UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Iasmin Cartaxo Taveira

**Engenharia do sistema de transporte de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* por
expressão heteróloga de transportadores de açúcar de *Trichoderma reesei***

Ribeirão Preto

2021

Iasmin Cartaxo Taveira

Engenharia do sistema de transporte de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* por expressão heteróloga de transportadores de açúcar de *Trichoderma reesei*

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Taveira, Iasmin Cartaxo

Engenharia do sistema de transporte de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* por expressão heteróloga de transportadores de açúcar de *Trichoderma reesei*.

92p. il., 30 cm.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva

1. *Trichoderma reesei*. 2. Transportadores de açúcar. 3. Xilose, 4. *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Biocombustíveis.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taveira, I. C.

Engenharia do sistema de transporte de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* por expressão heteróloga de transportadores de açúcar de *Trichoderma reesei*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação à todos os cientistas e pesquisadores que desde 2019 têm trabalhado arduamente a fim de desvendar os mistérios da COVID-19 e contornar todos os males que essa doença trouxe para nossa geração. À eles dedico meu respeito e este trabalho como forma de honrar todos os seus esforços.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e mais importante agradecimento sempre será ao meu pai, que me ensinou o valor do trabalho e sempre me orientou a trabalhar com o que amo para que cada dia de trabalho fosse gratificante. A jornada tem sido difícil, mas no final de cada desafio tenho encontrado o prazer de aprender algo novo. Portanto, obrigada por me propiciar seguir esse caminho sempre me apoiando. Na verdade, pai, obrigada por tanto!

Nesse sentido, gostaria de agradecer aos demais familiares que me deram apoio e me teceram elogios de admiração. Cada palavra me deu mais força para seguir meu caminho!

Agradeço aos amigos paraibanos que, apesar da distância sempre se fizeram presentes na minha vida. Vocês são força e conforto. Obrigada por existirem!

Agradeço de coração aos amigos que fiz aqui, que fizeram a distância de casa ser menor e fizeram da nossa amizade um lar intangível. Em especial, agradeço ao David por ser meu maior parceiro nessa jornada de cientista e no dia-a-dia, e ao Henrique que sempre foi meu abrigo mais aconchegante em Ribeirão.

Agradeço ao João, meu namorado, que chegou na metade dessa jornada e que, desde então, me empurrou pra frente quando eu mais precisava de impulso pra continuar. Você mudou minha vida, você trouxe cor e você se tornou o meu lugar de refúgio aqui em Ribeirão. Obrigada por estar do meu lado em todos os meus desafios.

Sou muito grata ao meu orientador, Roberto, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no LBM e por ter me acolhido na família que você construiu nesse laboratório tão querido. Obrigada pela orientação nos momentos em que eu estava perdida e obrigada por todos os momentos compartilhados, desde aqueles dedicados a discutir ciência até aqueles mais descontraídos!

Sou extremamente grata à todos aqueles que compuseram o LBM durante a execução deste trabalho. Sou extremamente honrada por ter compartilhado o conhecimento de vocês e por tudo que vocês me ensinaram nesses anos, sou extremamente grata.

Em particular, agradeço à Karol que me ensinou tanto, que me guiou tanto, que me apoiou tanto. Em mim tens uma fã que te admira profissional e pessoalmente.

Sou grata ainda aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia que sempre me ajudaram quando precisei, principalmente à Ivone e às técnicas de laboratório.

Agradeço à CAPES e a FAPESP pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro na execução desse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Itachi Uchiha disse ao Naruto uma vez que “Não importa o quão poderoso você se torne nunca tente fazer tudo sozinho, caso contrário irá falhar”, isso sempre me lembra que nossa jornada só vale a pena quando compartilhada. Portanto, obrigada a todos que compartilharam os desafios do mestrado comigo, sem vocês eu não estaria aqui.

“Toda criança começa como um cientista nato. Nós é que tiramos isso delas. Só umas poucas passam pelo sistema com sua admiração e entusiasmo pela ciência intactos.”

Carl Sagan

RESUMO

TAVEIRA, I. C. Engenharia do sistema de transporte de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* por expressão heteróloga de transportadores de açúcar de *Trichoderma reesei*., 2021. 92f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Devido ao crescimento constante da demanda de energia e também ao forte apelo do uso de combustíveis menos danosos ao ambiente, a produção de etanol de segunda geração ganha destaque. Sendo a etapa de fermentação ainda um ponto com limitante para uma produção rentável de etanol 2G, onde a co-fermentação de glicose e xilose é o principal objetivo. Nesse contexto, estudos com transportadores de açúcares têm sido realizados a fim de aumentar a eficiência da bioconversão de biomassa lignocelulósica a etanol, através do melhoramento do transporte de xilose. Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar o consumo de xilose, através da construção de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* melhorada geneticamente. O primeiro passo foi a inserção da via oxirredutora de metabolismo da xilose foi inserida na linhagem de *S. cerevisiae* (*URAΔ352*, *TRP1Δ63*). Após confirmada a construção da linhagem de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar xilose, os transportadores de xilose de *T. reesei* codificados pelos genes Tr62380 e Tr82309 foram inseridos na levedura. Tr62380 melhorou significativamente o transporte de xilose quando comparada a levedura sem transportadores heterólogos. A expressão de Tr82309 nesse sistema ainda requer mais análises para conclusão a respeito da capacidade dessa proteína de transportar xilose.

Palavras chave: 1. *Trichoderma reesei*. 2. Transportadores de açúcar. 3. Xilose, 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. Biocombustíveis.

ABSTRACT

TAVEIRA, I. C. Engineering of the xylose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of sugar transporters from *Trichoderma reesei*, 2021. 92f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Due to the constant growth in energy demand and also the strong appeal of using fuels that are less harmful to the environment, the production of second generation ethanol is highlighted. The fermentation stage is still a limiting point for a profitable 2G ethanol production, where the co-fermentation of glucose and xylose is the main objective. In this context, studies with sugar transporters have been carried out in order to increase the efficiency of the bioconversion of lignocellulosic biomass to ethanol, through the improvement of xylose transport. Therefore, the objective of this work was to optimize the consumption of xylose, through the construction of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* genetically improved. The first step was the insertion of the oxi-reductive pathway of xylose metabolism was inserted in the strain of *S. cerevisiae* (*URAΔ352*, *TRP1Δ63*). After confirming the construction of the strain of *S. cerevisiae* capable of metabolizing xylose, the *T. reesei* xylose transporters encoded by genes Tr62380 and Tr82309 were inserted into the yeast. Tr62380 significantly improved xylose transport when compared to yeast without heterologous transporters. The expression of Tr82309 in this system still requires further analysis to conclude on the ability of this protein to transport xylose.

Key words: 1. *Trichoderma reesei*. 2. Sugar transporters. 3. Xylose, 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. Biofuels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da lignocelulose e seus principais componentes. Fonte: Adaptado de Raud <i>et al.</i> , 2019.....	23
Figura 2 – Fluxograma esquemático da produção de etanol 2G. Fonte: Oliveira, 2012.....	26
Figura 3 – Esquema de conformações alternadas previstas para o transporte por proteínas da família MFS. Fonte: Adaptado de Yan, 2015.....	29
Figura 4 – Esquema das rotas metabólicas de xilose e da desintoxicação de furfural e HMF. Fonte: Cunha <i>et al.</i> , 2019.....	31
Figura 5 – Mapa do plasmídeo pRH274 utilizado para inserção da rota de metabolismo de xilose. O mapa foi criado no <i>software SnapGene</i>	41
Figura 6 – Mapa do plasmídeo pRH195 e sítios de restrição para as enzimas Sall e SpeI. O mapa foi criado no <i>software SnapGene</i>	43
Figura 7 - <i>Heat map</i> dos transportadores de açúcares de <i>Trichoderma reesei</i> QM9414 diferencialmente expressos no cultivo com xilose durante 12, 24 e 48 horas em relação ao glicerol. <i>Heat map</i> construído no <i>software</i> Mev 4.9.1a clusterização gênica foi feita pelo método <i>Average Linkage</i> utilizando <i>Euclidean Distance</i> como distância métrica, a escala de expressão está representada como Log2.....	51
Figura 8 – Imagens do <i>docking</i> molecular entre os transportadores e a xilose. A) Proteína inteira dockada com a xilose; B) Sítio da proteína onde as interações apolares entre os aminoácidos do sítio de ligação e a xilose estão evidenciadas nas linhas pontilhadas amarelas, já as polares aparecem em roxo.....	54
Figura 9 – Árvore filogenética com base na sequência de aminoácidos de 22 transportadores envolvidos no transporte de xilose. Cada proteína está indicada de	

acordo com a espécie dos organismos que as produzem, seguido do gene. A identificação dos genes que já foram nomeados foi usada para identificação, no entanto, aqueles genes ainda não nomeados foram citados de acordo com sua identificação no JGI ou Genbank. O gene Tr67507 foi usado como *outgroup*.....57

Figura 10 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de transportadores envolvidos no transporte de xilose. A imagem destaca a conservação de motivos e resíduos envolvidos com o transporte de xilose. Em roxo estão os motivos e aminoácidos conservados previamente descritos na literatura com envolvimento no transporte de xilose; em vermelho estão os aminoácidos conservados encontrados a partir das análises de *docking* molecular neste trabalho.....61

Figura 11 - Mapa do plasmídeo pRH274 (SnapGene) utilizado para inserção da rota de metabolismo de xilose e resultado da PCR de amplificação do fragmento de 980pb proveniente de amostras de DNA dos seis transformantes analisados (colônias 1 a 6) e do controle (7).....63

Figura 12 – Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e microscopia de fluorescência das cepas transformantes expressando Tr62380 e Tr82309 fusionados à GFP. As células vivas foram visualizadas em um microscópio Leica DMI6000B (Leica, Heidelberg, Alemanha) usando a lente objetiva de imersão em óleo de ampliação 100 ×. Imagens de campo claro de contraste de fase e fluorescentes foram gravadas usando o software LAS AF (Leica).....65

Figura 13 – A) Curva de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* em meio YNB (0,7%) e xilose (2%) por 120 horas. B) Análise estatística da OD600 dos transformantes em relação a Sc::pRH274 em 84 horas. A estatística foi feita através do One-way ANOVA, usando o teste de múltiplas comparações de Dunnett (LEE; LEE, 2018).....67

Figura 14 – A) Mapa do plasmídeo pRH195 contendo os cassetes de expressão dos transportadores e resultado da amplificação por PCR dos fragmentos dos transportadores fusionadas à GFP a partir da extração do DNA genômico total das linhagens analisadas, e esquema ilustrativo dos cassetes de expressão. B) A banda de

1364pb corresponde a região interna do cassete do Tr62380 fusionado à GPF, enquanto a banda de 958pb corresponde a região interna do cassete do Tr82309 fusionado à GPF.....69

Figura 15 – Análise do crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* capazes de consumir xilose transformadas com os transportadores e da linhagem controle.....71

Figura 16 – A) Consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol pelas leveduras capazes de utilizar xilose contendo transportadores de açúcar de *T. reesei* e do controle sem transportadores. No ponto de 96 horas foi realizada uma análise estatística do consumo de açúcares e da produção de etanol dos transformantes em relação a Sc::pRH274. A estatística foi feita através do *One-way* ANOVA, usando o teste de múltiplas comparações de Dunnett (LEE; LEE, 2018) B) Crescimento das linhagens analisadas em meio contendo xilose e xilose + glicose.....74

Figura 17 – Análise microscópica das linhagens transformadas com os transportadores de *T. reesei* de cultivos contendo xilose como única fonte de carbono e de um cultivo contendo xilose e glicose.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para verificação da expressão gênica dos transportadores de açúcares candidatos.....	36
Tabela 2 – Lista de proteínas usadas para <i>BLASTp</i> e os respectivos organismos que as produzem.....	39
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos a serem inseridos na levedura para recombinação homóloga.....	42
Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da montagem do cassete de expressão dos transportadores de açúcar de <i>T. reesei</i>	47
Tabela 5 – Parâmetros de validação dos modelos gerados pelo Robetta.....	52
Tabela 6 – Energia de interação expressa em KJ/mol resultante do <i>docking</i> molecular entre os transportadores e os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica.....	53
Tabela 7 – Lista de aminoácidos, e suas respectivas posições na sequência, de aminoácidos que apresentaram interação com a xilose visualizado no <i>PyMOL</i>	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 A biomassa lignocelulósica	22
2.2 A produção de etanol 2G	24
2.3 <i>Trichoderma reesei</i> e os transportadores de açúcar.....	27
2.4 <i>S. cerevisiae</i> na produção de etanol 2G	29
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	35
4.1 Linhagens utilizadas e condições de cultivo.....	35
4.2 Identificação de potenciais transportadores de xilose em <i>T. reesei</i>	35
4.3 Modelagem de proteínas e Docking molecular	38
4.4 Análises filogenéticas	39
4.4.1 Árvore filogenética	39
4.4.2 Conservação de aminoácidos envolvidos no transporte de xilose	40
4.5 Construção da linhagem Sc::pRH274	40
4.6 Construção das linhagens Sc::pRH274::Tr62380 e Sc::pRH274::Tr82309	41
4.7 Transformação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (<i>URAΔ352</i> , <i>TRP1Δ63</i>).....	43
4.8 Localização subcelular dos transportadores	44
4.9 Seleção de transformantes para execução de análises de consumo de açúcar e produção de etanol.....	45
4.10 Adaptação laboratorial.....	45
4.11 Confirmação molecular dos transformantes	46
4.12 Análise de crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol.....	47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Identificação de potenciais transportadores de xilose em <i>T. reesei</i>	50
5.2 Modelagem de proteínas e Docking molecular	52
5.3 Análises filogenéticas de transportadores de xilose	55
5.3.1 Árvore filogenética	55
5.3.2 Conservação de aminoácidos envolvidos no transporte de xilose	58
5.4 Construção da linhagem Sc::pRh274	62
5.5 Contrução das linhagens Sc::pRH274::Tr62380 e Sc::pRH274::Tr82309	63
5.6 Seleção de transformantes para execução de análises de rendimento da fermentação	66
5.7 Confirmação da inserção do cassete Tr62380::GFP e Tr82309::GPF	68
5.8 Adaptação Laboratorial	70
5.9 Análise de crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol.....	71
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. Introdução

O crescimento populacional dos últimos 50 anos refletiu diretamente no aumento do consumo de energia de fontes primárias, dentre elas, destacam-se os combustíveis fósseis (ACHEAMPONG *et al.*, 2017). Os combustíveis fósseis são fontes energéticas não renováveis e sua combustão está relacionada com o aumento do aquecimento global. Neste contexto, o uso de combustíveis fósseis tem duas implicações críticas à nível mundial. A primeira está num cenário ambiental e a segunda está num contexto econômico, onde a redução dos depósitos desse tipo de combustível e a volatilidade dos seus preços geram uma crise energética (ACHEAMPONG *et al.*, 2017; BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013).

