S S P K S L R G T L
(PRED) Saico V G T I V Q V S A V W A W Y Q V M I G R Y I A G L G V G M L S T L V P I Y Q S E A A P K S I R G T L

..... 210 ..... 220 ..... 230 ..... 240 ..... 250
(PRED) Hxt11 V Q L Y Q L N G T M G I F L G Y C T N Y G T K N Y H N -- A T Q W R V G L G L C F A W A T F M V S G
(PRED) Torde V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N Y G T H T Y D D -- S T Q W R V G L G L C F A W A T F M I A A
(PRED) Canta Y Y C F Q L C I T F G I F I G Y C V T Y G T K K L S G -- S R Q W R I P L G L C F L W A I F L V V G
(PRED) Saico V S T Y Q L F I T F G I F T A Y L I N Y G T S H A S N T S T A Q W R V T I G I G F L W A I L L G I G

..... 260 ..... 270 ..... 280 ..... 290 ..... 300
(PRED) Hxt11 H M F V P E S P R Y L I E V G K D E E A K R S L S K S N K V S V D D P A L L V E Y D T I R A G I E L
(PRED) Torde H F F V P E S P R Y L V E V G N F E E A K R S L S R S N K V S V D D P A L L A E L D A I S A G V E A
(PRED) Canta H L C M P E S P R Y L V E K H R I E D A K K S I A R S N K V P V E D P S V Y T E V Q L I Q A G I D R
(PRED) Saico H F F L P E S P R F L L N G E E E R C R R T L A R L K C P I D D P T V N V D I K E I E L K I E A

..... 310 ..... 320 ..... 330 ..... 340 ..... 350
(PRED) Hxt11 E K L A G N A S W S E L L S T K T K V F Q R V L M G V M I Q S L Q Q L G D N Y F F Y Y G T T I F K
(PRED) Torde E R L A G N A S I G E L F S T K T K V F Q R L I M G V M L Q S L Q Q L G D N Y F F Y Y G T T I F K
(PRED) Canta E A L A G S A S W G E L I T G R P A I F R R V I M G I M L Q S L Q Q L G D N Y F F Y Y G T T I F Q
(PRED) Saico E R A F G P Q N W L S C F K G - P K A A Y R T F L G M G I Q A L Q Q L G A N F F F Y Y G T S I F S

..... 360 ..... 370 ..... 380 ..... 390 ..... 400
(PRED) Hxt11 V G L K D S F Q T S I I I G V V N F F S S F I A V Y T I E R F G R R T C L L W G A A S M L C C F A
(PRED) Torde V G L K D S F Q T S I I I G V V N F F S T F V G I Y C I E R F G R R T C L L W G A A S M V C C F V
(PRED) Canta V G L K D S F Q T S I I L G I V N F A S T F V G I W A I E R F G R R Q C L L T G S A A M F V C F I
(PRED) Saico A T G V Q N P F V T S I I L G A V N F G C T F L G L Y L V E R F G R R K P L M M G A A W M F M C F L

..... 410 ..... 420 ..... 430 ..... 440 ..... 450
(PRED) Hxt11 V F A S V G V T K L W P Q G S S H Q D I T S Q S A G N C M I V F T M F F I F S F A T T W A G G C Y V
(PRED) Torde V F A S V G V T K L W P E G P S H Q D I S S K S A G N C M I V F T M F F I F C F A T T W A G G C Y V
(PRED) Canta T Y S I I G S V H L Y K D G E Y N N D N T Y K P S G N A M I F V T C L Y I F F F A S T W A G G V F A
(PRED) Saico V F A F V G Y Y A L D N A D G --- T Q N S Q A G A A M I V F A C L F I L A F A S T W G C H A W V

..... 460 ..... 470 ..... 480 ..... 490 ..... 500
(PRED) Hxt11 I V S E S F P L R V K S R G M A I A T A A N W M W G F L I S F F T P F I T G A I N F Y Y G V V F L G
(PRED) Torde I V S E S F P L R V K S K G M A I A T G A N W L W G F L I S F F T P F I T G A I N F Y Y G V V F M G
(PRED) Canta I V S E S Y P L R I R S K A N A T A T A A N W I W G F L I S F F T P F I T S A I H F Y Y G V F T G
(PRED) Saico V V A E M F P S R I R A K S I A L A T A S N W T W N F L I S F F T P F I I G S I G F R Y G F V F A A

..... 510 ..... 520 ..... 530 ..... 540 ..... 550
(PRED) Hxt11 C L V F A Y F Y V F F F V P E T K G L T L E E V N T M W L E - G V P A W K S A S W V P P E R R T A D
(PRED) Torde C L V F S F F Y V F F F V P E T K G L T L E E V N T M W L E - G V L P W K S A S W V P P D R R G A D
(PRED) Canta C L L F S F F Y V Y F F V N E T K G L S L E E V D E L Y A Q - K I L P W K S S W V P P S P E E M A
(PRED) Saico C C F A A I P V V Y F F L Y E T K G L T L E Q V D E M Y G D P E V K P W T S S T T I L E R G R R -

..... 560 ..... 570
(PRED) Hxt11 V D A D A I D H D N R P I V K R F F S S -
(PRED) Torde V N A E E M A H D D K P M Y K R L F S R N
(PRED) Canta V S T G F A E A K A N D E Q V --- -

```

**Figura 10. Predição da estrutura secundária dos transportadores utilizados nesse trabalho.** Foram utilizadas as metodologias DSSP (Kebsch & Dander 1983) e PSIPRED (Jones 1999). Em vermelho estão destacados os segmentos peptídicos que assumam a conformação helicoidal, em azul as estruturas que assumem a estrutura de folha- $\beta$  pregueada e sem destaque estão os aminoácidos que não formam nenhuma dessas estruturas, formando

as alças que conectam as hélices. Foram observadas, além das hélices correspondentes aos 12 segmentos transmembrana, 4 hélices entre o segmento 6 e 7, além de uma pequena hélice na porção C terminal, caracterizando o domínio ICH.

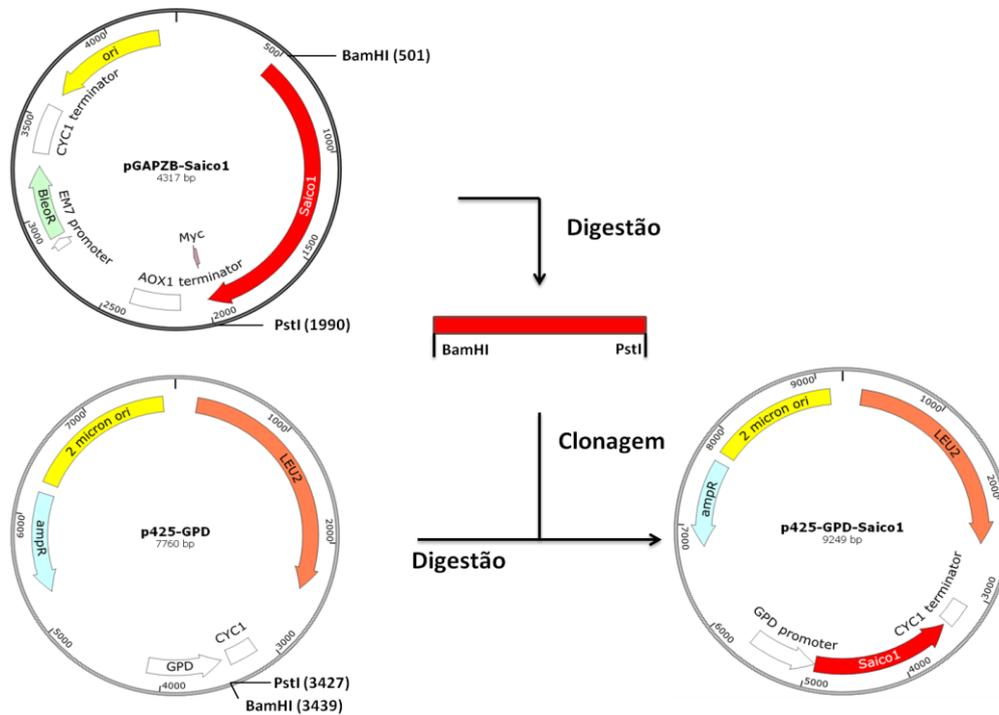
#### 4.2 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

Nesse trabalho, escolheu-se expressar os transportadores de membrana em plasmídeos epissomais sob o controle de promotores constitutivos fortes, como o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e o fator de alongação EF-1 alfa (TEF). Inicialmente, os genes sintetizados foram clonados no plasmídeo p425-GPD (Mumberg *et al.* 1995) (Figura 11). A mesma estratégia foi utilizada para todos os genes (Tabela 12)

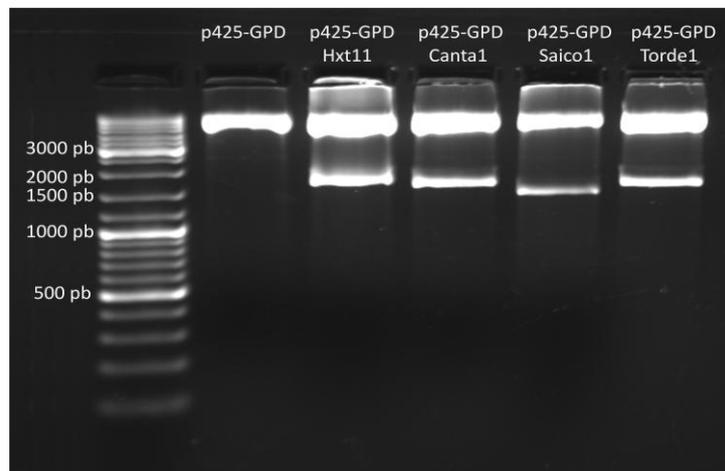
Após a digestão, ligação dos fragmentos e transformação em *E. coli*, foi feita uma extração plasmidial e restrição dos plasmídeos com as enzimas BamHI e PstI para verificação da correta integração dos genes nos plasmídeos. Os tamanhos esperados dos genes são: *HXT11*: 1727 pb, *CANTA1*: 1679 pb, *SAICO1*: 1502 pb e *TORDE1*: 1727 pb. Uma análise eletroforética dessas restrições revelou a presença dos genes em seus tamanhos corretos (Figura 12).

**Tabela 12. Plasmídeos de expressão em *S. cerevisiae* construídos nesse trabalho.**

Plasmídeo	Descrição	Referência
<b>p425 – Hxt11</b>	P <sub>GPD</sub> -SCHXT11-T <sub>CYC</sub> , ampR, LEU2, 2 μ origin	Este trabalho
<b>p425 – Canta</b>	P <sub>GPD</sub> -CtCANTA1-T <sub>CYC</sub> , ampR, LEU2, 2 μ origin	Este trabalho
<b>p425 – Saico</b>	P <sub>GPD</sub> -ScSAICO1-T <sub>CYC</sub> , ampR, LEU2, 2 μ origin	Este trabalho
<b>p425 – Torde</b>	P <sub>GPD</sub> -TdTORDE1-T <sub>CYC</sub> , ampR, LEU2, 2 μ origin	Este trabalho



**Figura 11. Estratégia utilizada na clonagem dos genes de transportadores em plasmídeo de expressão em *S. cerevisiae*.** Na imagem está sendo representado o gene codificante para o transportador Saico. A mesma estratégia foi utilizada para todos os 4 genes utilizados.