Levando em consideração a importância dessas implicações à nível mundial, o sétimo dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU abrange a questão energética. Esse objetivo visa fornecer energia limpa a todos, sendo assim, busca aumentar a eficiência energética mundial através de fontes energéticas renováveis. A fim de suprir essa demanda energética com fontes alternativas ao uso de combustíveis fósseis, os biocombustíveis representam fontes renováveis viáveis de grande interesse econômico (ACHEAMPONG *et al.*, 2017; JAHIRUL *et al.*, 2012).

Os biocombustíveis são essencialmente produzidos a partir de matéria prima vegetal e podem ser classificados de acordo com sua origem. Os biocombustíveis mais comuns são os de primeira e segunda geração. Biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de culturas de alimentos como grãos e cana-de-açúcar, enquanto os biocombustíveis de segunda geração derivam de resíduos agroflorestais e agroindustriais, como a biomassa lignocelulósica. Devido a origem dos biocombustíveis de primeira geração, alguns conflitos são atribuídos à produção desses combustíveis. Em termos de questões ambientais, a necessidade de aumentar as áreas cultiváveis para aumentar a produção dos combustíveis de primeira geração gera conflitos de interesses ecológicos. Já em termos éticos e sociais, o principal conflito gira em torno da garantia de que o uso dessa fonte de energia não irá afetar a segurança alimentar (MOHR; RAMAN, 2013).

Neste contexto, o bioetanol é o principal e mais importante biocombustível líquido com maior potencial para substituir os combustíveis fósseis, apresentando diversas vantagens que variam desde um baixo custo de produção até os benefícios

econômicos e ambientais (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Atualmente, Estados Unidos (EUA) e Brasil lideram o mercado mundial da produção de etanol de primeira geração, representando juntos cerca de 85% da produção mundial total. A matéria prima principal utilizada pelos EUA para produção do combustível é o milho, enquanto o Brasil utiliza cana-de-açúcar (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

Por possuir clima ideal para cultivo de cana-de-açúcar, o Brasil é um dos maiores produtores do mundo dessa gramínea e, por isso sua fonte primária de biomassa lignocelulósica é o bagaço de cana (BC) (CARPIO; SIMONE DE SOUZA, 2017). O bagaço de cana é gerado após a moagem da cana-de-açúcar para produção do etanol de primeira geração e é utilizado para produção de etanol de segunda geração. Algumas etapas do processo de obtenção do etanol 2G representam entraves econômicos para viabilizar a produção industrial desse combustível (AZHAR, S. H. M.; ABDULLA *et al.*, 2017; ZABED *et al.*, 2017).

Devido os conflitos que decorrem da produção das matérias primas dos biocombustíveis de primeira geração, o etanol de segunda geração harmoniza uma diversidade de vantagens. Sendo assim, muitas pesquisas focam em viabilizar a produção de etanol 2G de modo a torná-lo competitivo com o mercado, diminuindo os custos de produção e aumentando a eficiência do processo de obtenção desse biocombustível. Essa motivação parte do fato de que produzir etanol 2G é aproximadamente o dobro mais caro que produzir etanol 1G e que o rendimento da produção de etanol 2G ainda é cerca de 2,2 vezes menor que de etanol 1G (KHATIWADA *et al.*, 2016). Além disso, muito já é discutido sobre a integração dos processos de produção de etanol de primeira e segunda geração, a fim de garantir eficiência energética e diminuir os custos de produção para o processo de conversão de lignocelulose (VAN ZYL *et al.*, 2011).

Neste contexto, este trabalho visou desenvolver estratégias para diminuir o custo de produção do etanol 2G, melhorando o desempenho fermentativo de linhagens de *S. cerevisiae* através da expansão de seu sistema de transporte de açúcares do meio extra para o meio intracelular, a fim de aumentar a disponibilidade de açúcar a ser fermentado. Para isso, transportadores de açúcar específicos para os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica de *T. reesei* foram expressos nesta levedura. O sistema de transportadores de açúcar do fungo *T. reesei* foi escolhido para esse estudo uma vez que ele é o mais estudado na degradação da biomassa lignocelulósica, por

ser principal produtor de enzimas capazes de degradar esse substrato (DE PAULA et al., 2018).

2. Referencial Teórico

2.1 A biomassa lignocelulósica

A coleta da biomassa lignocelulósica é o começo de todo processo de produção do etanol de segunda geração, é obtido a partir de resíduos agrícolas (bagaço de sorgo doce, bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de milho), resíduos florestais e culturas energéticas, como plantas herbáceas ou lenhosas (AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2020). Sendo a única forma renovável de carbono orgânico da natureza e abundantemente disponível (totalizando uma produção global de até 1,3 bilhões de toneladas por ano), a biomassa aparece como resposta mais evidente para substituição de produtos derivados do petróleo no geral (BARUAH *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2020). A biomassa pode ser usada para diferentes finalidades desde a produção de energia até a produção de químicos finos, sendo que nas últimas décadas o apelo da crise energética tem trazido os olhares para produção de biocombustíveis a partir dessa matéria-prima, como o etanol de segunda geração (BARUAH *et al.*, 2018). Em 2016 estimava-se que cerca de 4 a 10% de toda biomassa produzida no mundo estava acessível para produção de biocombustíveis, sendo que se toda biomassa fosse utilizada cerca de 442 bilhões de litros de etanol poderiam ser produzidos (ZABED *et al.*, 2016).

Considerando que a biomassa seja uma fonte de matéria-prima com alto potencial no setor bioenergético, a sustentabilidade das plantas que são base para obtenção da biomassa deve ser levada em consideração. O ideal seria encontrar plantas com rápido crescimento e alto rendimento na produção de biomassa, a depender da distribuição geográfica, disponibilidade de água, das condições de solo e climáticas. O Brasil, por exemplo, já possui o mercado de etanol produzido a partir de cana-de-açúcar bem estabelecido, apresentando a maior eficiência de produção no setor de bioenergia do país, garantido a posição de mais competitivo produtor de bioetanol do mundo. Atualmente o bagaço produzido a partir da cana-de-açúcar é majoritariamente queimado para produção de energia elétrica (cerca de 50%), no entanto, simulações por computador estimam que mesmo utilizando o bagaço para outras finalidades, o uso do restante deste resíduo poderia aumentar a produção de etanol em 40% no país (DE SOUZA *et al.*, 2014; MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015).

A biomassa lignocelulósica possui alta complexidade estrutural (Imagem 1), cuja composição a partir de cana-de-açúcar é 42 - 48% de celulose, 19 - 25% de hemicelulose e 20 - 42% de lignina (BENOCCI *et al.*, 2017; ZABED *et al.*, 2017). A celulose é um homopolissacarídeo cuja composição é de monômeros de D-glicose dispostos linearmente da estrutura da biomassa, cujo empacotamento é mantido por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares com outros polímeros de celulose e com a hemicelulose. (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo amorfo e ramificado que ao ligar-se à celulose e lignina forma o esqueleto rígido que dá forma à biomassa, sendo composto de pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), ácidos urônicos e derivados acetilados. Sua cadeia principal é mantida por ligações β -1, 4 que incluem D-xilose (cerca de 90%) e L-arabinose (cerca de 10%) (RAUD *et al.*, 2019; ZABED *et al.*, 2016). Já a lignina é um complexo tridimensional de três álcoois aromáticos que liga-se à celulose e hemicelulose por ligações covalentes e de hidrogênio, conferindo resistência e proteção a estrutura lignocelulósica (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; ZABED *et al.*, 2016). O bagaço de cana possui os maiores teores de glucana (60-70% da biomassa) e xilana (30-40% da biomassa), e menores taxas de arabinana dentre os materiais lignocelulósicos (KWAK; JIN, 2017; VIEIRA *et al.*, 2020).

Figura 1 – Estrutura da lignocelulose e seus principais componentes. Fonte: Adaptado de Raud *et al.*, 2019.

2.2 A produção de etanol 2G

A qualidade do etanol de segunda geração é dependente de uma bioconversão dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica a etanol bem sucedida, assim como do sucesso de cada etapa da cadeia produtiva: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação ou recuperação do produto (Figura 2) (ADITIYA *et al.*, 2016; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). Quanto mais açúcares fermentescíveis estiverem presentes, maiores as taxas de fermentação (VIEIRA *et al.*, 2020).

A alta complexidade e sua estrutura rígida tornam a biomassa lignocelulósica um composto recalcitrante e resistente à quebra. Nesse sentido, o pré-tratamento é uma etapa fundamental para garantir que a lignina seja removida e promover desconstrução dos polímeros da holocelulose ao expô-los através de métodos físico-químicos ou bioquímicos, de modo a favorecer a etapa de hidrólise. A escolha do pré-tratamento depende do tipo de biomassa lignocelulósica e de suas características. (ADITIYA *et al.*, 2016; BARUAH *et al.*, 2018). No entanto, a etapa de pré-tratamento ao liberar os açúcares fermentescíveis o substrato lignocelulósico produz substâncias indesejáveis, tais como, aldeídos de furano (furfural, 5-hidroximetil furfural (HMF), fenólicos (vanilina), ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico). Essas substâncias são prejudiciais à etapa de fermentação e, por isso, recomenda-se detoxificar o hidrolisado (BHATIA *et al.*, 2020). Após isso, a fase hidrolítica promove a sacarificação da biomassa expondo os açúcares que irão ser substrato da fermentação (ADITIYA *et al.*, 2016; RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017). Assim, os polissacarídeos são convertidos à monômeros de açúcares que são reduzidos, fermentados e, por fim, o etanol de segunda geração é obtido (SOCCOL *et al.*, 2010).

O fato de haver separação entre o pré-tratamento, etapa de hidrólise e fermentação reflete num aumento do custo da produção de etanol de segunda geração (PANDEY *et al.*, 2019). Dentre as soluções buscadas para contrapor os gargalos da produção do etanol 2G, destacam-se aquelas voltadas para minimizar os onerosos gastos da produção de enzimas utilizadas na etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica. (BORIN *et al.*, 2015). Além disso, tendo em vista a variedade de açúcares liberados no processo de hidrólise, é notória a importância da utilização de todos os açúcares liberados na etapa hidrolítica. No entanto, a

Saccharomyces cerevisiae, organismo mais utilizado para processos fermentativos na indústria, não é capaz de fermentar as pentoses liberadas do bagaço de cana hidrolisado. Assim, para garantir uma alta eficiência da fermentação de biomassa lignocelulósica, é preciso haver uma eficiente utilização de pentoses na fermentação a fim de aumentar a eficiência do processo (MARTINS *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a pesquisa de transportadores de açúcar aparece como uma ferramenta que aborda a resolução dos empecilhos que as etapas de hidrólise e fermentação representam para viabilizar economicamente a produção de etanol 2G.

Figura 2 – Fluxograma esquemático da produção de etanol 2G. Fonte: Oliveira, 2012.

2.3 *Trichoderma reesei* e os transportadores de açúcar

De modo geral, fungos filamentosos representam uma fonte para produção de enzimas de interesse industrial de grande relevância. No que diz respeito a produção de etanol de segunda geração, fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais conhecidos por produzirem enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica, as holocelulases (SCARCELLA *et al.*, 2021). Nesse sentido, o sistema de transporte de açúcares desses fungos também é extremamente eficiente e, por isso, muitos trabalhos tem focado na identificação e caracterização de transportadores específicos para os diferentes substratos da biomassa lignocelulósica (NOGUEIRA, K. M. V. *et al.*, 2020).

Dentre os fungos mais estudados, o *Trichoderma reesei* destaca-se na produção de holocelulases em escala industrial para produção de etanol 2G. Apesar disso, quando comparado a outros fungos lignocelulolíticos, *T. reesei* não possui um grande arsenal de enzimas. Então, sua eficiência na degradação da biomassa lignocelulósica é atribuída à uma regulação fina de seu sistema enzimático devido sua capacidade de sentir e transportar diferentes substratos que regulam a indução da expressão e secreção de enzimas (DOS SANTOS CASTRO *et al.*, 2014). Nesse contexto, a pesquisa com transportadores de açúcar é fundamental para entender a regulação da produção de enzimas, diferencialmente modulada de acordo com o substrato e possibilita entender os caminhos que a engenharia dessas proteínas pode desempenhar na otimização do processo de obtenção do etanol 2G (GUPTA *et al.*, 2016).

Além disso, uma vez que *T. reesei* metaboliza naturalmente a biomassa lignocelulósica, seu sistema de transporte para os diferentes açúcares presentes na biomassa é extremamente eficiente. Nesse sentido, além de serem fundamentais para otimizar a etapa hidrolítica, a busca por transportadores de *T. reesei* com alta especificidade para os açúcares do hidrolisado também aparece como uma ferramenta fundamental para otimizar a etapa de fermentação (JIANG *et al.*, 2020). Sendo assim, uma vez que glicose e xilose são os açúcares mais presentes na biomassa lignocelulósica, a busca por transportadores que garantam um transporte simultâneo de ambos os açúcares tem grande destaque em estratégias de desenvolvimento de leveduras que fermentem esses açúcares ao mesmo tempo (KIM *et al.*, 2012; OSIRO *et al.*, 2018).

Transportadores são em geral proteínas de membrana que catalisam o movimento de substratos específicos através de membranas. 5% do genoma de *T. reesei* compreende genes com função de transporte e cerca de 16% desses genes transportadores são regulados por XYR1 (um dos principais genes de regulação da expressão de enzimas celulolíticas) dependendo da fonte de carbono (DOS SANTOS CASTRO et al., 2016). Em *T. reesei* duas famílias de transportadores são conhecidas: *ATP-binding cassette* (ABC) e *major facilitator superfamily* (MFS). A família MFS é pouco estudada e representa uma grande família de proteínas ancestral e diversas, o que as torna um ótimo alvo de estudo. Através da análise da homologia de várias proteínas de membrana em *T. reesei*, foram identificados cerca de 148 genes pertencentes à família MFS (CHAUDHARY et al., 2016).

Os transportadores MFS são proteínas de membrana que transportam uma diversidade de substratos do lado extracelular para o lado intracelular, sendo aqueles envolvidos com o transporte de carboidratos fundamentais para manutenção do metabolismo e homeostase energética em todos reinos da vida, mediando o transporte de mono e dissacarídeos (YAN, 2013). As proteínas dessa família funcionam como carreadores que adquirem duas conformações (Figura 3), uma voltada fora da bicamada lipídica e outra voltada para dentro da bicamada, permitindo o acesso alternado ao local de ligação do substrato à proteína de cada lado da membrana (YAN, 2015). Esse mecanismo de transporte de acesso alternado pode ser visto como análogo ao ajuste induzido da catálise enzimática, onde o substrato inicialmente tem uma interação fraca com a proteína, mas se ajusta muito bem no estado de transição (QUISTGAARD et al., 2016). Nesse caso, o substrato modula alostericamente a estrutura da proteína mediando as alterações responsáveis pelo transporte do substrato do meio extra para o intracelular (QUISTGAARD et al., 2016; YAN, 2015). É possível aplicar esse mecanismo a transportadores que realizam uniporte, simporte e antiporte (QUISTGAARD et al., 2016).

Figura 3 – Esquema de conformações alternadas previstas para o transporte por proteínas da família MFS. “C” indica o domínio C-terminal e “N” indica o domínio N-terminal. Fonte: Adaptado de Yan, 2015.

As proteínas MFS são compostas por 400 a 600 resíduos de aminoácidos predominantemente hidrofóbicos e contêm duas porções, os domínios N- e C-terminais, compostos por 12 α -hélices transmembranares (TM), cuja via de translocação do substrato está localizada na interface entre os domínios (NOGUEIRA, K. M. V. *et al.*, 2020; WISEDCHAI SRI *et al.*, 2014). Outra característica desse grupo é sua inespecificidade para diferentes substratos, porém, cada isoforma possui especificidades e propriedades cinéticas diferenciadas para cada açúcar (DOS REIS *et al.*, 2017; ZHANG, W. *et al.*, 2015).

2.4 *S. cerevisiae* na produção de etanol 2G

A *S. cerevisiae* é a levedura clássica mais usada para processos fermentativos, sendo amplamente usada na indústria de etanol (LIN; TANAKA, 2006). Devido ser historicamente usada para fermentação alcoólica, esta levedura apresenta tolerância aos diferentes estresses do processo fermentativo, tornando-a excelente para produção de etanol (BASSO *et al.*, 2008).

Apesar de bem estabelecidas na fermentação alcoólica produzindo o etanol de

primeira geração, a *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar pentoses presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar e, portanto, a eficiência da fermentação é reduzida (CABALLERO; RAMOS, 2017). Nesse sentido, muitas pesquisas tem voltado sua atenção para aumentar o rendimento da fermentação a partir dessa matéria-prima. Um dos mais estudados assuntos que visam solucionar esse problema é construir linhagens eficientes no metabolismo de xilose, uma vez que este é o segundo açúcar mais abundante da biomassa lignocelulósica (SHIN *et al.*, 2019).

Dessa forma, desenvolver linhagens capazes de co-fermentar glicose e xilose é uma estratégia promissora para otimizar o rendimento fermentativo (PAPAPETRIDIS *et al.*, 2018). Neste contexto, o primeiro passo para desenvolver leveduras eficientes na fermentação de xilose é construir linhagens capazes de usar a xilose como substrato. Para isso, duas vias metabólicas vêm sendo amplamente usadas a fim de construir linhagens de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar xilose a partir da expressão heteróloga de enzimas de consumidores naturais de xilose, sendo elas a via oxirredutase e a via da xilose isomerase (Figura 4) (CUNHA *et al.*, 2019).

A via oxirredutase é composta por duas enzimas, onde a primeira enzima da via, xilose redutase (XR) reduz a xilose à xilitol, usando preferencialmente NADPH como cofator, há então oxidação do xilitol à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) usando NAD^+ como cofator. Essa via é limitada por um desequilíbrio do cofator entre o XR dependente de NADPH e o XDH dependente de NAD^+ , causando acúmulo de xilitol e reduzindo a produção de etanol. *S. cerevisiae* possui um gene que codifica uma enzima capaz de converter xilose em xilitol, *GRE3*, que é dependente de NADPH aumentando o desbalanço de cofatores e reduzindo o rendimento fermentativo. Apesar disso, um benefício encontrado no uso dessa via é uma melhor resistência à compostos tóxicos como o furfural e o HMF (CUNHA *et al.*, 2019) Por outro lado, a via da xilose isomerase converte a xilose diretamente em xilulose, que apesar de não formar nenhum co-produto, tem um consumo de xilose inicialmente menor. Ao final, o rendimento da produção de etanol é significativamente maior por essa via do que pela via oxirredutase. Por fim, a xilulose kinase fosforila a xilulose e gera a xilulose-5-fosfato, que por sua vez entra na via das pentoses fosfato e segue até a fermentação

alcoólica (PARACHIN *et al.*, 2011; VERAS; PARACHIN; ALMEIDA, 2017).

Figura 4 – Esquema das rotas metabólicas de xilose e da detoxificação de furfural e HMF.

Fonte: Cunha *et al.*, 2019.

Além de encontrar estratégias para metabolizar a xilose, é fundamental que a captação desse açúcar seja eficiente. *S. cerevisiae* não possui transportadores de xilose específicos e, portanto, o transporte desse açúcar em linhagens selvagens acontece inespecificamente através de transportadores de hexoses em baixas taxas de captação (DOS REIS *et al.*, 2016). Portanto, estratégias que buscam melhorar esse sistema de transporte vem sendo alvo de muitas pesquisas. As pesquisas variam desde o melhoramento desse transporte através de mutações em transportadores de hexoses, até a busca por transportadores específicos de xilose (YOUNG, E. M. *et al.*, 2014).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* eficiente no transporte de xilose através da expressão heteróloga de transportadores de xilose de *T. reesei*.

3.2 Objetivos específicos

- i. Analisar a expressão gênica de proteínas pertencentes à família das MFS permeases em *T. reesei* cultivado em xilose a fim de encontrar transportadores específicos para essa pentose.
- ii. Analisar as características filogenéticas dos transportadores selecionados e realizar docagem molecular a fim de triar as proteínas com maior potencial para transportar xilose eficientemente.
- iii. Construir linhagens de *S. cerevisiae* contendo rotas metabólicas e transportadores de xilose.
- iv. Analisar o rendimento fermentativo das leveduras transformadas.

4. Metodologia

4.1 Linhagens utilizadas e condições de cultivo

Para identificação dos potenciais transportadores de xilose, a linhagem QM9414 foi selecionada e cultivada em meio MEX a 30°C durante o período de 7 a 10 dias, até a completa esporulação. Para os experimentos seguintes uma suspensão de esporos (NaCl 0,8% (p/v); tween 80 0,05% (v/v)) do QM9414 foi inoculada em Erlenmeyer de 1L contendo 200mL de meio Mandels-Andreotti contendo 2% (p/v) de xilose, sendo a linhagem previamente crescida em meio Mandels-Andreotti suplementado com glicerol por 24 horas. Os frascos foram incubados a 200rpm, em agitador orbital, a 30°C por 12, 24 e 48. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra. Após a indução, os micélios foram coletados por filtração, congelados e estocados a -80°C.

Para conduzir as análises da influência dos transportadores de xilose selecionados a linhagem industrial de *S. cerevisiae* (*URA*Δ352, *TRP1*Δ63) derivada da linhagem PE-2 JAY291 foi utilizada. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gustavo Goldman. A levedura foi inicialmente cultivada em placas contendo meio YNB (0,7%), suplementado com uracila (0,1g/L), triptofano (0,1g/L) e glicose (2%). À medida que foram adicionados os plasmídeos contendo as marcas de auxotrofia, a suplementação com aminoácidos foi cessada.

4.2 Identificação de potenciais transportadores de xilose em *T. reesei*

Os micélios de *T. reesei* crescidos nas condições citadas acima foram filtrados em Miracloth, congelados em nitrogênio líquido e macerados. O RNA total de cada amostra foi extraído utilizando-se o reagente da Life Technologies TRIzol® RNA, de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA, 1µg de RNA foi primeiramente tratado com DNaseI para remoção de DNA genômico. Após essa etapa, fitas de cDNAs foram sintetizadas usando-se o kit Maxima™ First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) de acordo com instrução do fabricante. Os mesmos foram utilizados para análise por PCR em Tempo Real no equipamento Bio-Rad CFX96™, usando SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), de acordo com

as instruções do fabricante. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade total de cDNA presente em cada reação. Os primers utilizados foram feitos a partir da ferramenta Real Time PCR tool no site da IDT (<https://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) (Tabela 2), que gera os melhores pares de primers a partir das sequências gênicas das proteínas. As sequências foram obtidas no site JGI *Trichoderma reesei* 2.0 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para verificação da expressão gênica dos transportadores de açúcares candidatos.

Oligonucleotídeos	Sequências
F – 56684	5' CACAACCCTCTCTATGCTGATG '3
R – 56684	5' GGGCACGATATTTGGGATATGA '3
F – 50894	5' GGCGGTGTCTTGTATGGTTAC '3
R – 50894	5' ATCGTATTCTCCCATGTGCTG '3
F – 69563	5' CGGTCACAGCACAGATAACA '3
R – 69563	5' TATCCAGAGTGTCCCAGATGTA '3
F – 56289	5' CTGTAGCCCTCAACTTCATCTC '3
R – 56289	5' ACCCAAGATGGGTAGCAAAG '3
F – 59333	5' GTTCCTCGTCGAAGGCTTAAT '3
R – 59333	5' CGATCTGTGAACCATCCCTAAG '3
F – 67541	5' GCATTGGCTGCGTTCTTATC '3
R – 67541	5' GTTGCCAGAATGCCAATGAG '3
F – 80058	5' CGGCTCGTGACACGTATTAT '3
R – 80058	5'CGGTTTCCTCGGAATAGTAAACA '3
F – 54632	5' TTTCTGCATGGGTTCTGGG '3
R – 54632	5' TCTACCTTGGTCGCAATTCTC '3
F – 69712	5' GACTCAGTGAAGCCTGCATAG '3
R – 69712	5' AGTTGCCGATAGACCACATAAC '3
F – 121482	5' CTGCTGAGAAACCGACCTTTA '3
R – 121482	5' AACAAGGGCAGGAACAATCT '3
F – 104816	5' TTGGCGGATTCTTGGATTT '3
R – 104816	5' TCCGAGGAAGAGGATGAAGA '3