**Figura 12. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) confirmando a clonagem dos genes de transportadores em plasmídeo epissomal p425-GDP utilizando os sítios de restrição BamHI e PstI.** O marcador molecular utilizado foi o GeneRuler™ DNA Ladder Mix da empresa Thermo Scientific. Os tamanhos esperados são: *HXT11*: 1727 pb, *CANTA1*: 1679 pb, *SAICO1*: 1502 pb e *TORDE1*: 1727 pb.

### 4.3 EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES EM *S. CEREVISIAE*

Após a construção dos plasmídeos, foi realizada a transformação desses vetores na levedura *S. cerevisiae* EBY.VW4000. Em um primeiro momento, os plasmídeos p425-GPD abrigando os genes de transportadores foram inseridos juntamente com o plasmídeo p424-GPD, sendo os transformantes selecionados em meio YNBM + Histidina + Uracila. O plasmídeo p424-GPD foi utilizado na transformação para evitar a necessidade de suplementar o meio com triptofano. Foram então geradas 4 novas linhagens EBY-Transportador (EBY-Hxt11, EBY-Canta, EBY-Saico e EBY-Torde), além de uma levedura controle negativo com os plasmídeos p424-GPD e p425-GPD vazios, ou seja, sem genes codificantes para transportadores (EBY-p425Ø).

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLACA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

As linhagens de *S. cerevisiae* EBY-Hxt11, EBY-Canta, EBY-Saico, EBY-Torde e EBY-p425Ø foram analisadas quanto a sua capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono. Inicialmente, essas leveduras foram inoculadas, em diluições seriadas, em placas contendo meio mínimo, os aminoácidos suplementares e apenas uma fonte de carbono, sendo elas: frutose, glicose, maltose, sacarose e xilose.

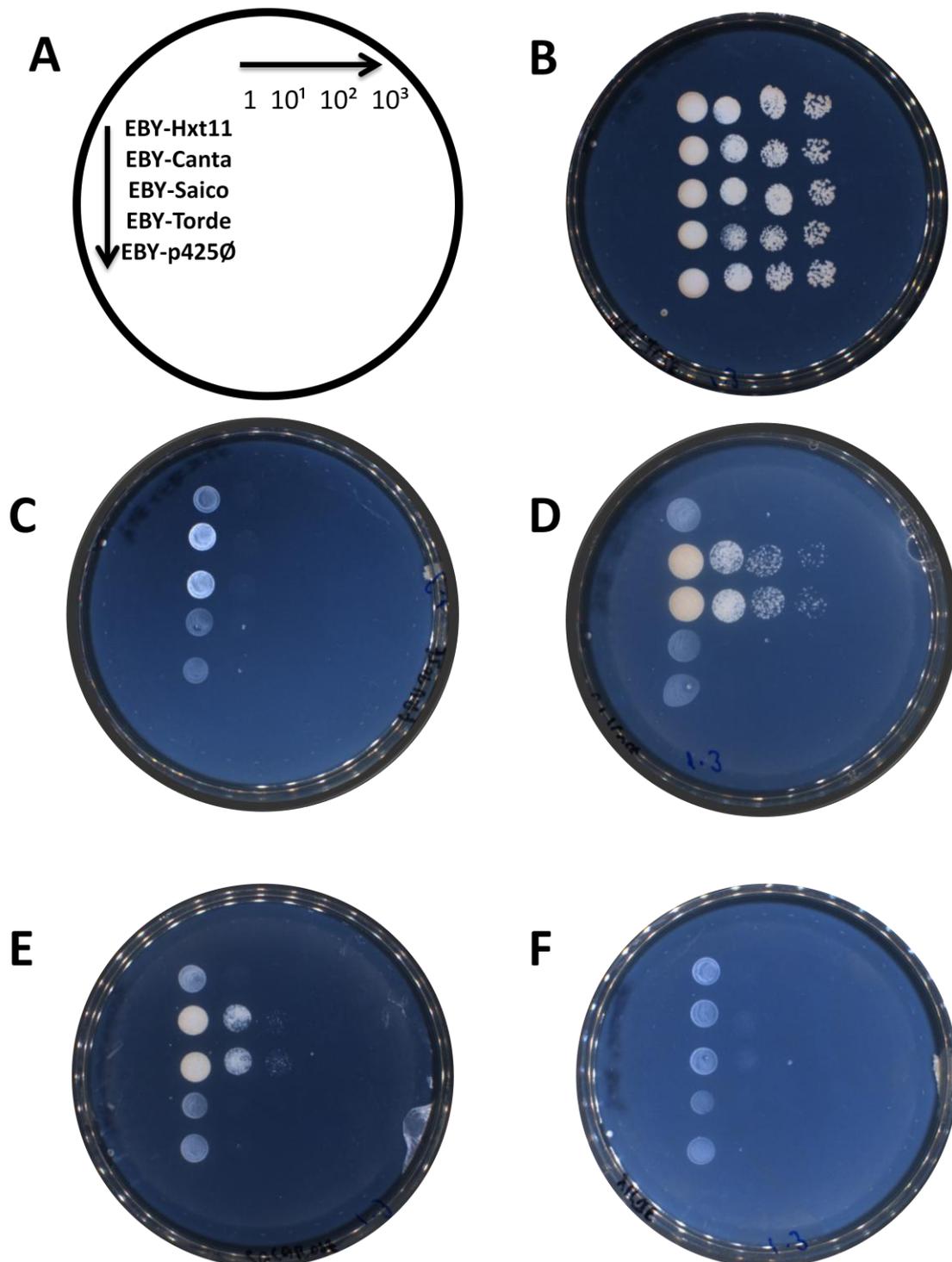
Como esperado, todas as linhagens conseguiram crescer em maltose, uma vez que o transporte desse açúcar ocorre através de transportadores específicos, codificados por genes *MALX1* (X representa um dos cinco *loci* MAL presente em *S. cerevisiae*) (Van Leeuwen et al. 1992, Naumov et al. 1994, Brondjik et al. 2001, Hatanaka et al. 2009, Henderson & Poolman 2017) presentes na levedura e, portanto, não depende dos transportadores deletados (Figura 13 B) (Brondjik et al. 2001). Foi então observado que, quando avaliado o crescimento em glicose e sacarose, apenas as linhagens contendo os transportadores Canta e Saico apresentaram capacidade de crescimento (Figura 13D e E).

As linhagens EBY-Hxt11 e EBY-Torde não foram capazes de crescer em nenhum açúcar. Por ser o controle positivo desse trabalho, esperava-se

que EBY-Hxt11 fosse capaz de crescer pelo menos em glicose, uma vez que esse fenótipo foi observado no trabalho que identificou esse transportador como um gene crítico pela primeira vez (Shin *et al.* 2015). Como EBY-Torde contém o gene mais semelhante a Hxt11, era esperado que essa linhagem também apresentasse o fenótipo de crescimento.

Quando analisados sob a disponibilidade de frutose ou xilose como fonte de carbono, nenhuma linhagem apresentou crescimento (Figura 13C e F). É importante lembrar que nesta etapa a via de metabolismo de xilose não havia sido inserida nas leveduras, impossibilitando uma análise completa do funcionamento ou não dos transportadores para internalização dessa pentose.

Como esperado, a linhagem controle negativo, construída com os plasmídeos p424-GPD e p425-GPD vazios, apresentou crescimento apenas na placa contendo maltose como única fonte de carbono. Confirmando que essa linhagem, sem a inserção de genes codificantes para transportadores, não é capaz de internalizar hexoses (Figura 13).



**Figura 13. Crescimento de linhagens EBY-Transportador em meio sólido contendo apenas um açúcar como fonte de carbono.** A) Modelo esquemático do plaqueamento e das diluições realizadas a partir de um pré-inóculo. Foram testados os diferentes açúcares: B) Maltose  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , C) Frutose  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , D) Glicose  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , E) Sacarose  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e F) Xilose  $40 \text{ g.L}^{-1}$ .

#### 4.5 ACÚMULO DE XILOSE INTRACELULAR

Concomitantemente ao experimento em placas, foi realizado um ensaio para determinar a capacidade de internalização de xilose pelas linhagens construídas (Hector *et al.* 2008, Du *et al.* 2010, Wang *et al.* 2015a). Por ainda não ter sido inserida a via de aproveitamento de xilose, a soma entre xilose e xilitol obtidos a partir de análise de metabólitos em HPLC foi considerada como a xilose acumulada.

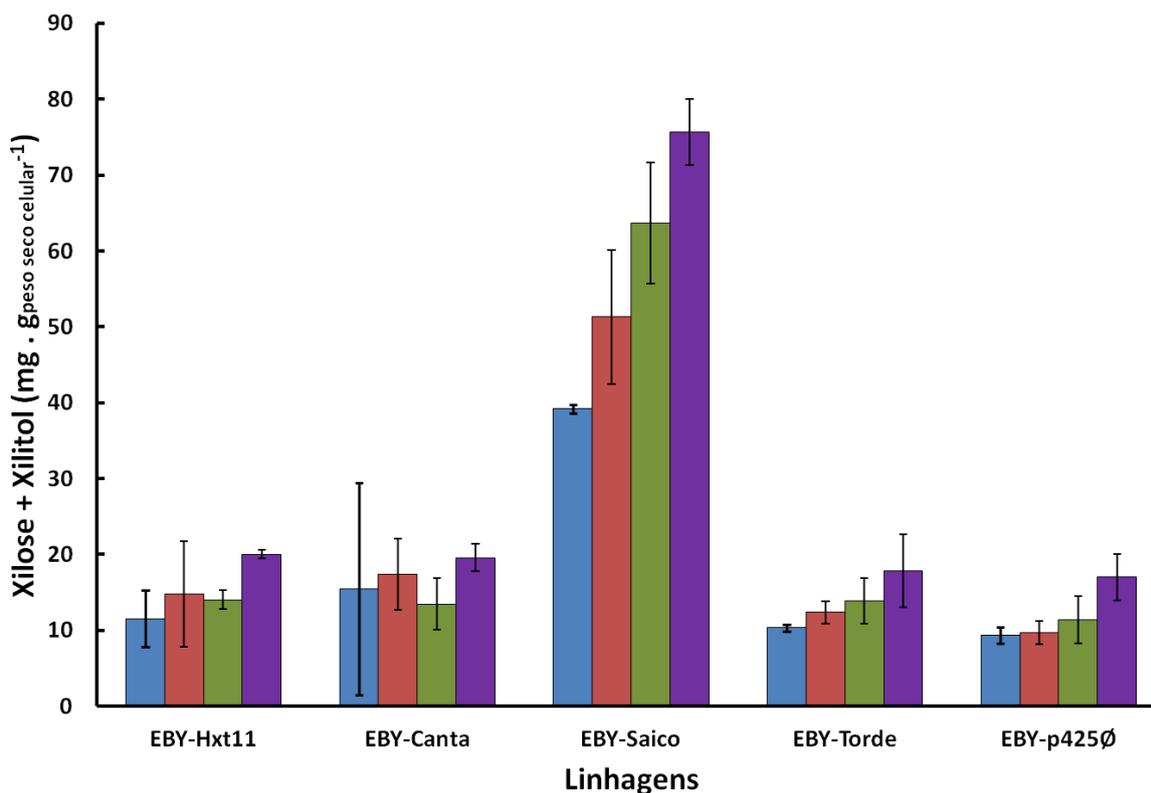
O xilitol foi considerado nessa conta porque *S. cerevisiae* apresenta o gene *GRE3* em seu genoma, responsável por codificar uma aldose redutase capaz de reduzir xilose. Logo, essa levedura é capaz de, nativamente, produzir pequenas quantidades de xilitol a partir da xilose consumida. A análise de metabólitos em HPLC revelou que a linhagem EBY.VW4000 transformada com o plasmídeo contendo o transportador Saico apresentou uma capacidade de internalização de xilose consideravelmente maior que as outras linhagens (Figura 14).