Oligonucleotídeos	Sequências
F – 3532	5' GGCTTCTCTGCCGACATTAT '3
R – 3532	5' TCGCAGCAAAGGATATGTAAGA '3
F – 82309	5' GCAGAGCTACTTCTCCATGTT '3
R – 82309	5' CGCAATACCGATCCACTCTT '3
F – 104320	5' AACCTAGCCTCCCTACTCTTC '3
R – 104320	5' AAAGCGGCGATCCAAGTATAG '3
F – 78833	5' GCTCCT ACG TCTTCTTCAACTT '3
R – 78833	5' GCATTGGTAATCTCGGGTATCT '3
F – 105260	5' CAGCAGTTCTCCGGAATCAA '3
R – 105260	5' ACGAGTCCGAATCCCATAGA '3
F – 21595	5' GGACAGCCACCAGAACTTT '3
R – 21595	5' GTACACGACGGAGAGGTAGAT '3
F – 22912	5' TGGTCGGATGTATCATTTGGG '3
R – 22912	5' GGACCTGAGCAGATTCGATAC '3
F – 68812	5' CTTCTTCGCTGCTCACTTCT '3
R – 68812	5' TTGGCACCCATACAAATACC '3
F – 76897	5' TTGTCGTCCATCGGCTAAAG '3
R – 76897	5' CCAGACTTGCCAGTCAGTAAA '3
F – 70830	5' CTCACTGTACATCCTGGGATT '3
R – 70830	5' CCGTGCCTATCGAGAACAAT '3
F – 5000	5' ATTGCCGGTATGAGCAAAGA '3
R – 5000	5' CCAATCTTGCGGATGAGGAT '3
F – 65915	5' GCTCTTTATGCTGCCGACTA '3
R – 65915	5' GACAAAGGAGGCTTGGTATGA '3
F – 69901	5' TGACGAGCTCTTTGCTACTG '3
R – 69901	5' CTTCCCTTTGTCTGCCTCTT '3
F – 62380	5' CGCCCTCATCATCTACTTCTTC '3
R – 62380	5' GGAACCCATTTGGAGCTCTT'3
F – 75165	5' ATGAAGCAACCAGACCACTC '3
R – 75165	5' TGTAGGTCGCGCATTGTT '3
F – 111888	5' ATGGCTTCCGTGGTATGTTC '3
R – 111888	5' GCTGAGTCAAGTTGGCTACTA '3

Oligonucleotídeos	Sequências
F – 6005	5' GAGGAGAGGAGACTGGTTAGAA '3
R – 6005	5' AGATGGCACGGTTGATGTT '3
F – 106330	5' CCTGTACATTGTGGGCATCT '3
R – 106330	5' CGACGCAGCCCATAGATAAA '3
F – 65583	5' CTTCTTTGCGGGCTTCTTTG '3
R – 65583	5' GACTGGTCCCATTAATCCAGTAG '3

4.3 Modelagem de proteínas e Docking molecular

Os transportadores de *T. reesei* diferencialmente expressos durante cultivo na presença de xilose como única fonte de carbono foram selecionados pra estudos de *docking* molecular a fim de analisar a afinidade desses transportadores pelos diferentes açúcares provenientes da hidrólise da biomassa lignocelulósica.

Os modelos foram construídos utilizando o servidor Robetta, que é um serviço de previsão de estrutura de proteína baseado em *Deep learning* relativamente rápido e preciso, TrRosetta, e uma interface de envio interativa que permite alinhamentos de sequência personalizados para modelagem. Para seleção do *template* de cada proteína foi feito um BLASTp das sequências de aminoácidos de cada gene com a sequência de aminoácidos de 5 genes de transportadores de açúcar da família MFS permeases (Tabela 3). Os *templates* com maior identidade foram selecionados para modelagem de cada proteína, com exceção do Tr62380. Para o Tr62380 o *template* utilizado foi aquele com a segunda maior identidade, uma vez que o modelo gerado com o *template* de maior identidade não passou pelos critérios de validação das estruturas. A validação dos modelos seguiu a metodologia de Maués, (2017). O docking foi feito usando a metodologia descrita por Nogueira *et al.* (2018).

Tabela 2 – Lista de proteínas usadas para *BLASTp* e os respectivos organismos que as produzem

Organismo	Código da proteína no PDB
<i>Escherichia coli</i>	1pv7
<i>Escherichia coli</i>	4gby
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4lds
<i>Homo Sapiens</i>	4pyp
<i>Arabidopsis thaliana</i>	6h7d

Para realizar a análise de docking, a estrutura de todos os ligantes foi baixada do banco de dados PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccom/pound>) no formato MOL2. (lactose, maltose, manose, xilose, sofrorose e frutose). O arquivo PDB dos modelos foram carregados para o software iGEMDOCK junto com todos os ligantes, e o docking foi realizado usando configurações padrão, com um tamanho de população de 200 e um total de 70 gerações (HSU *et al.*, 2011; YANG, 2004; YANG; CHEN, 2004; YANG; FRANK HSU, 2005). Os parâmetros de pós-docking foram analisados e a melhor postura encaixada (*best pose*) para cada ligante foi visualizada por The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.8.6.0 Schrödinger, LLC (<https://pymol.org/2/>).

Sendo o alvo deste trabalho a busca por transportadores capazes de melhorar o transporte de xilose, os dois transportadores com maior afinidade para xilose foram selecionados para expressão heteróloga na linhagem industrial de *S. cerevisiae* (*URA352*, *TRP1Δ63*) derivada da linhagem PE-2 JAY291.

4.4 Análises filogenéticas

4.4.1 Árvore filogenética

A fim de entender a relação filogenética dos transportadores diferencialmente expressos em todos os tempos da análise de RT-qPCR, foi construída uma árvore filogenética com alguns transportadores previamente descritos na literatura como transportadores envolvidos no transporte de xilose em diferentes organismos (COLABARDINI *et al.*, 2014; NOGUEIRA, K. M. V. *et al.*, 2020, 2018; SHARMA *et al.*, 2018; SLOOTHAAK *et al.*, 2016).

O alinhamento e a árvore filogenética foram feitos usando o software MegaX pelo método ClustalW. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbour-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A árvore de consenso bootstrap inferida a partir de 1000 repetições foi considerada para representar a história evolutiva dos táxons analisados. Ramificações correspondentes a partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas de bootstrap são reduzidas. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método (ZUCKERKAND; L, 1965) e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. Esta análise envolveu 22 sequências de aminoácidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção de exclusão em pares). Havia um total de 794 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

4.4.2 Conservação de aminoácidos envolvidos no transporte de xilose

Usando o alinhamento feito para construção da árvore filogenética, foram identificados resíduos previamente descritos como fundamentais para o transporte de xilose nos transportadores analisados neste trabalho. O alinhamento foi visualizado e editado com o software Jalview 2.11.1.4 (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

Além de identificar aminoácidos conservados com base em sequências previamente descritas na literatura, este trabalho também identificou aminoácidos que podem ser importantes para o transporte de xilose a partir das interações desse açúcar com aminoácidos que apareceram envolvidos no transporte de xilose através de análises *in silico* de docking molecular. As interações foram observadas através do PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.8.6.0 Schrödinger, LLC (<https://pymol.org/2/>).

4.5 Construção da linhagem Sc::pRH274

Uma vez que *S. cerevisiae* não utiliza a xilose naturalmente, a via metabólica oxirredutora de xilose foi inserida na levedura. A via é composta pelas enzimas da via

oxirredutora de metabolismo da xilose com as enzimas: xilose redutase (codificada pelo gene *XYL1*) e xilitol desidrogenase (codificada pelo gene *XYL2*) de *Pichia stipitis*; e xilulose kinase (codificada pelo gene *XKS1*) de *S. cerevisiae*. O plasmídeo utilizado foi o pRH274, que contém como marca de auxotrofia o gene *URA3*. O plasmídeo foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Gustavo Goldman. A transformação seguiu o protocolo de Gietz e Schiestl, 2007.

Figura 5 – Mapa do plasmídeo pRH274 utilizado para inserção da rota de metabolismo de xilose. O mapa foi criado no *software SnapGene*.

Os transformantes positivos selecionados por complementação de auxotrofia de *URA3* foram então confirmados através de reação de PCR utilizando DNA genômico como *template* e iniciadores específicos para o gene *xyl1* contido no vetor pRH274 (*Xyl1_Fw* 5' CCAAGTCGAAGCTGTTGACGTCC 3'; *Xyl1_Rv* 5' AGCGGTGACAGCAATACCACGG 3').

4.6 Construção das linhagens Sc::pRH274::Tr62380 e Sc::pRH274::Tr82309

Para construção do cassete de expressão dos transportadores de açúcar, as sequências Tr62380 e Tr82309 foram fusionadas com GFP. As sequências das ORFs dos transportadores foram amplificadas a partir do cDNA de *T. reesei*, previamente usado para análise de expressão gênica deste trabalho. Já a sequência do GFP foi amplificada a partir do plasmídeo pMCBapx. Os primers foram desenhados contendo

regiões de homologia de aproximadamente 20bp para possibilitar a recombinação homóloga. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar os fragmentos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos a serem inseridos na levedura para recombinação homóloga

Oligonucleotídeos	Sequências
F – 62380	5'GTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCCTTAGAC ATGCTCCTCGTG 3'
R – 62380	5'GTTTTTTTAAATTTTAATCAAAATGACCGTTACCTTC GACCAG 3'
F – 82309	5'TTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCCTCCTTT GGCTCGGCAACTTG 3'
R – 82309	5'GTTTTTTTAAATTTTAATCAAAATGACCGTCCTCACC TCACCT 3'
F – GFP	5'GAATTAATAAAAGTGTTTCGTTAACGCCAAGCTTGC ATGC 3'
R – GFP	5'GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTT TCACTGG 3'

A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima *Phusion High Fidelity DNA Polymerase*. Foram adicionados à reação 100 ng de cDNA; 5 µL de 5X *Phusion HF Buffer*; oligonucleotídeos na concentração de 0,02 mM para o gene Tr82309, 0,04mM para o gene Tr62380 e GFP; 1 µL de dNTPs 10 mM; 0,25 µL da enzima *Phusion DNA Polymerase* e água Nuclease-Free para completar o volume de 25 µL de reação total. A ciclagem utilizada para amplificação dos transportadores foi: desnaturação inicial de 30 seg a 98°C, 40 ciclos de 10 seg a 98°C, 40 seg a 58°C para Tr62380 e 59°C para Tr82309, 40 seg a 72°C, e extensão final de 10 min a 72°C. A ciclagem utilizada para amplificação do GFP foi: desnaturação inicial de 30 seg a 98°C, 40 ciclos de 10 seg a 98°C, 40 seg a 58°C, 30 seg a 72°C, e extensão final de 10 min a 72°C. Em seguida, os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (em tampão

TAE 1X) sob luz ultravioleta utilizando *ChemiDoc*TM XRS. O DNA foi purificado e quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop* 2000 (*Thermo Scientific*).

O plasmídeo utilizado para transformação e montagem do cassete foi o pRH195, que contém como marca de auxotrofia o gene *trp1* (Figura 6). Para construção do cassete através de recombinação homóloga o plasmídeo foi inicialmente linearizado usando as enzimas de restrição *SpeI* and *Sall* *Fastdigest* – *Thermo Scientific* de acordo com instruções do fabricante. A banda referente ao plasmídeo digerido foi excisada do gel de agarose e purificada utilizando o Gel Band Purification (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante.

A construção do cassete se deu via recombinação homóloga (MA et al., 1987). Ambos os plasmídeos utilizados para a transformação foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Goldman.

Figura 6 – Mapa do plasmídeo pRH195 e sítios de restrição para as enzimas *Sall* e *SpeI*. O mapa foi criado no software SnapGene.

4.7 Transformação das linhagens de *S. cerevisiae* (URAΔ352, TRP1Δ63)

Para obtenção das células competentes, foi feito um pré-inóculo de *S. cerevisiae* (URAΔ352, TRP1Δ63) em 10 mL de meio YNB (0,7%), suplementado com glicose (2%), uracila (0,1g/L), uridina (0,1g/L) e/ou triptofano (0,1g/L), de acordo com a auxotrofia. O pré-inóculo foi incubado durante 16h a 30° C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, foi realizado inóculo também em meio YNB (0,7%), suplementado

com glicose (2%), uracila (0,1g/L), uridina (0,1g/L) e/ou triptofano (0,1g/L), de acordo com a auxotrofia, incubado por 4 h a 30° C sob agitação de 200 rpm. Após tal procedimento, foi realizada centrifugação a 5000 g durante 5 minutos por duas vezes e em seguida o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de solução 1x de TE/Acetato de lítio 1 M. Após a ressuspensão, foi utilizado 100 µL de células competentes para cada transformação.

Para transformação da levedura foi preparado um mix (mix 1) contendo 100µg da ORF dos genes de interesse, 100 µg ORF do GFP, 100 µg de vetor pRH195 digerido e espermatozoides de salmão (10 mg/mL). Um segundo mix (mix 2) foi preparado contendo: 800 µL de PEG 3350 50%, 100 µL de acetato de lítio 10x e 100 µL de água Milli-Q autoclavada. Em seguida, 600 µL de mix 2 foi adicionado ao mix 1 sendo esta mistura homogeneizada por inversão e incubada a 30°C por 30 minutos sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, adicionou-se 70 µL de DMSO, sendo as amostras incubadas a 42°C por 15 minutos e em seguida por banho de gelo 2 minutos. Por fim, 700 µL de água Milli-Q foram adicionados na reação, e centrifugou-se por 30 segundos a 13.000 g e o sobrenadante foi plaqueado em meio seletivo YNB (0,7%) suplementado com glicose (2%) e triptofano (0,1g/L), ou YNB (0,7%) suplementado com glicose (2%), durante 3 a 4 dias a 30°C.

Os transformantes positivos foram selecionados de forma aleatória para experimentos posteriores.

4.8 Localização subcelular dos transportadores

A fim de confirmar a transformação nos transformantes escolhidos aleatoriamente, foi verificada a presença do GFP e a localização celular do transportador fusionado a GFP através de microscopia de fluorescência. Cada colônia de *S. cerevisiae* transformada com plasmídeo pRH195, contendo as respectivas proteínas com a fusão GFP-C-terminal, foi cultivada em meio líquido YNB (0,7%) suplementado com glicose (2%). Após 24 horas as células foram centrifugadas a 4500 rpm por 5 minutos em centrífuga 5910R da *Eppendorf*. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com meio YNB (0,7%) sem fonte de carbono. As células foram centrifugadas mais uma vez e o sobrenadante foi descartado. As células foram visualizadas no microscópio Leica DMI6000B (Leica Heidelberg, Alemanha) usando

a lente objetiva de 100x. As imagens foram salvas utilizando o software LAS AF (Leica).

4.9 Seleção de transformantes para execução de análises de consumo de açúcar e produção de etanol

Para selecionar o transformante mais eficiente no transporte de xilose para as análises posteriores de rendimento do processo fermentativo foi realizado um ensaio de crescimento em meio YNB (0,7%) suplementado com xilose (2%). Dois transformantes dos genes Tr62380 e Tr82309 foram selecionados a partir das análises de microscopia para este experimento.

A fim de determinar o melhor controle para as análises posteriores, as leveduras *S. cerevisiae* (URA Δ 352, TRP1 Δ 63), *S. cerevisiae* (URA Δ 352, TRP1 Δ 63) contendo o plasmídeo pRH274 e *S. cerevisiae* (URA Δ 352, TRP1 Δ 63) contendo os plasmídeos pRH274 e pRH195 sem transportador ou GFP também foram cultivadas em YNB (0,7%) e xilose (2%). A levedura sem plasmídeos foi suplementada com uridina e triptofano, enquanto aquela contendo apenas o plasmídeo pRH274 foi cultivada em meio seletivo suplementado com triptofano, já a levedura contendo os dois plasmídeos sem transportadores não precisou ser suplementada com nenhum aminoácido.

As leveduras foram incubadas à 30°, sob agitação de 200rpm. Para construir a curva de crescimento a OD600 foi mensurada nos tempos de cultivo de 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 e 120 horas usando o equipamento xMark (*Microplate Spectrophotometer*, BIO-RAD). Foram retiradas alíquotas de 100ul, garantido que menos de 30% do volume total seria retirado ao final do experimento.

O experimento foi conduzido em triplicata.

4.10 Adaptação laboratorial

Uma vez selecionados os transformantes com maior habilidade de crescimento em xilose, realizamos uma evolução laboratorial dos transformantes de cada gene a fim de obter transformantes ainda mais eficientes no crescimento em xilose (adaptado de SLOOTHAACK *et al.*, 2016).

Para isso, a partir de uma placa contendo YNB (0,7%) e glicose (2%), os transformantes foram repicados para uma placa de YNB (0,7%) e xilose (2%) e incubadas a 30°C por 7 dias. Após uma semana de incubação o crescimento foi analisado e os transformantes foram repicados novamente em placa de YNB (0,7%) e xilose (2%) e incubados a 30°C por 7 dias.

O controle (*S. cerevisiae* (TRP1Δ63) contendo o plasmídeo pRH274) foi repicado sob as mesmas condições. No entanto, o meio usado para sua adaptação laboratorial foi suplementado com triptofano (0,1 g/L).

As leveduras adaptadas foram estocadas em freezer -80°C.

4.11 Confirmação molecular dos transformantes

Para confirmar a correta montagem dos cassetes de expressão dos transportadores e da presença do plasmídeo pRH195 nas linhagens adaptadas, foi realizada uma PCR a partir do DNA total extraído das linhagens usando primers internos ao cassete e primers para amplificação do gene XYL1. A extração se deu através da metodologia de Sambrook e Russel, 2001. Após a extração a integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 1%. O primer *forward* foi desenhado com homologia para o GFP, enquanto os primers *reverse* foram desenhados com homologia para os genes Tr62380 e Tr82309 (Tabela 4).

A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima *Phusion High Fidelity DNA Polymerase*. Foram adicionados à reação 100 ng de cDNA; 5 µL de 5X *Phusion HF Buffer*; cada oligonucleotídeo na concentração de 0,04 mM; 1 µL de dNTPs 10 mM; 0,25 µL da enzima *Phusion DNA Polymerase* e água Nuclease-Free para completar o volume de 25 µL de reação total. A ciclagem utilizada para amplificação de ambos os transportadores foi: desnaturação inicial de 30 seg a 98°C, 40 ciclos de 10 seg a 98°C, 40 seg a 59°C, 40 seg a 72°C, e extensão final de 10 min a 72°C.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da montagem do cassete de expressão dos transportadores de açúcar de *T. reesei*

Oligonucleotídeos	Sequências
F – GFP	5' TAGTTCCCGTCGTCCTTGAA 3'
R – 62380	5' GTCTTGGGCTTTGGCATCTT 3'
R – 82309	5' GGGTTAGCGGGATCAACAAT 3'

4.12 Análise de crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol

Inicialmente foi realizado um pré-inóculo em meio seletivo conforme descrito anteriormente suplementado com glicose (2%). Após 24 horas as células foram centrifugadas a 4500 rpm por 5 minutos em centrífuga 5910R da Eppendorf. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com meio YNB (0,7%) sem fonte de carbono. As células foram centrifugadas mais uma vez e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em meio YNB (0,7%). A densidade óptica do pré-inóculo lavado foi mensurada usando o equipamento xMark (*Microplate Spectrophotometer*, BIO-RAD). Foram retiradas alíquotas de 100ul, garantido que menos de 30% do volume total seria retirado ao final do experimento.

Para o inóculo a OD₆₀₀ foi ajustada para uma OD₆₀₀ inicial de 0,05. As leveduras foram cultivadas em erlenmeyers de 125 mL em 25 mL de meio YNB (0,7%) suplementado com glicose (24,3 g/L) e xilose (32,5 g/L), e apenas na presença de xilose (32,5 g/L) sob agitação constante de 200rpm à 30° por 120 horas (adaptado de MOON *et al.*, 2013). O experimento foi conduzido em triplicata.

Foram coletadas alíquotas de 1mL da hora inicial, chamada de hora 0, e a cada 24 horas. A cada ponto de coleta também foi mensurada a densidade óptica para construção de uma curva de crescimento nas condições de análise. As amostras foram centrifugadas, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi congelado no freezer à -20°C.

As amostras coletadas no ensaio anterior foram descongeladas e o sobrenadante foi filtrado em filtro com membrana PES milipore de 0,22µm da KASVI para análise em Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). As concentrações de açúcares e etanol foram determinadas usando HPLC modelo YL9100 (Younglin) com detector de índice de refração. Nas análises foi utilizada a coluna Rezex™ ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex). A separação ocorreu a 80 ° C e a fase móvel 5 mM H₂SO₄ a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min, com a temperatura da célula detectora de 40 °C.

A fim de observar a localização celular dos transportadores nos meios de análise, foi realizada uma análise microscópica das linhagens na presença de xilose e na presença de xilose + glicose. Para isso, as células inicialmente passaram por um pré-inóculo em meio seletivo conforme descrito anteriormente suplementado com glicose (2%). Após 24 horas as células foram centrifugadas a 4500 rpm por 5 minutos em centrífuga 5910R da Eppendorf. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com meio YNB (0,7%) sem fonte de carbono. As células foram centrifugadas mais uma vez e o sobrenadante foi descartado. As leveduras foram cultivadas em tubos Falcon de 50 mL em 5 mL de meio YNB (0,7%) suplementado com glicose (24,3 g/L) e xilose (32,5 g/L), e apenas na presença de xilose (32,5 g/L) sob agitação constante de 200rpm à 30° por 24 horas. As células foram visualizadas no microscópio Leica DMI6000B (Leica Heidelberg, Alemanha) usando a lente objetiva de 100x. As imagens foram salvas utilizando o software LAS AF (Leica).

5. Resultados e discussão

5.1 Identificação de potenciais transportadores de xilose em *T. reesei*

O *T. reesei* é um fungo notoriamente eficiente na degradação da biomassa lignocelulósica. Dentre as características que o tornam excelente no uso desse substrato para obtenção de energia destacam-se seu competente sistema de transporte dos mais diversos açúcares presentes na biomassa e um bom sistema de sinalização para produção de enzimas relacionadas ao metabolismo desses diversos açúcares (HUANG *et al.*, 2020). Sendo assim, com base em estudos prévios de RNA-seq do nosso grupo de pesquisa, foi realizada uma análise da expressão gênica de 30 proteínas da família de MFS permeases de *T. reesei* na presença de xilose nos tempos de cultivo de 12, 24 e 48 horas. O objetivo desse experimento foi selecionar potenciais transportadores de xilose para expressão heteróloga em linhagens industriais de *S. cerevisiae*.

Os resultados apresentados no *heatmap* (Figura 3), mostram que há um cluster composto por 3 genes cuja expressão foi alta na presença de xilose em todos os tempos de cultivo analisados. Dentre os 3 genes desse cluster, 2 já foram previamente identificados e caracterizados como transportadores de açúcar com afinidade para xilose. Os genes identificados são os genes Tr62380 e Tr121482 e foram chamados de Str3 e Str2, respectivamente. Em análise de caracterização bioquímica na *S. cerevisiae* EBY.VW 4000 o transportador codificado pelo gene Tr62380 apresentou alta afinidade por xilose, com um baixo valor de Km e um consumo relativamente eficiente de xilose na presença de glicose (SLOOTHAACK *et al.*, 2016). A respeito do Tr82309, análises da expressão desse gene em *T. reesei* QM9414 cultivado em arabinose (HAVUKAINEN *et al.*, 2021b) e a alta expressão desse gene no cultivo em xilose neste trabalho, corroboram para indicar a importância deste gene para o metabolismo de pentoses em *T. reesei*.

Figura 7 - Heat map dos transportadores de açúcares de *Trichoderma reesei* QM9414 diferencialmente expressos no cultivo com xilose durante 12, 24 e 48 horas em relação ao glicerol. Heat map construído no software Mev 4.9.1a clusterização gênica foi feita pelo método *Average Linkage* utilizando *Euclidean Distance* como distância métrica, a escala de expressão está representada como Log2.

Devido à alta expressão gênica dos genes Tr62380 (Str3), Tr121482 (Str2) e Tr82309 em todos os tempos de análise, e também por dois deles já estarem caracterizados, esses três genes foram selecionados para experimentos posteriores.

5.2 Modelagem de proteínas e Docking molecular

Foram feitos modelos 3D dos genes Tr62380 (Str3), Tr121482 (Str2) e Tr82309. Os modelos usados para o docking molecular estavam parâmetros de validação com valores de RMSD aceitáveis, com mais de 90% dos resíduos em regiões favoráveis. Através da análise do Verify 3D foi possível observar que a estrutura terciária de todas as proteínas tinha mais de 80% de correspondência com a estrutura primária e valores de QMEAN dentro da faixa indicada (-2,0 a 2).

Tabela 5 – Parâmetros de validação dos modelos gerados pelo Robetta

	RMSD	Ramachandram	Verify3D	QMEAN	Template / Identidade (%)
Tr82309	1.405	94.09%	82.69%	0.51 ± 0.05	4lds (26,37%)
Tr62380 (Str3)	1.453	94.51%	83.60%	0.55 ± 0.05	4lds (29,49%)
Tr121482 (Str2)	0.767	95.59%	89.10%	0.60 ± 0.05	6h7d (32,11%)

Os modelos foram docados com açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, sendo 6 monossacarídeos e 2 dissacarídeos (Tabela 6). O *docking* foi feito com o objetivo de simular quais dos 3 transportadores diferencialmente expressos tinha o maior potencial de transportar xilose (Figura 8) eficientemente através da seleção do transportador com menor energia de interação com a xilose. Quanto menor a energia de interação, maior a afinidade pelo ligante.

Tabela 6 – Energia de interação expressa em KJ/mol resultante do *docking* molecular entre os transportadores e os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica

Açúcares	Energia (kj/mol)		
	Tr62380 (Str3)	Tr121482 (Str2)	82309
Manose	-53,96	-60,30	-67,47
Xilose	-53,30	-51,83	-60,64
Galactose	-58,14	-57,57	-67,09
Glicose	-59,90	-63,30	-69,42
Arabinose	-56,41	-53,68	-59,36
Ramnose	-51,88	-56,63	-58,48
Frutose	18,54	47,01	-3,82
Soforose	16,43	122,54	149,27

Nenhum dos transportadores analisados mostrou afinidade por dissacarídeos, apenas por monossacarídeos. Sendo que todos apresentaram maior afinidade por glicose do que por xilose, sendo que os transportadores Tr62380 e Tr82309 apresentaram uma menor diferença de afinidade que o Tr121482, indicando que esses dois transportadores poderiam ter maior afinidade por xilose. Devido a habilidade característica desses transportadores de transportar diversos açúcares, essa maior afinidade por glicose do que por xilose é muito observada tanto em análises de *docking* molecular (BUENO *et al.*, 2020), quanto em análises de afinidade bioquímicas mensuradas por Km (LEANDRO; GONÇALVES; SPENCER-MARTINS, 2006).