A comparação das concentrações de xilose internalizada indica claramente que o transportador Saico atua no transporte de xilose. De fato, o acúmulo de xilose aumentou de  $39,18 \pm 0,52 \text{ mg.g}_{\text{peso seco celular}}^{-1}$  em 30 min para  $75,67 \pm 4,38 \text{ mg.g}_{\text{peso seco celular}}^{-1}$  em 24 horas (Figura 14).

Os transportadores Hxt11, Torde e Canta não foram responsáveis por permitir a internalização considerável de xilose nesse experimento (Figura 14).

Uma vez que nesse momento não foram feitas comprovações por meio de PCRs de colônia, a seleção foi realizada apenas pela auxotrofia da levedura, permitindo serem elaboradas algumas hipóteses acerca do não funcionamento dessas linhagens. Apesar de ser um evento raro, a perda de gene por recombinação é uma possível explicação para o não funcionamento. A utilização de dois plasmídeos com regiões idênticas, como promotor, terminador e origem de replicação pode contribuir para esse evento de recombinação. Uma PCR de colônia ou sequenciamento seriam experimentos capazes de elucidar essa hipótese. Também podem ser feitos estudos dos transcritos da linhagem, uma vez que o problema pode estar ligado ao sistema de transcrição. Tendo em vista esses resultados, os transportadores Canta e Saico foram escolhidos para serem utilizados nos próximos experimentos.

Entretanto, isso não significa que os demais transportadores escolhidos devam ser descartados. O não funcionamento dessas linhagens nos ensaios anteriores pode ser decorrente de diversos fatores. É preciso ter certeza que o gene realmente foi inserido na linhagem, bem como se ele está sendo transcrito, ou até mesmo se o transportador não está sofrendo ubiquitinação e degradação antes de chegar à membrana celular.



**Figura 14. Capacidade de internalização de xilose por linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com genes putativos para transportadores de xilose.** As barras de erro representam as variações entre as triplicatas. Azul: 30 minutos, vermelho: 60 minutos, verde: 120 minutos, roxo: 24 horas.

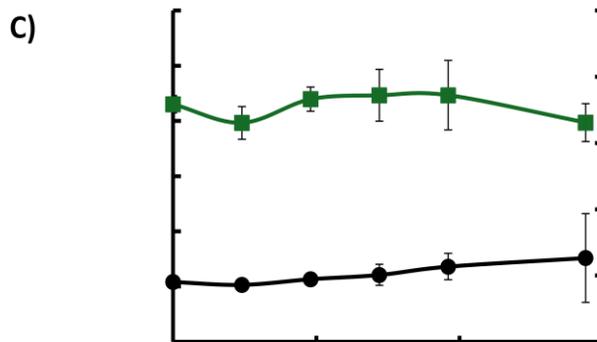
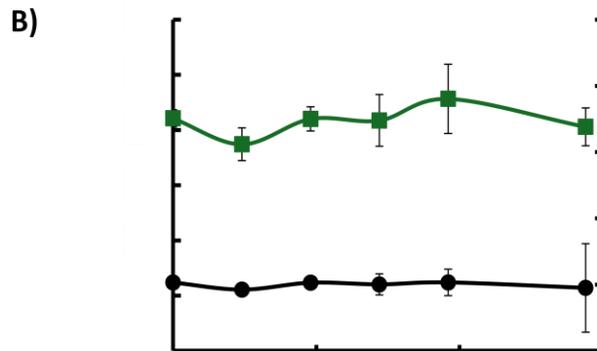
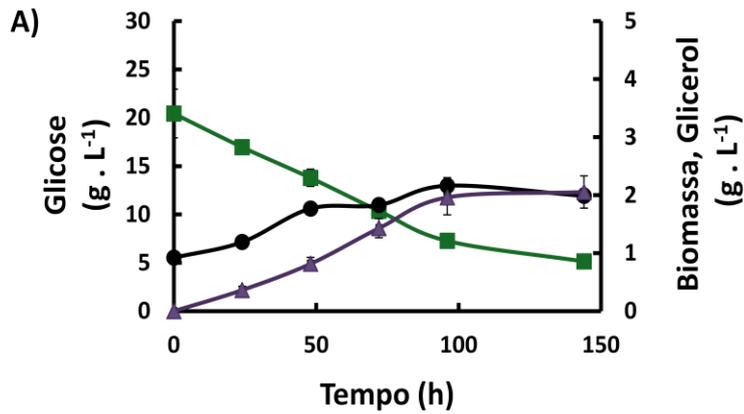
#### 4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS EBY-CANTA E EBY-SAIICO EM GLICOSE

Dado o crescimento das linhagens EBY-Canta e EBY-Saico nos experimentos com meio sólido (Figura 13) e a capacidade de internalizar xilose por EBY-Saico (Figura 14), foi realizado um experimento para avaliar a cinética de crescimento das leveduras em meio mínimo líquido contendo glicose 20 g.L<sup>-1</sup>. Foi observado que a linhagem EBY-Saico apresentou crescimento e um consumo de 15,29 ± 2,43 g.L<sup>-1</sup> de glicose em 144 horas. Também foi observada uma produção de glicerol de 2,05 ± 0,28 g.L<sup>-1</sup>. Nenhuma quantidade de etanol foi detectada (Figura 15A).

Por outro lado, a linhagem EBY-Canta não apresentou o mesmo fenótipo de crescimento observado nos experimentos realizados em meio sólido (Figura 13D, Figura 15B). Existe a possibilidade de recombinação dos plasmídeos, uma vez que a linhagem foi replicada e colocada a crescer em meio líquido, fazendo com que o transportador fosse perdido. Sabe-se que *S. cerevisiae* apresenta a tendência de realizar recombinações homólogas, e nesse caso estão sendo inseridos dois plasmídeos (p424GPD e p425-GPD ou p425-Canta ou p425-Saico) contendo tanto o promotor GPD como o terminador CYC. Tendo duas sequências idênticas, as chances dessa levedura estar recombinando e mantendo apenas o plasmídeo com a marca de seleção auxotrófica são relativamente altas (Ma et al. 1987, Mizutani 2014, van Leeuwen et al. 2015). Também não pode ser descartada a possibilidade de contaminação no experimento em placas. A realização de novas replicatas deverão ser feitas a fim de esclarecer os resultados obtidos, positivos e negativos.

Conforme esperado, a linhagem controle negativo não apresentou crescimento ou consumo de açúcar (Figura 15C).

Tendo em vista esses resultados, o transportador Saico foi escolhido para ser utilizado nos testes posteriores.

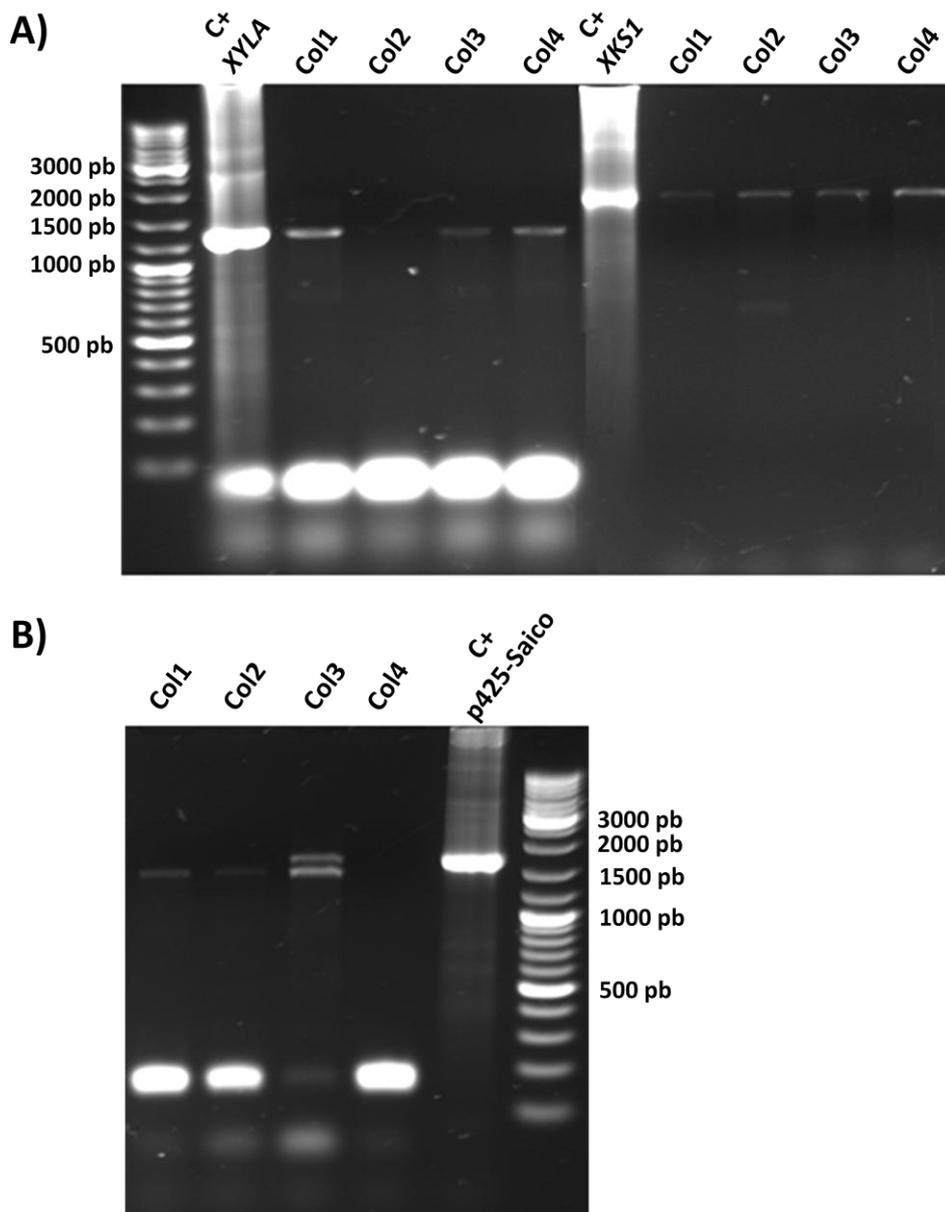


**Figura 15. Curva de crescimento de linhagens (A) EBY-Saico, (B) EBY-Canta e (C) EBY-p425Ø em glicose.** O cultivo foi realizado em meio YNB, suplementado com uracila e histidina e adicionado de 20 g.L<sup>-1</sup> de açúcar de glicose como única fonte de carbono. Os crescimentos foram iniciados com uma DO<sub>600nm</sub> = 2. As barras de erros em A e B representam as variações entre triplicatas. A curva de crescimento com EBY-p425Ø foi realizada em duplicata. Estão representados nos gráficos: Biomassa (preto, círculo), Glicerol (roxo, triângulo) e Glicose (verde, quadrado).

#### 4.7 FERMENTAÇÕES COM ALTA DENSIDADE CELULAR

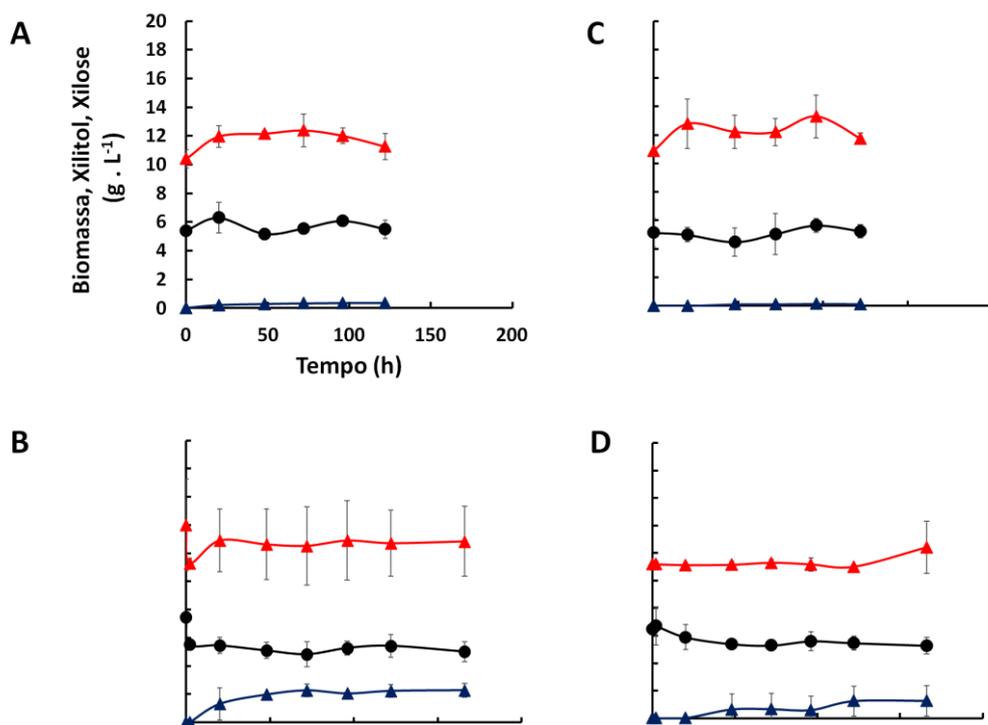
A fim de confirmar a funcionalidade do transportador em levedura capaz de metabolizar xilose, a linhagem EBY.VW4000 foi transformada não apenas com os plasmídeos p425-GPD-Saico, como também com os plasmídeos p424-XI e p426-XK, introduzindo os genes *xyIA* de *Pyromyces sp.* e *XKS1* de *S. cerevisiae*. A introdução dos genes *xyIA* e *XKS1* é responsável por permitir a utilização de xilose pelas leveduras por meio da via da Xilose Isomerase. Nesse passo, foram geradas 2 linhagens: EBY-XIXK-Saico, contendo a via de aproveitamento de xilose e o transportador Saico, e EBY-XIXK-p425Ø contendo os plasmídeos com a via da metabolização de xilose e o plasmídeo p425-GPD sem transportador. Primeiramente foram inseridos os plasmídeos contendo a via de metabolização da xilose e, em uma segunda transformação, foi inserido o transportador e o plasmídeo p425Ø.

A confirmação da presença desses plasmídeos com os genes na nova linhagem foi realizada por meio de PCR de colônia (Figura 16). Nessa PCR foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam especificamente os genes *xyIA* e *XKS*. Além disso, foram utilizados oligonucleotídeos responsáveis por amplificar fragmentos a partir da porção terminal 3' do promotor GPD e da porção inicial 5' do terminador CYC. Após o processo de PCR, uma análise eletroforética revelou, para um transformante, bandas condizentes aos tamanhos de fragmentos esperados (Figura 16). Dessa maneira, foi possível confirmar que os plasmídeos e genes foram corretamente inseridos nas leveduras transformadas. Os tamanhos esperados dos fragmentos são: 1,4 kb para o fragmento amplificando *xyIA* e 1,8 kb para o fragmento de *XKS1* (Figura 16A). Para a PCR de colônia amplificando o promotor GPD e terminador CYC, espera-se que a PCR amplifique dois fragmentos, um relativo ao gene *xyIA* flanqueado por GPD e CYC e outro relativo ao gene *SAICO1* flanqueado pelo promotor e terminador (Figura 16B).



**Figura 16.** Eletroforese com os produtos da PCR de colônia para confirmação da presença dos genes *xylA*, *XKS1* e *SAICO1* na levedura **EBY-XIXK-Saico**. (A) Amplificação dos genes *xylA* e *XKS*. Os controles positivos utilizados foram os plasmídeos p424-XI e p426-XK (descritos na seção de materiais e métodos nesse trabalho). (B) Amplificação dos genes *xylA* e *SAICO1* a partir do promotor GPD e terminador CYC. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo p425-Saico, construído nesse trabalho. A colônia 3 revelou todas as bandas esperadas, do mesmo tamanho que os controles utilizados. O marcador molecular utilizado foi o GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

Após a confirmação da presença dos genes na colônia 3 (Figura 16), foram realizadas fermentações com altas densidades celulares a fim de mensurar a capacidade fermentativa dessa levedura. Para isso, foram realizadas fermentações em meio YNB suplementado com histidina e contendo xilose como única fonte de açúcar. Foram realizadas fermentações com 10 e 15 g.L<sup>-1</sup> de xilose. A análise dos metabólitos por HPLC revelou que essa linhagem não foi capaz de consumir xilose quando esse açúcar é a única fonte de carbono presente no meio (Figura 17).



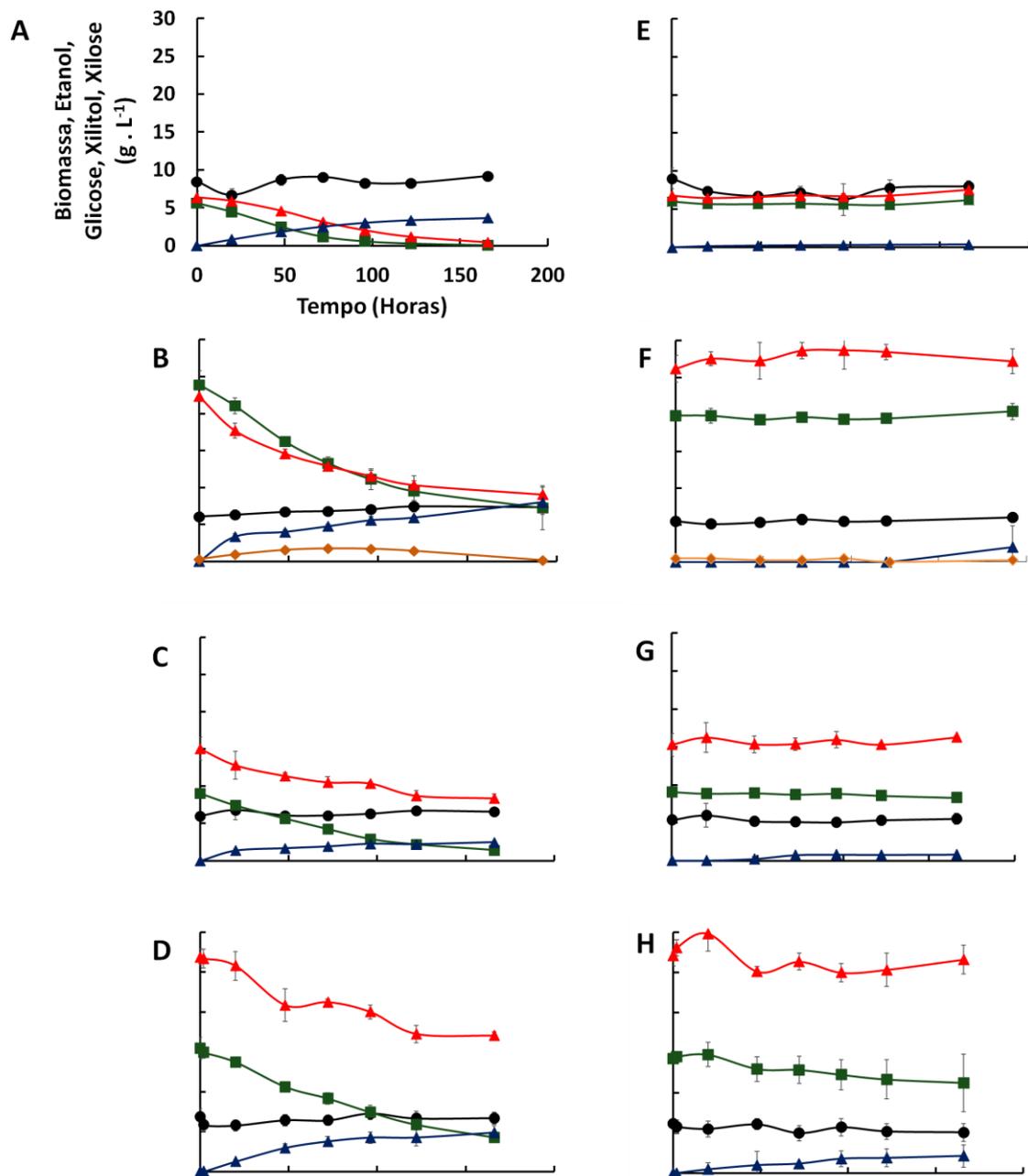
**Figura 17. Fermentação de EBY-XIXK-Saico (A,B) e EBY-XIXK-p425Ø (C, D) em meio YNB, suplementado com histidina e contendo xilose como única fonte de carbono.** As barras de erros representam as variações entre as triplicatas. Estão representados Figura: Biomassa (preto, círculo), Xilitol (azul, triângulo) e Xilose (vermelho, triângulo).