Observou-se que o transportador Tr82309 foi aquele com menor energia de ligação com a xilose, indicando que sua afinidade por xilose é potencialmente maior dentre os três transportadores, seguido do Tr62380 e Tr121482. De fato, quando analisamos o resultado do pós-*docking* é possível observar que Tr82309 é o gene com maior número de interações entre os aminoácidos dos sítios ativos e a xilose dentre as 3 proteínas em questão (Figura 8). Sloothaak *et al.* (2016) mostrou que o Tr62380 apresentava maior afinidade pela xilose que o Tr121482, o que valida os resultados obtidos *in silico*.

Figura 8 – Imagens do *docking* molecular entre os transportadores e a xilose. A) Proteína inteira docada com a xilose; B) Sítio da proteína onde as interações apolares entre os aminoácidos do sítio de ligação e a xilose estão evidenciadas nas linhas pontilhadas amarelas, já as polares aparecem em roxo.

Muito é discutido sobre a importância de determinados aminoácidos no transporte de açúcares específicos. Sabe-se que aminoácidos hidrofóbicos, não-polares e de tamanho moderado a grande costumam estar envolvidos numa maior seletividade à xilose frente à glicose, sendo a ocorrência de exclusão estérica o mecanismo que justifica essa seletividade, onde o tamanho dos aminoácidos restringe a seletividade a um açúcar pequeno, como a xilose (YOUNG, E. M. *et al.*, 2014). A análise do pós-*docking* no PyMol permitiu verificar quais aminoácidos de cada transportadores interagem com a xilose (Tabela 7). Os aminoácidos que interagiram com a xilose na análise de *docking* das 3 proteínas se adequam à essa descrição. A maioria das interações observadas na análise de *docking* consiste em interações apolares. Os aminoácidos de cada transportador que interagem através de ligações polares com a xilose estão sublinhados na Tabela 7.

Tabela 7 – Lista de aminoácidos, e suas respectivas posições na sequência de aminoácidos, que apresentaram interação com a xilose visualizado no *PyMOL*.

Proteínas	Aminoácidos								
Tr82309	<u>E55</u>	W308	G313	Y317	<u>W449</u>	L453	L454	P455	F458
Tr121482 (Str2)	E55	F61	<u>I64</u>	L66	P62	<u>M54</u>	P455		
Tr62380 (Str3)	<u>R237</u>	F240	R241	I282	K283				

5.3 Análises filogenéticas de transportadores de xilose

5.3.1 Árvore filogenética

Com o objetivo de avaliar a proximidade e homologia entre os três transportadores da família MFS diferencialmente expressas em presença de xilose e proteínas previamente descritas na literatura como transportadores dessa pentose, foi realizada uma análise filogenética (Figura 9). Para isso, as sequências dos 3 transportadores de *T. reesei* foram alinhadas com sequências de 18 proteínas envolvidas no transporte de xilose já citadas na literatura. A árvore foi dividida em grupos e as características funcionais em relação ao transporte de xilose foram analisadas.

Observa-se a formação de 5 grupos na árvore construída, onde 4 desses grupos aparentam compartilhar um ancestral comum assinalado em vermelho na árvore filogenética. O transportador codificado pelo gene 69957 de *T. reesei*, do grupo destacado em vermelho, foi agrupado num clado totalmente separado. Este transportador de açúcar foi recentemente caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa e, apesar de ser capaz de transportar xilose, análises *in silico* demonstraram que este transportador possui maior afinidade por dissacarídeos, como celobiose e maltose. No mesmo trabalho que caracterizou este transportador, a análise filogenética de sua sequência agrupou esse transportador em um grupo de transportadores de dissacarídeos, portanto, sua localização na árvore deste trabalho pode ser devido esse fato (NOGUEIRA, K. M. V. *et al.*, 2018).

Os grupos verde e laranja compartilham um ancestral mais recente. O grupo laranja agrupa 2 transportadores da planta *A. thaliana* e um transportador da bactéria

E. coli. A expressão heteróloga de transportadores de xilose de *A. thaliana* em cepas de *S. cerevisiae* projetadas para utilizar xilose resultou no aumento do consumo de xilose antes da depleção de glicose, apresentando um aumento de 70% na produção de etanol quando a xilose era consumida em conjunto com a glicose e um consumo de xilose de 2,5 vezes maior nesse cultivo com as duas fontes de carbono quando comparadas a cepa controle sem os transportadores (HECTOR *et al.*, 2008). O transportador codificado pelo gene XylE de *E. coli* não sustentou o crescimento em xilose em *S. cerevisiae*, o que pode ser justificado por uma tradução não funcional na proteína nesse sistema de expressão heteróloga (HAMACHER *et al.*, 2002). No entanto, serviu pra sustentar o crescimento de *E. coli*, apresentando baixa afinidade por xilose (WISEDCHAI SRI *et al.*, 2014).

No clado destacado em verde, observamos em negrito um dos transportadores diferencialmente expressos no cultivo de *T. reesei* na presença de xilose do presente trabalho. Tr62380 (Str3) é um simportador de açúcar/H⁺ que apresenta baixa afinidade por xilose (HAVUKAINEN *et al.*, 2021; SLOOTHAACK *et al.*, 2016). Tr62380 (Str3) está num ramo com transportadores de hexose de *S. cerevisiae*, onde *HXT2* e *HXT4* são transportadores de baixa afinidade por xilose (SALOHEIMO *et al.*, 2007). No mesmo clado, os transportadores de xilose das leveduras *S. stipitis* e *C. intermedia* aparecem num mesmo ramo neste trabalho e em trabalhos anteriores, sendo *GXS1* um transportador de alta afinidade por xilose, também atuando através de um mecanismo de simporte açúcar/ H⁺ (LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008). Apesar de não haverem dados que discutam a afinidade do transportador *RGT2* de *S. stipitis* por xilose, a expressão heteróloga dessa proteína aumentou em 50% a produção de etanol em cultivo contendo glicose e xilose quando comparada à uma linhagem de *S. cerevisiae* sem transportador (MOON *et al.*, 2013).

Figura 9 – Árvore filogenética com base na sequência de aminoácidos de 22 transportadores envolvidos no transporte de xilose. Cada proteína está indicada de acordo com a espécie dos organismos que as produzem, seguido do gene. A identificação dos genes que já foram nomeados foi usada para identificação, no entanto, aqueles genes ainda não nomeados foram citados de acordo com sua identificação no *JGI* ou *Genbank*. O gene Tr67507 foi usado como *outgroup*.

Nos clados destacados em azul e roxo também temos 2 dois grupos distintos que aparecem compartilhando um ancestral comum mais recente. O grupo azul é um grupo heterogêneo em relação a sua especificidade à xilose. Em análises utilizando *S. cerevisiae* como sistema de expressão heteróloga, Xtl1 foi capaz de conferir crescimento em xilose e não em glicose, apresentando especificidade à pentose (SALOHEIMO *et al.*, 2007), já XtlC tem maior afinidade por glicose, mas também confere crescimento em xilose (SLOOTHAACK *et al.*, 2016). XUT5 não foi caracterizado e, em uma análise filogenética de transportadores de xilose aparece

compartilhando o mesmo ancestral que outros transportadores de alta afinidade por xilose, apesar de estar sozinho em um clado único (YOUNG, E. *et al.*, 2011). Além disso, neste mesmo trabalho observa-se que, *XUT5*, quando expresso em uma linhagem de *S. cerevisiae* sem transportadores de hexoses, não aumentou significativamente o crescimento em xilose. No que tange o Tr82309, outros trabalhos já o agruparam em um clado com transportadores de monossacarídeos, onde 2 transportadores de *Neurospora crassa* deste clado possuem capacidade de transportar xilose (HAVUKAINEN *et al.*, 2021a).

No grupo roxo, Tr121482 (Str2) de *T. reesei* aparece agrupado tanto com transportadores caracterizados por sua baixa como por sua alta afinidade por xilose, conferindo crescimento em xilose (COLABARDINI *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2013; SLOOTHAAK *et al.*, 2016; YOUNG, E. *et al.*, 2011).

5.3.2 Conservação de aminoácidos envolvidos no transporte de xilose

Esta próxima análise visou identificar aminoácidos conservados nas sequências de proteínas dos transportadores codificados pelos genes diferencialmente expressos na figura 3, quando comparadas com sequências de proteínas previamente descritas como transportadores de xilose. Os resíduos que apresentavam homologia com base na literatura estão apresentados em roxo (Figura 10).

O motivo GGXXXG, onde “X” representa aminoácidos que variam constantemente em diferentes transportadores, foi previamente descrito como fundamental para o transporte de xilose e envolvido com a seletividade para monossacarídeos (YOUNG, E. M. *et al.*, 2014). Apesar desse motivo aparecer na maioria das proteínas alinhadas, duas das proteínas de *T. reesei* analisadas neste trabalho apresentavam o motivo SIXXXG, sendo elas Tr82309 e Tr69957. A presença de serina (S) e isoleucina (I) em transportadores de açúcar nessas regiões foi observada no mesmo trabalho que descreveu o motivo. Além disso, através de mutações pontuais, Young e colaboradores (2014) descreveram que fenilalanina (F), isoleucina, serina e metionina (M) aumentam taxas de crescimento em xilose. Neste trabalho também vimos que os transportadores Str2 e Str3 quando docados com a xilose possuem um ΔG maior que o Tr82380, que possui o motivo SIXXXG. Isso indica que o Tr82380 parece ter uma maior afinidade por xilose em comparação ao

Str2 e Str3, que têm o motivo GGXXXG. Portanto, esse conjunto de dados nos levou a pensar que a importância da última glicina (G) do motivo parece ser maior que das glicinas nas posições 1 e 2 do motivo.

Outro motivo descrito como fundamental para o transporte de xilose foi o motivo YFFYY inicialmente descrito em *Candida guilliermondii* (WANG *et al.*, 2015). No alinhamento usado neste trabalho, apenas 4 proteínas possuem esse motivo, incluindo Str3. No entanto, a presença das duas tirosinas no final do motivo é bastante conservada. Observamos que, apesar de Str2 e Tr82309 não apresentarem o motivo, todos os aminoácidos que diferem do motivo descrito são aminoácidos cujas características incluem maior seletividade à xilose. Além disso, a proteína Tr82309 não possui a penúltima tirosina (Y) do motivo, enquanto, nas análises de *docking* molecular, a última tirosina do motivo interage com a xilose. Esta última tirosina aparece conservada em todas as proteínas alinhadas neste trabalho. Assim, esses dados sugerem que a tirosina presente na última posição do motivo previamente descrito é fundamental para o transporte de xilose.

Além de motivos previamente descritos, aminoácidos isolados têm sido apontados como importantes no transporte de xilose. Dentre eles podemos citar o aspartato (D) (SLOOTHAAK *et al.*, 2016). Tomando como base o transportador de xilose de *E. coli* codificado pelo gene Xyle (D²⁷), as proteínas Str2, Str3 e Tr82380 também apresentam esse resíduo conservado nas posições D⁴⁴, D⁵⁶ e D⁴⁰, respectivamente. Esse resíduo é importante para o salto de prótons que mantém a conformação aberta para dentro em Xyle. Nessa proteína, os aminoácidos glutamina (Q) na posição 168 e 288, de triptofano (W) na posição 416 também foram descritos como cruciais para o transporte de xilose. Str2 e Str3 possuem homologia em relação ao Q¹⁶⁸ de Xyle, onde esse resíduo conservado nas posições Q¹⁶⁴ e Q¹⁸³, respectivamente, enquanto Tr82380 possui uma F¹⁷¹ ao invés de glutamina na região. Em relação a Q²⁸⁸ de Xyle, Str2, Str3 e Tr82380 também possuem esse resíduo conservado nas posições Q³³⁶, Q³¹³ e Q³⁰⁶, respectivamente. O triptofano da posição 416 estava conservado apenas em Str2 e Str3, nas posições W⁴⁷³ e W⁴⁴⁸, enquanto Tr82309 possui S⁴⁴⁴ na região (WANG *et al.*, 2015). A presença de arginina (R) nas posições R¹²⁹ e R¹⁴⁸ já haviam sido descritas em Str2 e Str3, respectivamente, foram relacionadas com o transporte de xilose (SLOOTHAAK *et al.*, 2016). O alinhamento utilizado neste trabalho mostrou que apenas uma proteína de *S. stipitis* não possui a arginina nesta posição.

Além de analisar a presença de resíduos previamente descritos como relevantes no transporte de xilose, também foram analisados resíduos envolvidos com o transporte de xilose a partir das análises de *docking* molecular realizadas neste trabalho. Os resíduos que apareciam altamente conservados neste alinhamento foram ilustrados em vermelho (figura 6). O *docking* de Str3 com a xilose indicou a interação com R²³⁷, nessa região apenas Tr69957 não apresenta argnina nessa região. Prolina (P) na posição 455 de Tr82309 interage com a xilose, segundo o *docking*. Sendo assim, P nessa região aparece conservada em 18 de 21 proteínas analisadas neste alinhamento. Com base nos dados de *docking* molecular, apresentamos neste trabalho novos aminoácidos conservados que podem estar envolvidos no transporte de xilose, assim como validamos o *docking* molecular como uma ferramenta útil para tais fins.