Como o consumo de glicose favorece o metabolismo microbiano e aumenta as taxas de conversão de xilose (Olofsson *et al.* 2008, Runquist *et al.* 2010), decidiu-se avaliar o desempenho da linhagem em experimentos de fermentação com a presença glicose e xilose como fontes de carbono. Para

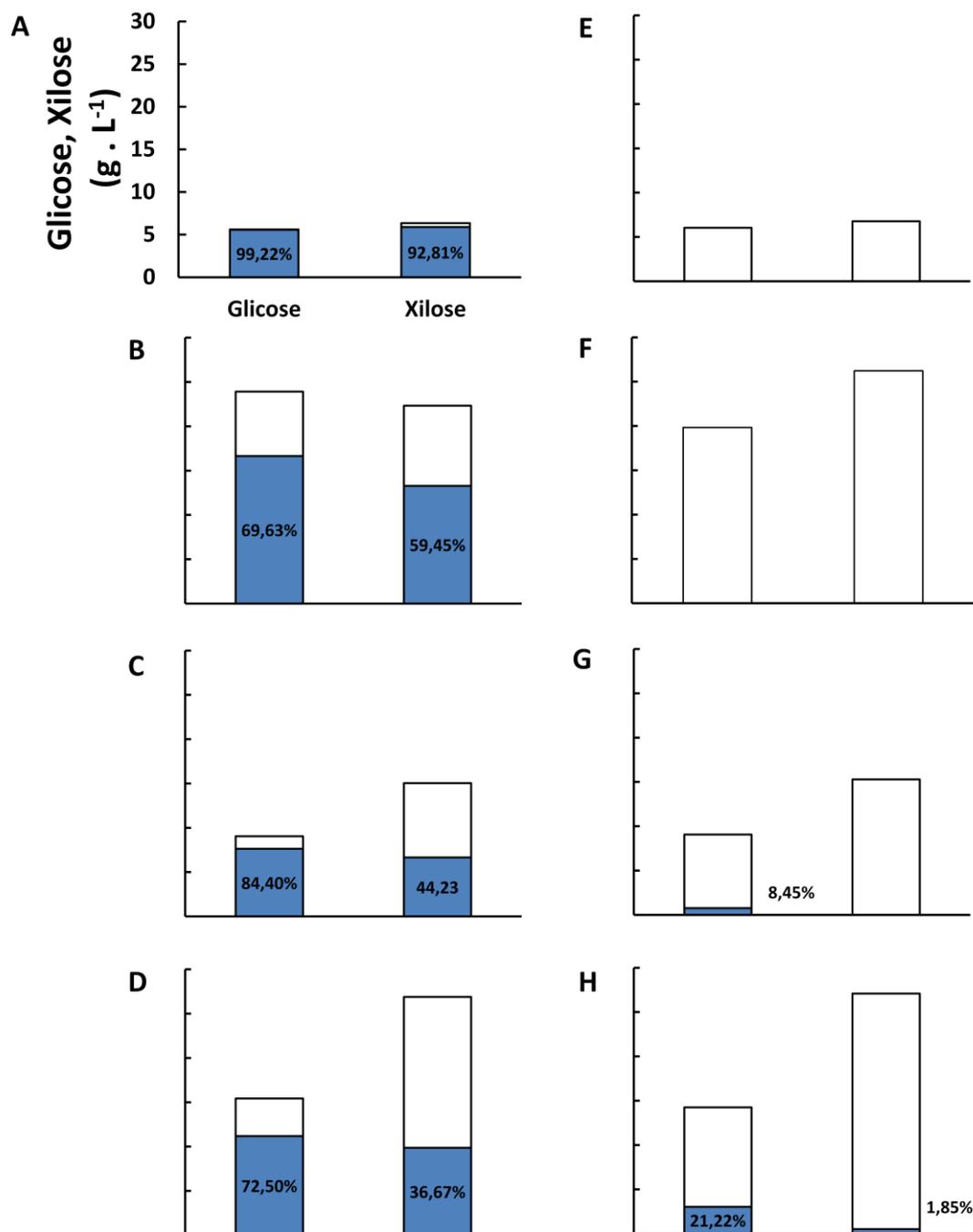
tanto foram realizadas fermentações em batelada usando diferentes concentrações dos açúcares e altas densidades celulares. Os experimentos foram realizados em triplicata. Foram realizadas quatro fermentações utilizando as linhagens EBY-XIXK-Saico e EBY-XIXK-p425Ø. A DO600<sub>nm</sub> inicial utilizada nas fermentações variou de 13 a 20.

Ao analisar os resultados, confirmou-se que a linhagem controle não foi capaz de consumir nem glicose e nem xilose, conforme esperado (Figura 18 E; F; G; H). Observou-se que, em concentrações iguais, os açúcares são consumidos concomitantemente pela linhagem *S. cerevisiae* EBY-XIXK-Saico (Figura 18A e B). Após 120 horas de fermentação com aproximadamente 25 g.L<sup>-1</sup> de açúcar disponível, a linhagem conseguiu consumir 60% da glicose e 53% de xilose disponível, enquanto consumiu praticamente todo açúcar presente no meio após o mesmo período de tempo, quando disponibilizado apenas 5 g.L<sup>-1</sup> dos açúcares (Figura 18A e B, Figura 19A e B).

Nas fermentações com aproximadamente duas vezes mais xilose que glicose, novamente observou-se que o consumo dos dois açúcares ocorre concomitantemente, e o aumento das concentrações não alterou o perfil de consumo dos açúcares (Figura 18C e D, Figura 19C e D). A velocidade e quantidade do consumo dos açúcares foi maior quando suas concentrações iniciais eram maiores (Tabela 13). Ao longo de todos os processos fermentativos, não foi observada uma alteração significativa no crescimento celular. Além disso, o principal produto obtido nessas fermentações foi o xilitol, alcançando um rendimento de 0,62 ± 0,07 (Tabela 13). Em fermentações com aproximadamente 25 g.L<sup>-1</sup> de glicose e xilose, foi observada uma pequena produção de etanol (Figura 18B). No entanto, diferentemente da curva de crescimento realizada anteriormente, apenas com a presença de glicose como fonte de açúcar, não foi observada a produção de glicerol.



**Figura 18. Cofermentação das linhagens EBY-XIXK-Saico (A, B, C e D) e EBY-XIXK-p425Ø (E, F, G e H).** As fermentações foram realizadas em frasco e sob as condições: 28°C e 200 rpm em meio sintético com a adição de histidina, glicose e xilose em diferentes concentrações. As barras de erros representam as variações entre as triplicatas realizadas para cada fermentação. Em F estão reportados os dados em duplicata devido a uma contaminação em uma replicata. Biomassa (preto, círculo), Etanol (laranja, losango), Glicose (quadrado, verde), Xilitol (azul, triângulo) e Xilose (vermelho, triângulo).



**Figura 19. Consumo de açúcares por EBY-XIXK-Saico (A, B, C e D) e EBY-XIXK-p425Ø (E, F, G e H).** As barras brancas representam as quantidades totais de açúcares presente no início da fermentação. Em azul estão representadas as quantidades de açúcares consumidos após 166 horas. As porcentagens representam a proporção entre açúcar consumido e açúcar disponível.

**Tabela 13. Cofermentação de xilose e glicose pela linhagem EBY.VW4000 transformada com plasmídeos contendo os genes para o aproveitamento de xilose via XI-XK, além do transportador Saico.**

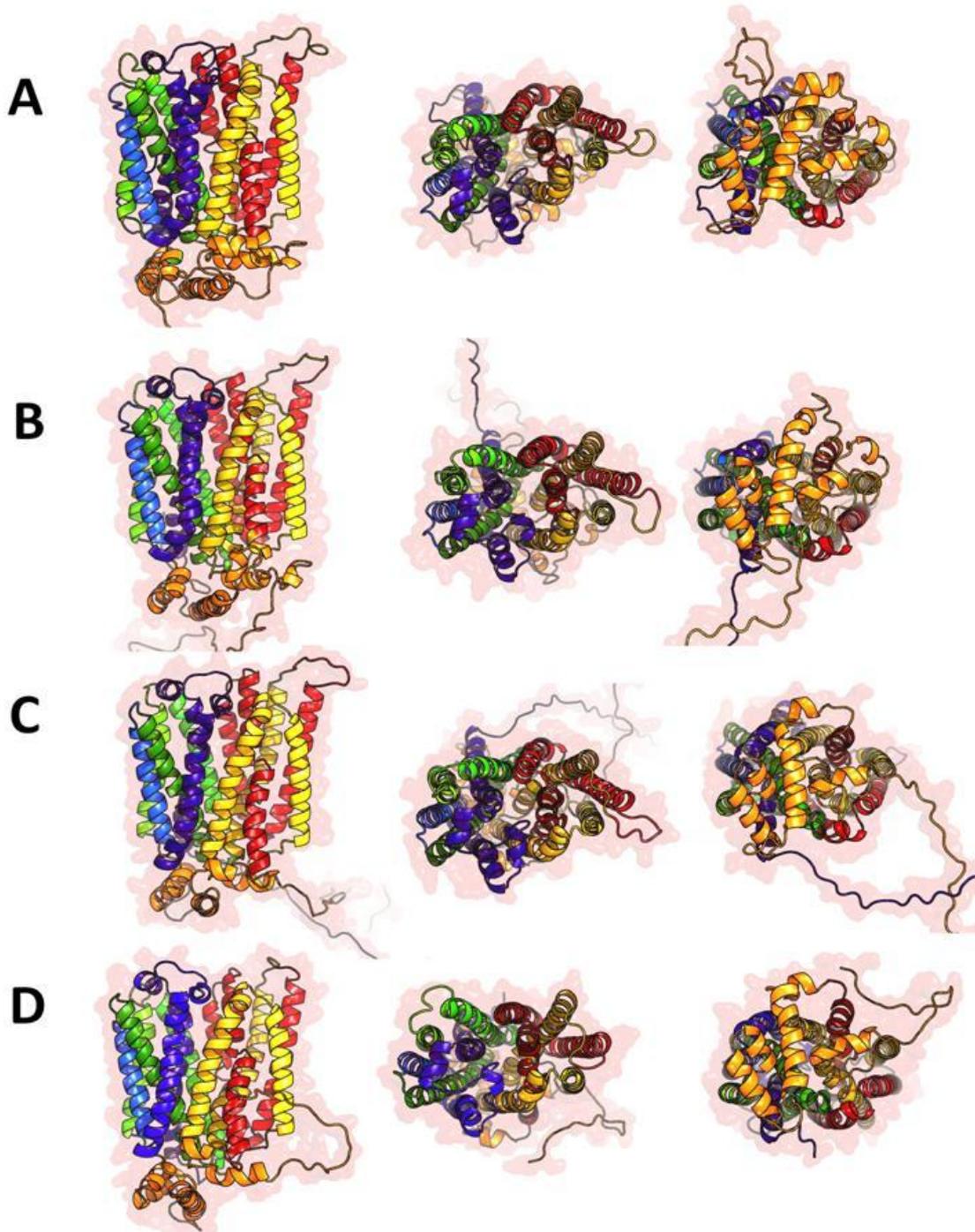
Açúcar Inicial (g . L <sup>-1</sup> )		Açúcar Consumido (g . L <sup>-1</sup> )		Velocidade de Consumo (g . L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )		Xilitol Produzido (g . L <sup>-1</sup> )	Rendimento Xilitol/Xilose (g . g <sup>-1</sup> )	Produtividade (g . g <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )
Glicose	Xilose	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose			
5,62 ± 0,27	6,35 ± 0,40	5,57 ± 0,26	5,90 ± 0,45	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	3,64 ± 0,21	0,62 ± 0,07	0,0 ± 0,0
23,9 ± 1,91	22,32 ± 2,21	16,65 ± 3,07	13,27 ± 3,17	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,02	8,03 ± 1,26	0,61 ± 0,06	0,01 ± 0,01
9,05 ± 0,34	15,03 ± 1,57	7,63 ± 0,37	6,65 ± 1,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	2,48 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,0 ± 0,0
15,41 ± 1,40	26,34 ± 1,07	11,17 ± 0,96	9,32 ± 1,07	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	4,84 ± 0,87	0,53 ± 0,15	0,0 ± 0,0

#### 4.8 **MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DOS TRANSPORTADORES**

A modelagem tridimensional revelou estruturas muito semelhantes entre eles. Além dessa modelagem ser feita de acordo com homologias com um transportador base, a organização dessa proteína é bastante conservada dentro da superfamília MFS. No entanto, podemos ter mais uma confirmação que esses transportadores seguem o modelo de 12 segmentos transmembrana, divididos em 4 trincas e 2 domínios (Figura 20).

A predominância de hélices coloca em evidência a estrutura tubular, na qual as hélices se organizam de maneira a criar uma espécie de túnel para a passagem de moléculas (Figura 20).

Também pode ser observada a presença do domínio intracelular helical (ICH), formado por hélices conectando os domínios N-terminal e C-terminal, juntamente com uma hélice na porção C-terminal dessa proteína (Figura 20). Esse domínio é característico de proteínas pertencentes à família Sugar Porter e forma um tipo de portão na porção citoplasmática desse transportador (Figura 20).



**Figura 20. Representação tridimensional dos transportadores utilizados nesse trabalho. (A) Hxt11, (B) Torde, (C) Canta e (D) Saico. Estão representados os segmentos transmembrana: TMs 1-3 em azul, TMs 4-6 em verde, TMs 7-9 em vermelho e TMs 10-12 em amarelo. O domínio ICH está representado em laranja. Estão representadas as perspectivas: lateral (esquerda), extracelular (centro) e intracelular (direita).**

## 5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foi encontrado, a partir de análises bioinformáticas, um transportador responsável por permitir a utilização de xilose por *S. cerevisiae* quando fermentada juntamente com a glicose. O progresso apresentado nesse trabalho pode oferecer uma nova abordagem para estudos que visam um aproveitamento concomitante de xilose e glicose em processos fermentativos. Previamente, foram identificados outros transportadores de xilose com essa capacidade. Porém, esse foi o primeiro transportador identificado da espécie *Saitoella complicata*, uma levedura cujo parente mais próximo é a levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Riley *et al.* 2016).

Primeiramente, foram selecionados, entre os 63 transportadores prospectados, 3 novos candidatos a transportadores de xilose. Foram realizados alinhamentos e predições dos segmentos transmembrana (TMs) a partir das sequências proteicas. Esses estudos revelaram que essas novas proteínas apresentam grande chance de pertencerem à superfamília MFS (Major Facilitator Superfamily). Entre essas características está, assim como na maioria das proteínas dessa superfamília, a presença de 12 domínios transmembrana (Reddy *et al.* 2012; Quistgaard *et al.* 2016). Esses TMs estão separados em dois domínios, o domínio N, composto pelos segmentos 1 a 6, e o domínio C, composto pelos segmentos 7 a 12 (Yan 2015). Além disso, pode-se ainda inferir que essas proteínas façam parte da família SP (Sugar Porter), a maior e mais importante família de transportadores de açúcar (Saier Jr 2002). Essa inferência pode ser feita a partir da presença de um domínio helical intracelular (ICH), formado por quatro hélices entre os domínios N e C, além de uma pequena hélice na porção C terminal (Yan 2015). Esse domínio está presente em todas as proteínas presentes na subfamília Sugar Porter (Deng *et al.* 2014). O ICH é uma estrutura extremamente importante para garantir que o portão intracelular esteja firmemente fechado quando o transportador se apresenta aberto para o meio extracelular (Deng *et al.* 2014, Yan 2015).

Após a seleção e análise bioinformática, os novos genes foram sintetizados por empresa privada. No entanto, essa síntese foi feita com uma mutação de asparagina para treonina na posição 366 de Hxt11 foi alterada para uma treonina. Essa mutação foi identificada como um fator de alteração

cinética favorecendo o transporte de xilose, enquanto a afinidade por xilose foi aproximadamente duas vezes maior (de  $K_m = 84,2$  para  $K_m = 46,7$ ) a afinidade por glicose diminuiu aproximadamente 6 vezes (de  $K_m = 33,4$  para  $194,4$ ) (Shin *et al.* 2015). Apesar da afinidade por xilose não ser tão alta, a diminuição da afinidade por glicose pode representar uma condição extremamente vantajosa em casos de cofermentação, nos quais a presença de glicose no meio, a princípio, não inibirá o transporte da xilose para o meio intracelular. Para uma melhor comparação, estudos cinéticos ainda devem ser realizados com os transportadores sintetizados nesse trabalho, principalmente o transportador Saico. Essa asparagina, localizada no segmento transmembrana 8, apesar de não participar diretamente na ligação ao substrato, já apontou aumentos na capacidade de transporte de xilose em transportadores como Hxt11 e XylE (Sun *et al.* 2012, Shin *et al.* 2015). Outro estudo indicou esse mesmo sítio, nos transportadores Gal2 e Hxt7 de *S. cerevisiae*, como essencial para a mudança de afinidade de açúcares (Farwick *et al.* 2014). A mutação desse aminoácido em levedura contendo o transportador quimérico Hxt36 também foi responsável pela alteração da afinidade pelos dois açúcares (Nijland *et al.* 2014). Isso indica que a afinidade por substratos não está exclusivamente ligada a aminoácidos de ligação direta, mas também pode ser fortemente influenciada por aminoácidos envolvidos nos processos de transição de estado dos transportadores. Futuros estudos analisando esses fatores são extremamente importantes para maior elucidação acerca desse tema.

Foi escolhido expressar os transportadores em *S. cerevisiae* por meio de plasmídeo de expressão episomal, sob o controle de um promotor constitutivo forte. Foi escolhido o vetor p425, com o promotor gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD). Essa escolha foi feita baseada em estudos que já haviam demonstrado que essa combinação era eficiente para a expressão de transportadores em *S. cerevisiae*. Young *et al.* em 2011 utilizaram a linhagem EBY.VW4000, transformada com os genes de metabolismo de xilose *XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis*, para avaliar o funcionamento de 23 transportadores heterólogos e 3 transportadores nativos e seus efeitos em *S. cerevisiae* (Young *et al.* 2011). Nesse trabalho, utilizaram dois plasmídeos sob o controle do promotor TEF e um sob promotor GPD. De qualquer maneira, isso demonstrou

a capacidade dessa linhagem de *S. cerevisiae* de expressar múltiplos plasmídeos, sendo alguns sob o controle de um mesmo promotor. Essa capacidade foi observada em diversos outros trabalhos, que também se utilizaram da expressão de diferentes plasmídeos carregando genes codificantes para transportadores (Li *et al.* 2016, Wang *et al.* 2015a, Wang *et al.* 2015b).

Apesar de se tratar de uma levedura relativamente sensível, a linhagem EBY.VW4000 (Wieczorke *et al.* 1999) se apresentou como uma ferramenta eficiente para o estudo de novos transportadores. Considerando o alto grau de modificações genéticas realizadas nessa levedura (Solis-escalante *et al.* 2015), essa linhagem não é robusta a ponto de permitir a obtenção de resultados e aplicação de condições semelhantes àsquelas utilizadas em processos industriais (Young *et al.* 2011). Para isso, um passo futuro a ser tomado é a utilização do transportador em uma linhagem de *S. cerevisiae* industrial ou uma linhagem laboratorial robusta, já condicionada ao aproveitamento de xilose.

As linhagens expressando os transportadores EBY-Hxt11, EBY-Torde, EBY-Canta e EBY-Saico também foram testadas para crescimento em glicose em meio sólido, onde EBY-Canta e EBY-Saico apresentaram crescimento bastante semelhante, enquanto nenhuma outra linhagem foi capaz de crescer nessa condição. Isso indica que a levedura expressando o transportador Canta ou Saico foi capaz de transportar glicose suficiente para sustentar seu metabolismo. Porém, quando testadas para frutose, todas as linhagens foram incapazes de crescer. Sabe-se que o transporte dessa hexose é realizado pelos mesmos transportadores de glicose, no entanto sua menor afinidade pela frutose faz com que esse açúcar seja utilizado em estágios finais em casos de cofermentação. Essa condição é indesejada em casos de produção de vinho por exemplo, uma vez que a frutose residual é responsável por conferir uma doçura ao vinho maior do que a desejada (Berthels *et al.* 2006, Guillaume *et al.* 2007). De qualquer maneira, podemos inferir que Canta e Saico não são capazes de transportar esse monossacarídeo.

Por outro lado, no ensaio realizado com o dissacarídeo sacarose como única fonte de carbono, as linhagens EBY-Canta e EBY-Saico voltaram a apresentar o fenótipo de crescimento. O metabolismo de sacarose em *S.*

*cerevisiae* se inicia no periplasma celular, por meio da atividade da enzima invertase, codificada pelo gene *SUC2*, responsável pela hidrólise de sacarose em frutose e glicose (Marques *et al.* 2016). Logo, é possível inferir que a sacarose presente no meio está sendo hidrolisada e apenas a glicose proveniente dessa reação está sendo transportada e aproveitada pela célula.

Por último, foi realizado um ensaio contendo xilose ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) como única fonte de carbono. Assim como esperado, nenhuma linhagem demonstrou crescimento nas placas, isso ocorre pelo fato de não ter sido inserido uma via de metabolização da xilose. Esses ensaios foram ótimos indicativos que os genes *CANTA1* e *SAICO1* realmente codificam transportadores de membrana funcionais em *S. cerevisiae*. Por outro lado, apenas esse experimento não permite o descarte dos outros genes investigados, uma vez que a seleção dos transformantes nessa etapa foi feita apenas por meio de seleção auxotrófica. Dessa maneira, não é possível confirmar se os genes realmente não são funcionais nessa linhagem ou se ocorreu algum problema durante a construção dos plasmídeos.

Um ensaio rápido demonstrou que as leveduras EBY-Hxt11, EBY-Canta e EBY-Torde não são capazes de internalizar xilose, enquanto a linhagem EBY-Saico apresentou um transportador ativo (Figura 14). Esse resultado foi semelhante ao obtido por Wang *et al.* 2015a, onde o transportador Mgt05860p de *Meyerozyma guilliermondii* foi clonado e expresso em EBY.VW4000. Outro trabalho que se utilizou desse mesmo método foi Du *et al.* 2010, no qual foi utilizada a mesma linhagem EBY.VW4000 para a análise de transportadores An25 e Xyp29 oriundos, respectivamente, de *Neurospora crassa* e *Pichia stipitis* (*S. stipitis*). Nesse caso, as leveduras contendo os transportadores An25 e Xyp29 conseguiram acumular aproximadamente  $0,7$  e  $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$  após 24 horas a uma  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 10$  (Du *et al.* 2010). Nos ensaios de Saico foram utilizadas  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 3,5$ , acumulando em média  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  após 24 horas.

Quando o crescimento foi avaliado na presença de glicose em meio líquido, EBY-Saico manteve o fenótipo de crescimento. Enquanto isso, EBY-Canta não apresentou o mesmo fenótipo observado em meio sólido. A inserção de plasmídeos contendo os mesmos promotores e terminadores pode ter

contribuído para uma possível recombinação realizada pela linhagem EBY-Canta, resultando na perda do gene e da capacidade de crescimento em glicose.

A linhagem EBY-XIXK-Saico, a qual possui a via de metabolização de xilose, não foi capaz de utilizar essa pentose para crescimento quando cultivada em meio contendo esse açúcar como única fonte de carbono. Por outro lado, quando na presença de xilose e glicose no meio, essa levedura apresentou a habilidade de fermentar os dois açúcares concomitantemente. Isso é um fenótipo extremamente interessante, uma vez que em processos industriais, principalmente envolvendo hidrolisados de biomassa lignocelulósica, são utilizadas misturas de substratos (Hahn-Hagerdal *et al.* 2007).