TreesaStr 3/1-567	35	---	V	T	G	R	S	W	A	M	G	L	V	S	M	G	L	I	F	G	Y	D
Treesa82309/1-543	22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
TreesaStr 2/1-570	26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
EcobXylE/1-492	9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
TreesaXil/1-460	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
SchpStrXUT4/1-529	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
SchpStrXUT5/1-496	20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
AthakanaAT5G17010/1-504	39	P	E	N	Y	S	V	V	A	A	I	P	L	F	L	P	A	L	G	G	L	L
AthakanaAT5G59250/1-558	90	P	E	S	F	S	W	S	V	I	L	P	F	I	P	A	L	G	G	L	L	L
SchpStrXUT7/1-392	50	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
ScorevStrHXT2/1-541	46	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Treesa69957/1-541	36	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
AndulansAN0250.2/1-547	59	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
ScorevStrHXT1/1-571	24	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
ChintermediaGXSI/1-523	24	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
SchpStrRGT2/1-528	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
AuggerXilC/1-540	52	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
AuggerXilB/1-553	32	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
AuggerXilA/1-569	36	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
TreesaStr 1/1-568	24	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DhansemiDEHA2C11374p/1-557	24	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

TreesaStr 3/1-567	313	Q	L	T	G	A	N	Y	F	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Treesa82309/1-543	306	Q	E	W	I	G	I	A	G	I	T	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
TreesaStr 2/1-570	336	Q	Q	F	Q	Q	C	N	A	L	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
EcobXylE/1-492	288	Q	Q	F	V	G	I	N	V	V	L	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
TreesaXil/1-460	213	Q	Q	L	L	G	G	N	V	M	L	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
SchpStrXUT4/1-529	240	A	Q	M	N	G	I	N	M	V	S	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
SchpStrXUT5/1-496	277	T	E	M	A	G	S	S	V	G	S	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
AthakanaAT5G17010/1-504	316	Q	Q	I	T	Q	Q	P	S	V	L	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
AthakanaAT5G59250/1-558	370	Q	Q	I	T	Q	Q	P	S	V	L	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
SchpStrXUT7/1-392	162	A	Q	F	N	G	I	N	I	S	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ScorevStrHXT2/1-541	326	Q	Q	L	T	G	N	Y	F	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Treesa69957/1-541	319	Q	I	L	S	G	S	S	-	F	A	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
AndulansAN0250.2/1-547	310	Q	Q	W	T	G	V	N	A	L	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ScorevStrHXT1/1-571	335	Q	Q	L	T	G	D	N	Y	F	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ChintermediaGXSI/1-523	292	Q	Q	L	T	G	V	N	F	I	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
SchpStrRGT2/1-528	292	Q	Q	L	T	G	I	N	F	I	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
AuggerXilC/1-540	281	Q	Q	L	T	G	M	N	V	M	M	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
AuggerXilB/1-553	332	Q	Q	F	V	G	I	N	A	L	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
AuggerXilA/1-569	322	Q	Q	W	N	G	I	N	A	I	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
TreesaStr 1/1-568	332	Q	Q	W	T	G	I	N	A	L	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
DhansemiDEHA2C11374p/1-557	328	Q	Q	F	I	G	C	N	A	I	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

TreesaStr 3/1-567	474	S	N	W	I	W	N	F	C	I	G	F	F	T	P	F	I	T	S	---	---	---
Treesa82309/1-543	470	G	W	S	I	G	N	G	W	C	V	L	L	L	P	T	I	F	K	A	---	---
TreesaStr 2/1-570	449	S	T	W	M	C	N	F	I	I	G	L	V	T	P	D	M	L	E	T	---	---
EcobXylE/1-492	499	A	Q	W	L	A	N	Y	F	V	S	W	T	F	P	M	M	D	K	N	S	W
TreesaXil/1-460	386	G	N	W	A	F	N	L	A	L	A	F	F	V	P	P	A	F	T	N	---	---
SchpStrXUT4/1-529	395	T	N	W	L	F	N	F	I	V	G	E	M	T	P	I	L	L	D	T	---	---
SchpStrXUT5/1-496	438	F	N	G	C	W	G	L	F	A	S	F	I	L	P	I	A	M	N	G	---	---
AthakanaAT5G17010/1-504	523	V	N	F	G	A	N	A	L	V	T	F	A	F	S	P	L	K	E	L	L	G
AthakanaAT5G59250/1-558	577	T	N	F	G	S	N	A	I	V	T	F	A	F	S	P	L	K	E	F	L	L
SchpStrXUT7/1-392	318	T	N	W	F	A	N	F	V	V	Q	M	T	P	I	L	Q	R	---	---	---	
ScorevStrHXT2/1-541	499	A	N	W	I	W	G	F	L	I	G	F	F	T	P	F	I	T	S	---	---	
Treesa69957/1-541	479	A	Y	Q	I	I	N	V	A	S	Q	V	L	E	P	Y	F	M	N	P	T	
AndulansAN0250.2/1-547	479	A	N	W	M	N	N	F	I	V	G	Q	V	T	P	D	M	L	A	G	---	
ScorevStrHXT1/1-571	499	A	N	W	I	W	G	F	L	I	S	F	F	T	P	F	I	T	G	---	---	
ChintermediaGXSI/1-523	455	S	N	W	L	W	N	W	G	I	A	Y	A	T	P	Y	M	V	D	E	D	
SchpStrRGT2/1-528	432	S	N	W	L	W	N	W	G	I	A	Y	A	T	P	Y	M	V	N	S	G	
AuggerXilC/1-540	456	A	N	W	A	F	N	F	A	L	S	Y	F	V	P	P	A	F	V	N	---	
AuggerXilB/1-553	484	S	N	W	L	N	N	F	I	I	G	L	I	T	P	P	L	V	E	D	---	
AuggerXilA/1-569	495	S	N	W	L	N	N	F	I	V	G	L	A	T	S	P	F	I	A	A	---	
TreesaStr 1/1-568	485	S	N	W	M	N	N	F	I	I	G	Q	V	T	P	D	M	L	Q	G	---	
DhansemiDEHA2C11374p/1-557	495	S	T	W	M	N	N	F	I	I	G	L	V	T	P	R	M	L	E	T	---	

Figura 10 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de transportadores envolvidos no transporte de xilose. A imagem destaca a conservação de motivos e resíduos envolvidos com o transporte de xilose. Em roxo estão os motivos e aminoácidos conservados previamente descritos na literatura com envolvimento no transporte de xilose; em vermelho estão os aminoácidos conservados encontrados a partir das análises de *docking* molecular neste trabalho.

Com base nas análises filogenéticas concluímos que a proteína predita como transportador de açúcar Tr82309 tem alto potencial de ser um eficiente transportador de xilose. Sendo assim, com base nas análises *in silico* de filogenética e *docking* molecular, os transportadores Tr62380 e Tr82309 foram selecionados para expressão heteróloga na *S. cerevisiae* (*URA*Δ352, *TRP1*Δ63).

5.4 Construção da linhagem Sc::pRh274

S. cerevisiae não é capaz de metabolizar nativamente xilose. Sendo assim, com o intuito de realizar a posterior análise do transporte de xilose por Tr62380 e Tr82309, a *S. cerevisiae* (*URA*Δ352, *TRP1*Δ63) foi primeiramente engenheirada para o metabolismo dessa pentose. Para isso, foi inserido o plasmídeo pRH274. O plasmídeo contém as enzimas da via oxirredutora de metabolismo da xilose redutase e xilitol desidrogenase (XR e XDH, respectivamente) e a xilulose quinase. O gene *XYL1*, que codifica a xilose redutase, está sob o controle do promotor e terminador *PGK1*; *XYL2*, que codifica a xilitol desidrogenase está sob o controle do promotor e terminador *ADH1*; enquanto *XKS1* está sob o controle do promotor e terminador *HXT7*.

Após o procedimento de transformação genética, os transformantes positivos foram selecionados via auxotrofia para *URA3*. Com o objetivo de verificar a esperada inserção do plasmídeo pRH274, foi feita uma PCR a partir do DNA total extraído de 6 colônias escolhidas aleatoriamente. Para confirmar a inserção do plasmídeo, o gene *XYL1* que codifica a xilose redutase, foi utilizado como alvo. O gene possui 980 pares de base e como controle positivo da reação foi usado o plasmídeo puro (Figura 11).

Figura 11 - Mapa do plasmídeo pRH274 (SnapGene) utilizado para inserção da rota de metabolismo de xilose e resultado da PCR de amplificação do fragmento de 980pb proveniente de amostras de DNA dos seis transformantes analisados (colônias 1 a 6) e do controle (7).

5.5 Construção das linhagens Sc::pRH274::Tr62380 e Sc::pRH274::Tr82309

Após a confirmação da construção da linhagem Sc::pRH274, a colônia 2 foi utilizada para inserção dos transportadores Tr62380 e Tr82309 de *T. reesei*. Posteriormente a transformação genética, colônias aleatoriamente selecionadas através de sua auxotrofia para triptofano, foram analisadas por microscopia de fluorescência, uma vez que proteínas de membrana expressas em sistemas de expressão heteróloga apresentam problemas desde a garantia da produção de proteínas funcionais até um correto endereçamento à membrana (LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008). A opção de triar os transformantes a partir da análise microscópica visou selecionar transformantes cujos transportadores parecessem funcionais na membrana plasmática das células.

Uma vez que os transportadores estão fusionados à GFP, a microscopia de fluorescência foi usada para selecionar transformantes que apresentavam fluorescência na membrana plasmática das células, indicando que as proteínas não só estavam expressas, como também que apresentavam uma localização celular correta. Foram analisados 7 transformantes do gene Tr62380 e 9 transformantes do gene Tr82309.

Para os experimentos posteriores foram selecionados dois transformantes de cada gene que apresentaram um maior grau de fluorescência localizado na membrana das células, indicando o endereçamento correto para transportadores de açúcar (Figura 12). Os transformantes selecionados foram nomeados como colônias “A” e “B” para cada gene. A levedura contendo apenas o plasmídeo pRH274 foi utilizada como controle e a exposição e emissão foi configurada de acordo com o mesmo que não apresentou fluorescência nos parâmetros selecionados.

Figura 12 – Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e microscopia de fluorescência das cepas transformantes expressando Tr62380 e Tr82309 fusionados à GFP. As células vivas foram visualizadas em um microscópio Leica DMI6000B (Leica, Heidelberg, Alemanha) usando a lente objetiva de imersão em óleo de ampliação 100 ×. Imagens de campo claro de contraste de fase e fluorescentes foram gravadas usando o software LAS AF (Leica).

5.6 Seleção de transformantes para execução de análises de rendimento da fermentação

A fim de selecionar os melhores transformantes de cada gene e também o melhor controle para prosseguir com os experimentos, foi realizado um cultivo em meio seletivo usando xilose como fonte de carbono. Foi feita uma curva de crescimento das leveduras transformadas com os genes dos transportadores (2 colônias de cada gene), com a levedura sem nenhum plasmídeo, com a levedura contendo apenas o plasmídeo pRH274 e com a levedura contendo tanto pRH274 quanto pRH195 sem transportadores e GFP.

As coletas e análise de densidade óptica das células foram mensuradas a cada 12 horas, gerando um gráfico onde são observados dois picos de crescimento (Figura 13). A formação do primeiro pico (36 horas) é atribuída a um crescimento residual em glicose que poderia estar presente na célula e também a um possível consumo de etanol. Após esse primeiro pico é observado um leve declínio na curva, seguida de uma fase lag de crescimento. Já foi observado que realizar o pré-inóculo em glicose pode aumentar a fase lag das culturas em 12 horas quando comparado a um pré-inóculo realizado em xilose (APEL *et al.*, 2016). De fato, para maioria das linhagens uma fase lag de aproximadamente 12 horas foi observada entre 48 e 60 horas. O segundo pico observado no cultivo aconteceu em 84 horas, sendo aquele com a maior OD₆₀₀ para todos os grupos.

Nota-se que a *S. cerevisiae* (URAΔ352, TRP1Δ63) sem nenhum plasmídeo apresentou algum crescimento até 36 horas e, após isso, manteve um crescimento relativamente constante e bem abaixo das demais leveduras transformadas com a rota de metabolismo de xilose. Isso corrobora para inferir que esse primeiro pico pode ser devido a presença de glicose residual e a um consumo de etanol. Além disso, a fase de platô após o pico de crescimento às 36 horas de cultivo para essa linhagem observada na curva pode ser atribuída ao consumo de glicogênio intracelular, como já foi observado em outros trabalhos envolvendo o metabolismo de carboidratos em leveduras industriais (PEREIRA *et al.*, 2011).

Figura 13 – A) Curva de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* em meio YNB (0,7%) e xilose (2%) por 120 horas. B) Análise estatística da OD₆₀₀ dos transformantes em relação a Sc::pRH274 em 84 horas. A estatística foi feita através do *One-way* ANOVA, usando o teste de múltiplas comparações de Dunnett (LEE; LEE, 2018).

Foi realizada uma análise estatística do ponto de 84 horas a fim de selecionar os melhores transformantes de cada gene (Figura 13). A levedura transformada apenas com o pRH274 foi selecionada como controle, uma vez que o objetivo deste experimento era realizar um *screening* para selecionar os transformantes mais adaptados ao consumo de xilose.

Observa-se que a levedura transformada com o plasmídeo pRH274, chamada de Sc::pRH274, o qual contém a via de metabolismo de xilose, não apresentou diferença estatística em relação a aquela que, além de conter esse plasmídeo, também continha o vetor pRH195 (sem os transportadores). Já em relação a levedura sem nenhum

plasmídeo, foi observada uma diferença estatística, indicando que os genes inseridos da via metabólica de xilose foram funcionalmente expressos.