A observação do consumo da xilose apenas na presença de glicose vai de acordo com as observações de diversos trabalhos, nos quais foram relatados que a glicose exerce uma influência direta na regulação do metabolismo de xilose (Olofsson *et al.* 2008, Runquist *et al.* 2010). A presença de glicose é responsável por estimular o metabolismo de xilose, isso ocorre uma vez que o metabolismo dessa hexose garante a presença de intermediários como: glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e metabólitos C3 (Boles *et al.* 1996, Meinander *et al.* 1999). A presença desses intermediários também é responsável por induzir a atividade de diferentes enzimas glicolíticas (Boles *et al.* 1996, Meinander *et al.* 1999). Nesse caso, o metabolismo da glicose também pode estar sendo chave para a regeneração de NADPH, cofator de maior preferência na redução da xilose pelo *GRE3* endógeno, por meio da via das pentoses-fosfato, explicando o xilitol como principal produto dessas fermentações.

Outra questão levantada pelo consumo da xilose apenas na presença de glicose pode ser o tipo de transporte realizado por esse transportador. Uma delas é que o transportador em questão pode ter uma atividade de transporte ativo secundário, na qual a molécula de açúcar é transportada juntamente com o acoplamento de um íon  $H^+$  a partir da energia gerada por um potencial eletroquímico. Ao encontrar apenas xilose no meio, as células utilizam suas reservas de energia no transporte dessa pentose, mas não consegue suportar os próximos passos do metabolismo (Wang *et al.* 2015a). Por outro lado, na

presença de glicose, essas leveduras podem realizar o processo de glicólise, gerando energia e íons  $H^+$ , capazes de participar no transporte dos dois monossacarídeos (Leandro *et al.* 2006). Isso pode explicar o consumo bastante parecido tanto de xilose quanto de glicose, sendo que em todas as fermentações foi observada uma quantidade pouco maior de glicose consumida do que a xilose. No entanto, nenhuma dessas teorias podem ser confirmadas até que sejam realizados experimentos voltados à essa questão. Um ensaio envolvendo a medição do influxo de prótons em células ou membrana, durante adição glicose e/ou xilose no meio seria uma maneira possível de elucidar o tipo de transporte realizado por essa proteína (Leandro *et al.* 2006). O acompanhamento do pH ao longo dos processos fermentativos também nos daria indícios acerca dessa questão.

A partir desses resultados e análises, também é possível imaginar que a afinidade pelos açúcares é bastante parecida, no entanto, apenas um estudo cinético desses transportadores seria capaz de elucidar melhor essa questão.

O principal produto resultante das cofermentações com alta biomassa foi o xilitol, o qual foi convertido com rendimento que variou de 0,39 a 0,62  $g.g^{-1}$ . A conversão de xilose em xilitol é realizada pela xilose redutase, uma aldose codificada pelo gene *GRE3* endógeno de *S. cerevisiae* (Kuhn *et al.* 1995).

Não foi observado um aumento significativo na biomassa e, diferentemente da curva de crescimento utilizando apenas glicose, não foi observada a produção de glicerol. Quando a co-fermentação foi realizada em meio contendo aproximadamente 20  $g.L^{-1}$  dos dois açúcares houve a formação de uma pequena quantidade de etanol, que diminuiu após algumas horas. As taxas de consumo dos açúcares foram parecidas com um trabalho de Li *et al.* 2016. Nesse trabalho a linhagem EBY.VW4000 foi utilizada para analisar a modificação do transportador GXS1 de *Candida intermedia* para permitir a coutilização de glicose e xilose (Li *et al.* 2016).

## 6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, a levedura EBY.VW4000 foi utilizada para analisar o funcionamento de novos transportadores. Foram identificados três possíveis novos transportadores por meio de análises filogenéticas. O transportador Saico se mostrou funcional em levedura *S. cerevisiae*, permitindo a cofermentação de glicose e xilose por essa levedura. É o primeiro transportador identificado da espécie *Saitoella complicata* e da família *Protomycetaceae*.

Diante desses resultados, podemos concluir que nesse trabalho foi descoberto um novo transportador de açúcares.

## 7 PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, Saico é um transportador heterólogo promissor e pode ser utilizado na construção de linhagens mais robustas e adequadas. Dessa maneira, será possível analisar a viabilidade da utilização desse transportador em futuros processos industriais.

Além da utilização de outras linhagens de *S. cerevisiae*, outras estratégias podem ser empregadas para a otimização desse transportador.

Entre elas, o bloqueio do processo de ubiquitinação se apresenta como uma das principais estratégias. Sabe-se que alguns transportadores, sobretudo aqueles de baixa afinidade, são endocitados e degradados em vacúolos em situações de baixos níveis de glicose (Snowdon & van der Merwe 2012, Roy *et al.* 2014). Existem trabalhos nos quais modificações dos resíduos de lisina presentes nas extremidades C- e N- terminal dos transportadores resultaram em melhoras na utilização de xilose, indicando que essa é uma preocupação a se levar em conta na utilização de transportadores em *S. cerevisiae* (Nijland *et al.* 2016, Knychala 2017).

O funcionamento dos outros transportadores prospectados nesse trabalho devem ser mais investigados. As construções plasmidiais, bem como as linhagens geradas devem ser checadas novamente, por meio de sequenciamento ou metodologias mais adequadas para garantir que os genes estão presentes e suas sequências estão íntegras dentro do plasmídeo construído.

## 8 RESUMO PARA PÚBLICO GERAL

Entre os grandes desafios da ciência nos dias de hoje, um dos maiores é a diminuição da utilização de fontes de energia não-renováveis. As fontes não-renováveis são aquelas que não serão geradas pela natureza durante um longo período de tempo, ou seja, são fontes finitas. Entre essas fontes estão: petróleo, gás natural e o carvão mineral. Elas são utilizadas em indústrias para a obtenção de uma ampla gama de produtos, como por exemplo combustíveis (gasolina e diesel) e compostos derivados (plástico, borracha, entre outros). Esses processos são altamente poluentes e liberam substâncias tóxicas na atmosfera, contribuindo para o chamado Efeito Estufa, além de provocar diversos malefícios à saúde humana. A distribuição de maior parte dessas matérias é restrita a poucas regiões, gerando diversos conflitos ambientais, sociais e econômicos em decorrência de disputas envolvendo o acesso a essas reservas.

A sociedade atual ainda é extremamente dependente dessas fontes não renováveis, e a busca por fontes alternativas vem se tornando cada vez mais urgente. Em contraste às fontes citadas no parágrafo acima, existem as fontes de energia renováveis. Esse tipo de fonte é regenerada pela natureza em curtos períodos de tempo, entre eles podem ser citadas a energia solar e biomassa. Entre eles, a biomassa vem chamando bastante atenção de uma parte da comunidade científica. Um tipo especial, chamado biomassa lignocelulósica é extremamente interessante porque é formada pelas partes não comestíveis das plantas, como a palha do milho, o bagaço da cana-de-açúcar, gramíneas e madeira. Essa biomassa apresenta diversos açúcares, como glicose, xilose, arabinose, galactose e manose, e outros compostos químicos.

Durante as últimas duas décadas, os componentes das biomassas lignocelulósicas foram utilizados em diversas pesquisas para a obtenção de produtos interessantes, como biocombustíveis (bioetanol e biodiesel). A obtenção desses produtos é realizada por diversos microrganismos. Entre eles, estão as leveduras, um tipo de fungo que está altamente presente nas nossas vidas há muito tempo. Elas são utilizadas como fermentos biológicos e estão

envolvidos na produção de cervejas e vinhos. Entre elas, a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* se apresenta como uma das grandes protagonistas.

As leveduras são capazes de produzir produtos por um conjunto de reações químicas que ocorrem em seu interior, melhor conhecidas pelo termo metabolismo. De acordo com seu metabolismo, a levedura é capaz de utilizar os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica e transformá-los em outros compostos químicos. Cientistas são capazes de modificar e manipular o metabolismo dessas leveduras para que elas passem a produzir novos compostos, ou que produzam compostos naturais mais eficientemente. Esta área é conhecida como Engenharia Metabólica, e pode produzir modificações no funcionamento natural da levedura, ou introduzir material genético de outros organismos na levedura de interesse.

Uma das estratégias que a engenharia genética foca seus esforços é no transporte de açúcares pela célula. Os açúcares são a principal fonte de energia das células, e logo, dos microrganismos. Este transporte de açúcares é realizado por proteínas especiais conhecidas como transportadores. Este grupo de proteínas é bastante diverso, podendo ser específicos para alguma molécula em especial ou conseguirem transportar mais de um tipo de molécula.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o bioetanol pode ser obtido a partir do aproveitamento de glicose, o açúcar mais abundante em biomassas lignocelulósicas e utilizado amplamente por todos os microrganismos. No entanto, diversas técnicas de engenharia genética foram capazes de induzir em *S. cerevisiae* a produção de bioetanol a partir de xilose que é o segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica, mas poucos organismos são capazes de utilizar eficientemente. Seguindo essa lógica, os transportadores de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam uma alta preferência pelo transporte de glicose, enquanto o transporte de xilose é realizado em segundo plano, apenas quando a glicose já foi praticamente totalmente utilizada. Isso faz com que processos envolvendo esses dois açúcares levem um tempo maior para que ambos sejam completamente utilizados.

Esse trabalho teve o objetivo de buscar um novo transportador, que seja capaz de transportar xilose e glicose à velocidades parecidas. Para isso, foi utilizado uma linhagem especial de *S. cerevisiae*, que não apresenta os transportadores naturais, permitindo a análise dos novos transportadores.

Neste trabalho, foi descoberto um novo transportador de açúcares, capaz de permitir a levedura utilizar glicose e xilose ao mesmo tempo, sem a preferência por um ou outro. Apesar de ser um trabalho inicial, a descoberta desse transportador é uma novidade e abre a possibilidade de sua utilização para otimizar linhagens já empregadas na indústria, para a produção de novos compostos, e para o aproveitamento de novas matérias primas ricas em xilose que atualmente não são aproveitadas em todo seu potencial.

## 9 BIBLIOGRAFIA

Aduse-Opoku J, Mitchell W. Diauxic growth of *Clostridium thermosaccharolyticum* on glucose and xylose. **FEMS microbiology letters**. 1988;50(1):45–49.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 5a edição. Porto Alegre. Editora Artmed. 2010.

Almeida J R, Modig T, Petersson A, Hähn-Hagerdal B, Lidén G, Gorwa-Grausland MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 2007 Apr 82;4:340–349.

Almeida JR, Runquist D, Sánchez i Nogué V, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol J**. 2011 Mar;6(3):286-99.

Almeida JR, Fávaro LC, Quirino BF. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnol Biofuels**. 2012 Jul 18;5(1):48.

Apel AR, Ouellet M, Szmidt-Middleton H, Keasling JD, Mukhopadhyay A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Sci Rep**. 2016 Jan 19;6:19512.

Bauer F, Coenen L, Hansen T, McCormick K, Palgan YV. Technological innovation systems for biorefineries: a review of the literature. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. 11 (3), 534-548.

Berthels NJ, Cordero Otero RR, Bauer FF, Thevelein JM, Pretorius IS. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Res**. 2004 May;4(7):683-9.

Boles E, Müller S, Zimmermann FK. A multi-layered sensory system controls yeast glycolytic gene expression. **Mol Microbiol**. 1996 Feb;19(3):641-2.

Brondijk TH, Konings WN, Poolman B. Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol**. 2001 Jul;176(1-2):96-105.

Carrasco C, Baudel HM, Sendelius J, Modig T, Roslander C, Galbe M, Hahn-Hagerdal B, Zacchi G, Lindén G. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**. 2010 Feb 46:64–73.

Chu BC, Lee H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnol Adv**. 2007 Sep-Oct;25(5):425-41.

Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. **Nature**. 2014 Jun 5;510(7503):121-5.

Dias MO, Junqueira TL, Cavalett O, Cunha MP, Jesus CD, Rossell CE, Maciel Filho R, Bonomi A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresour Technol**. 2012 Jan;103(1):152-61.

Du J, Li S, Zhao H. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Mol Biosyst**. 2010 Nov;6(11):2150-6.

Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. **Appl Environ Microbiol**. 2000 Aug;66(8):3381-6.

Ellen MacArthur Foundation. Towards the circular economy. Disponível em: <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/assets/downloads/publications/Ellen-MacArthur-Foundation-Towards-the-Circular-Economy-vol.1.pdf>. 2013.

Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, Oreb M, Boles E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014 Apr 8;111(14):5159-64.

Giersch RM, Finnigan GC. Yeast Still a Beast: Diverse Applications of CRISPR/Cas Editing Technology in *S. cerevisiae*. **Yale J Biol Med**. 2017 Dec 19;90(4):643-651.

Guillaume C, Delobel P, Sablayrolles JM, Blondin B. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. **Appl Environ Microbiol**. 2007 Apr;73(8):2432-9.

Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol**. 2006 Dec;24(12):549-56.

Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2007 Apr;74(5):937-53. Review.

Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**. 2002 Sep;148(Pt 9):2783-8.

Harhangi HR, Akhmanova AS, Emmens R, van der Drift C, de Laat WT, van Dijken JP, Jetten MS, Pronk JT, Op den Camp HJ. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. **Arch Microbiol**. 2003 Aug;180(2):134-41.

Hatanaka H, Omura F, Kodama Y, Ashikari T. Gly-46 and His-50 of yeast maltose transporter Mal21p are essential for its resistance against glucose-induced degradation. **J Biol Chem**. 2009 Jun 5;284(23):15448-57.

Hector RE, Qureshi N, Hughes SR, Cotta MA. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2008 Sep;80(4):675-84.

Heringa J. Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. **Comput Chem**. 1999 Jun 15;23(3-4):341-64.

Hirai T, Heymann JA, Shi D, Sarker R, Maloney PC, Subramaniam S. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. **Nat Struct Biol**. 2002 Aug;9(8):597-600.

Hong KK, Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. **Cell Mol Life Sci**. 2012 Aug;69(16):2671-90.

Iancu CV, Zamoon J, Woo SB, Aleshin A, Choe JY. Crystal structure of a glucose/H<sup>+</sup> symporter and its mechanism of action. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013 Oct 29;110(44):17862-7.

IEA Bioenergy. Biorefineries: adding value to the sustainable utilisation of biomass. T42:2009:01.

Jansen MLA, Bracher JM, Papapetridis I, Verhoeven MD, de Bruijn H, de Waal PP, van Maris AJA, Klaassen P, Pronk JT. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS Yeast Res**. 2017 Aug 1;17(5).

Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J Mol Biol.** 1999 Sep 17;292(2):195-202.

Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers.** 1983 Dec;22(12):2577-637.

Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. **Bioinformatics.** 2005 Jun;21 Suppl 1:i251-7.

Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2004 Nov;66(1):10-26.

Knychala MM. Transporte e fermentação de xilose, xelobiose e xilobiose por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina. 2017.

Kuhn A, van Zyl C, van Tonder A, Prior BA. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol.** 1995 Apr;61(4):1580-5.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol.** 2018 Jun 1;35(6):1547-1549.

Kuyper M, Harhangi HR, Stave AK, Winkler AA, Jetten MS, de Laat WT, den Ridder JJ, Op den Camp HJ, van Dijken JP, Pronk JT. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Res.** 2003 Oct;4(1):69-78.

Kuyper M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Res.** 2004 Mar;4(6):655-64.

Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Res.** 2005 Feb;5(4-5):399-409.

Leandro MJ, Gonçalves P, Spencer-Martins I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. **Biochem J.** 2006 May 1;395(3):543-9.

Lee H. The structure and function of yeast xylose (aldose) reductases. **Yeast.** 1998 Aug;14(11):977-84. Review.

Li H, Schmitz O, Alper HS. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2016 Dec;100(23):10215-10223.

Li X, Park A, Estrela R, Kim SR, Jin YS, Cate JH. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Rep (Amst).** 2016 Jan 22;9:53-56.

Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Botstein D. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. **Gene.** 1987;58(2-3):201-16

Maranhão AQ. Transformação Bacteriana. In: De-Souza MT, Brígido MM, Maranhão AQ (Org.). *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. Brasília: Editora UnB, 2016. p 215-230.

Meinander NQ, Boels I, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains

expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpression of TAL1. **Bioresour Technol.** 1999;68:79–87.

Marger MD, Saier MH Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends Biochem Sci.** 1993 Jan;18(1):13-20.

Marques WL, Raghavendran V, Stambuk BU, Gombert AK. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Res.** 2016 Feb;16(1):fov107.

Mattanovich D, Sauer M, Gasser B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microb Cell Fact.** 2014 Mar 6;13(1):34.

Mizutani K. High-throughput plasmid construction using homologous recombination in yeast: Its mechanisms and application to protein production for X-ray crystallography. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2015;79:1–10.

Moysés DN, Reis VC, de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **Int J Mol Sci.** 2016 Feb 25;17(3):207.

Mumberg D, Müller R, Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene.** 1995 Apr 14;156(1):119-22.

Nakamura T, Yamada KD, Tomii K, Katoh K. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. **Bioinformatics.** 2018 Jul 15;34(14):2490-2492.

Naumov GI, Naumova ES, Michels CA. Genetic variation of the repeated MAL loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. **Genetics.** 1994 Mar;136(3):803-12.

Nijland JG, Vos E, Shin HY, de Waal PP, Klaassen P, Driessen AJ. Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**. 2016 Jul 26;9:158.

Nijland JG, Shin HY, de Jong RM, de Waal PP, Klaassen P, Driessen AJ. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**. 2014 Nov 29;7(1):168.

Nordhoff S. Editorial: Food vs fuel--the role of biotechnology. **Biotechnol J**. 2007 Dec;2(12):1451.

Ohgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresour Technol**. 2007 Sep;98(13):2503-10.

Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol Biofuels**. 2008 May 1;1(1):7.

Paes B. G, Almeida J R M. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 1:21, p. 1–10, 2014.

Paes BG. Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 2015.

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour. Technol**. 2000;74:25–33. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3.

Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Mol Biol Evol.** 2009 Jul;26(7):1641-50.

Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2016 Feb;17(2):123-32.

Ramos S, Schuldiner S, Kaback HR. The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1976 Jun;73(6):1892-6.

Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH Jr. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **FEBS J.** 2012 Jun;279(11):2022-35.

Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur J Biochem.** 1997 Apr 15;245(2):324-33.

Rémond C, Aubry N, Crônier D, Noël S, Martel F, Roge B, Rakotoarivonina H, Debeire P, Chabbert B. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. **Bioresour Technol.** 2010 Sep;101(17):6712-7.

Riley R, Haridas S, Wolfe KH, Lopes MR, Hittinger CT, Göker M, Salamov AA, Wisecaver JH, Long TM, Calvey CH, Aerts AL, Barry KW, Choi C, Clum A, Coughlan AY, Deshpande S, Douglass AP, Hanson SJ, Klenk HP, LaButti KM, Lapidus A, Lindquist EA, Lipzen AM, Meier-Kolthoff JP, Ohm RA, Otilar RP, Pangilinan JL, Peng Y, Rokas A, Rosa CA, Scheuner C, Sibirny AA, Slot JC, Stielow JB, Sun H, Kurtzman CP, Blackwell M, Grigoriev IV, Jeffries TW. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2016 Aug 30;113(35):9882-7

Roy A, Kim YB, Cho KH, Kim JH. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. **Biochim Biophys Acta**. 2014 Sep;1840(9):2878-85.

Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**. 2010 Mar 17;3:5.

Saha B. C. Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology Structure and Composition of Lignocellulosic Biomass. **American Chemical Society**, p. 2–33, 2004.

Saier MH Jr. Families of transmembrane sugar transport proteins. **Mol Microbiol**. 2000 Feb;35(4):699-710.

Saloheimo A, Rauta J, Stasyk OV, Sibirny AA, Penttilä M, Ruohonen L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2007 Apr;74(5):1041-52.

Sharma HK, Xu C, Qin W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-17, 2017.

Sharma NK, Behera S, Arora R, Kumar S, Sani RK. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **J Biosci Bioeng**. 2018 Mar;125(3):259-267.

Shin HY, Nijland JG, de Waal PP, de Jong RM, Klaassen P, Driessen AJ. An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**. 2015 Nov 2;8:176.

Snowdon C, van der Merwe G. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**. 2012;7(12):e50458.

Solis-Escalante D, van den Broek M, Kuijpers NG, Pronk JT, Boles E, Daran JM, Daran-Lapujade P. The genome sequence of the popular hexose-transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain EBY.VW4000 reveals LoxP/Cre-induced translocations and gene loss. **FEMS Yeast Res**. 2015 Mar;15(2).

Sun L, Zeng X, Yan C, Sun X, Gong X, Rao Y, Yan N. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. **Nature**. 2012 Oct 18;490(7420):361-6.

Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. **Fundam Appl Toxicol**. 1984 Oct;4(5):843-53. Review.

UNCTAD - Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento. Second Generation Biofuel Markets: State of Play, Trade and Developing Country Perspectives. Geneva: United Nations, 2016.

Van Leeuwen CC, Weusthuis RA, Postma E, Van den Broek PJ, Van Dijken JP. Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. **Biochem J**. 1992 Jun 1;284 (Pt 2):441-5.

van Leeuwen J, Andrews B, Boone C, Tan G. Construction of Multifragment Plasmids by Homologous Recombination in Yeast. **Cold Spring Harb Protoc**. 2015 Sep 1;2015(9):pdb.top084111.

Wang C, Bao X, Li Y, Jiao C, Hou J, Zhang Q, Zhang W, Liu W, Shen Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metab Eng**. 2015 Jul;30:79-88.

Wang C, Bao X, Li Y, Jiao C, Hou J, Zhang Q, Zhang W, Liu W, Shen Y. Data set for cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Data Brief**. 2015 May 19;4:119-26.

Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**. 1999 Dec 31;464(3):123-8.

Wiselolgel, A., Biomass feedstock resources and composition. in: Wyman, C. (Ed.), Handbook on Bioethanol Production and Utilization, Taylor and Francis Washington, DC 1996, pp. 108–118.

Yan N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. **Annu Rev Biophys**. 2015;44:257-83.

Young E, Poucher A, Comer A, Bailey A, Alper H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Appl Environ Microbiol**. 2011 May;77(10):3311-9.

Young EM, Tong A, Bui H, Spofford C, Alper HS. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014 Jan 7;111(1):131-6.

Zhang GC, Liu JJ, Ding WT. Decreased xylitol formation during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* due to overexpression of water-forming NADH oxidase. **Appl Environ Microbiol**. 2012 Feb;78(4):1081-6.