O transformante da colônia “B”, correspondente ao gene Tr82309, apresentou a maior OD₆₀₀ desta análise, onde seu crescimento apresentou diferença estatística em relação ao controle. O transformante Tr82309 “B” foi selecionado para as análises posteriores. Dentre os transformantes do gene Tr62380, a colônia “A” apresentou a menor OD₆₀₀ em relação ao controle Sc::pRH274, onde seu crescimento teve diferença estatística em relação a levedura contendo apenas a via de metabolismo da xilose. Portanto, apesar de a colônia “B” não ter apresentado diferença estatística em relação ao controle, esse transformante foi selecionado para as próximas análises por ter apresentado um crescimento um pouco maior que o controle e ainda maior que o transformante “A”.

5.7 Confirmação da inserção do cassete Tr62380::GFP e Tr82309::GPF

Após a análise de crescimento dos transformantes, a inserção do cassete Tr62380::GFP e Tr82309::GPF nas colônias selecionadas foi molecularmente confirmada através de análise de PCR utilizando DNA total como *template*. Neste trabalho, a construção foi desenhada com o intuito de gerar proteínas quiméricas onde os transportadores Str3 e Tr82309 estariam fusionadas à GFP na porção C-terminal (Figura 14 – A). Usando primers internos ao cassete, foi possível confirmar a construção dos cassetes através da amplificação de 1364 pb para Tr62380+GFP e 958pb para Tr82309+GFP (Figura 14 – B).

Figura 14 – A) Mapa do plasmídeo pRh195 contendo os cassetes de expressão dos transportadores. B) A banda de 1364pb corresponde a região interna do cassete do Tr62380 fusionado à GFP, enquanto a banda de 958pb corresponde a região interna do cassete do Tr82309 fusionado à GFP.

5.8 Adaptação Laboratorial

Após a confirmação da inserção do cassete, as leveduras selecionadas para proceder com os experimentos de análise fermentativa foram inoculadas em placas contendo meio seletivo com 2% de xilose e foram cultivadas por 7 dias à 30°C. Após 7 dias foi retirada uma foto no ChemiDoc™ XRS para análise de crescimento. Um repique sob as mesmas condições foi feito em uma nova placa e as leveduras foram incubadas por mais 7 dias. Após isso, outra foto foi tirada para análise de crescimento. As fotos foram tiradas com os mesmos parâmetros de cor e contraste (Figura 15).

A evolução laboratorial é uma técnica apontada como eficiente para melhorar o desempenho das leveduras na utilização de xilose, aumentando a afinidade por xilose em detrimento da afinidade por glicose (PAPAPETRIDIS *et al.*, 2018). Após o segundo repique, é possível observar que as leveduras apresentaram um crescimento mais eficiente, com aparente melhor adaptação ao meio.

Dentre as linhagens analisadas, aquela com o gene Tr82309 pareceu apresentar melhor crescimento desde o primeiro repique. As demais leveduras apresentaram um desempenho adaptativo semelhante, atingindo maiores concentrações de celulares na placa. A levedura expressando o Str3 foi aquela que apresentou maior desenvolvimento quando comparado ao primeiro repique. Já foi reportado que a evolução contínua em meio com xilose de linhagens capazes de metabolizar essa pentose é capaz de aumentar as taxas de crescimento, o que mostra que a utilização do açúcar pelas linhagens analisadas foi aprimorada (GAO; PLOESSL; SHAO, 2019).

Figura 15 – Análise do crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* capazes de consumir xilose transformadas com os transportadores e da linhagem controle.

5.9 Análise de crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol

O ótimo rendimento da fermentação da biomassa lignocelulósica depende de uma eficiente co-fermentação de glicose e xilose, uma vez que são os açúcares mais abundantes da biomassa. Nesse sentido, encontrar estratégias que garantam essa co-fermentação como um transporte não competitivo desses açúcares é fundamental para desenvolver linhagens de *S. cerevisiae* realmente eficientes (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2020). A fim de observar se os transportadores de *T. reesei* eram capazes de melhorar o consumo de xilose e permitir uma co-fermentação de glicose e xilose,

foram feitos cultivos em anaerobiose por 120 horas com esses substratos. Para isso, parâmetros como crescimento das leveduras, consumo de xilose e glicose, e produção de etanol e xilitol foram analisados (Figura 16).

Em processos de fermentação alcoólica o etanol é o metabólito primário típico e sua produção está diretamente relacionada ao crescimento da levedura (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). De fato, quando analisamos os cultivos de xilose, é possível observar que em 96 horas todas as leveduras apresentaram maior OD₆₀₀ (Figura 16 – B) e nesse ponto da análise também é possível observar um maior consumo de xilose, seguida de uma maior produção de etanol pela linhagem transformada com Str3. Portanto, todas as análises estatísticas foram feitas nesse tempo de análise. Apenas a linhagem transformada com Str3 apresentou diferença estatística em relação ao controle no ponto de 96 horas para todos os parâmetros analisados (Figura 16 – A). Nesse ponto da análise também é possível observar que para todas as linhagens transformadas com os transportadores de *T. reesei* um aumento considerável no consumo de xilose (Figura 16 – A). A maior variação em unidades de g/L na produção de etanol foi observada no período entre 72 e 96 horas de cultivo, nesse período as duas leveduras transformadas com os transportadores de *T. reesei* produziram etanol, porém, apenas a levedura transformada com o transportador Str3 codificado pelo gene Tr62380 foi capaz de manter a produção de etanol crescente até o final do cultivo. Por outro lado, a levedura sem transportadores heterólogos usada como controle não produziu etanol em nenhum tempo de cultivo e não apresentou um consumo relevante de xilose a partir de 96 como as demais cepas analisadas.

Ao analisar a curva de crescimento da linhagem transformada com Tr82309, observa-se que em 72 horas há uma leve produção de etanol, logo em seguida, no ponto de 96 é percebido um aumento do consumo de xilose. Os transportadores expressos neste trabalho estão sob regulação do promotor *HXT7*, estudos sugerem que esse promotor é *up*-regulado na presença de etanol (PENG *et al.*, 2015), portanto, esse aumento no consumo observado após 96 horas pode ser devido um aumento na expressão do Tr82309. Para confirmar esse dado, seria necessário estender o tempo de cultivo e realizar análises microscópicas para confirmar o fenótipo da levedura.

No cultivo contendo apenas xilose como fonte de carbono, não foi observada produção de xilitol a níveis detectáveis (Figura 16 – A). Como o xilitol é um

subproduto da rota metabólica oxirredutora, era esperado encontrar alguma produção desse metabólito pela linhagem transformada com o Str3 que apresentou alto consumo da pentose, como é previamente relatado na literatura (CUNHA *et al.*, 2019).

A

B

Figura 16 – A) Consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol pelas leveduras capazes de utilizar xilose contendo transportadores de açúcar de *T. reesei* e do controle sem transportadores. No ponto de 96 horas foi realizada uma análise estatística do consumo de açúcares e da produção de etanol dos transformantes em relação a Sc::pRH274. A estatística foi feita através do *One-way* ANOVA, usando o teste de múltiplas comparações de *Dunnnett* (LEE; LEE, 2018) B) Crescimento das linhagens analisadas em meio contendo xilose e xilose + glicose.

No cultivo com a mistura de glicose e xilose houve a formação de dois picos de crescimento da levedura. Esses dois picos representam um crescimento difásico característico de misturas de açúcares com glicose, uma vez que a repressão catabólica exercida devido a presença de glicose faz com que outros açúcares sejam metabolizados sequencialmente à total depleção de glicose (KIM *et al.*, 2012). O primeiro pico corresponde ao consumo inicial de glicose entre 0 e 48 horas de cultivo (Figura 16 – B). Observa-se que somente após o consumo total da glicose, a levedura transformada com Str3 começou a consumir xilose. Além da repressão catabólica, devido os transportadores com especificidade para xilose terem ainda mais afinidade por glicose, a presença de glicose tende a inibir o transporte de xilose (SHARMA *et al.*, 2018). Apesar disso, era esperado que a levedura transformada com o Str3 fosse capaz de co-transportar xilose e glicose, uma vez que esse fenótipo já foi observado durante sua caracterização bioquímica através da expressão heteróloga desse transportador em uma linhagem de *S. cerevisiae* deletada para todos os transportadores de hexoses (SLOOTHAAK *et al.*, 2016).

Entre 48 e 72 horas, observa-se uma fase lag (Figura 16 – A), seguida de um aumento da densidade óptica, caracterizado pelo aumento no consumo de xilose e consumo de etanol. A produção de xilitol só foi observada no cultivo contendo a mistura de açúcares e sua produção está diretamente relacionada ao consumo de xilose para todas as linhagens analisadas. Ensaio utilizando a uma linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 com a via oxirredutora de metabolismo da xilose já verificaram consumo que, assim como no presente trabalho, a glicose é consumida nas primeiras 24 horas de cultivo e somente após isso a xilose passa a ser essencialmente requerida para crescimento e produção de etanol, sendo a produção de xilitol proporcional ao consumo de xilose. Em longos períodos de cultivo, onde a quantidade de xilose em

g/L é maior que a quantidade de glicose, o consumo de etanol começa próximo das 80 horas de cultivo (ROMANÍ *et al.*, 2015).

Todos os transformantes consumiram glicose em menos de 48 horas com alta produção de etanol nesse tempo de cultivo. Após esse período, as leveduras passaram a consumir etanol (Figura 16 – A). Assim, é possível observar que o uso de etanol como fonte de carbono levou à uma manutenção da OD₆₀₀ numa fase estacionária para o transformante Sc::pRH274, enquanto pode-se observar um aumento da OD₆₀₀ para os transformantes com os transportadores (Figura 16 – B). O consumo e crescimento mais lentos das leveduras contendo os transportadores pode ser atribuída a presença de GFP, uma vez que essa proteína é relacionada com problemas de crescimento desencadeados pelo efeito de carga de proteína (EGUCHI *et al.*, 2018). É interessante observar que os cultivos contendo xilose e glicose tiveram maiores valores de produção de etanol no período de 48 horas do que o cultivo contendo apenas glicose. Isso sugere que há algum co-consumo de glicose e xilose nesse tempo de cultivo.

A fim de melhor entender o mecanismo de transporte desses transportadores na levedura, foram feitas análises microscópicas para observar a localização subcelular dos transportadores nos meios de cultivo analisados neste trabalho. A expressão de transportadores de xilose é inibida pela presença de glicose (NIJLAND *et al.*, 2014). Sendo assim, a fim de observar o fenótipo dos transportadores expressos na presença de xilose e glicose, foi realizada uma análise das culturas após 24 horas de inóculo. Observa-se que há células com alguma marcação de fluorescência na membrana (em destaque pela seta branca na figura 17) para ambos os cultivos da linhagem transformada com o transportador Str3 (Tr62380), sendo que no cultivo com xilose como única fonte de carbono algumas células parecem ter esse transportador internalizado. No entanto, nesse tempo de análise não foi possível encontrar células com o transportador Tr82309 expressando fluorescência na região da membrana quando cultivado em xilose como única fonte de carbono, apenas foi possível encontrar fluorescência intracelular, indicando que esse transportador estava internalizado na presença de xilose. Apesar disso, foi possível encontrar esse transportador localizado na membrana no cultivo com a mistura de açúcares.

Apesar desse mecanismo de inibição mediado por glicose já ser bem estabelecido, já foi observado que a presença do substrato de transporte do respectivo transportador pode promover sua internalização mediado por um mecanismo de sinalização através

de α -arrestinas. Além disso, quando há dobramento incorreto das proteínas ou atraso na cinética de tráfego, esses transportadores aparecem acumulados em vacúolos intracelulares (SEN *et al.*, 2016; ZHANG, C. *et al.*, 2017). No caso dos transportadores de *T. reesei* analisados neste trabalho, ambos parecem ter tido certo atraso no endereçamento correto dos transportadores, sendo isso mais evidente no Tr82309 na presença de xilose. O baixo consumo e a produção deficiente de etanol por esse transformante pode ser devido a uma internalização do transportador, impedindo que haja um consumo eficiente da pentose. Um melhor entendimento pode ser obtido acompanhando o fenótipo das leveduras através de análises microscópicas a cada tempo de análise do ensaio de fermentação, até porque após 96 horas de cultivo o consumo de xilose pela linhagem transformada com o Tr82309 parece mais significativo.

O transportador Str3 (Tr62380) demonstrou ser eficiente e apresentou potencial para sua aplicabilidade no desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica de linhagens de *S. cerevisiae* industriais, melhorando significativamente o consumo de xilose e a produção de etanol. Além disso, esse trabalho possibilitou pela primeira vez a análise da inserção desse transportador em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*. Até a data de finalização deste trabalho, o transportador Tr82309 nunca havia sido expresso de forma heteróloga em *S. cerevisiae*. Portanto, os dados obtidos nesse trabalho sobre o potencial para sua aplicação para o transporte de xilose são considerados inconclusivos. Apesar disso, sua análise filogenética o agrupa próximo a XUT5 que, quando expresso em *S. cerevisiae*, foi capaz de aumentar o consumo de xilose e a produção de etanol quando comparados a levedura capaz de metabolizar xilose, sem transportadores heterólogos (MOON *et al.*, 2013).

Ainda é possível otimizar a produção de etanol e garantir uma melhor co-utilização glicose e xilose pelos transformantes através de técnicas de evolução laboratorial que envolvem uma adaptação ao consumo através de uma pressão seletiva que mantém constante a concentração de xilose e aumenta gradativamente as concentrações de glicose (PAPAPETRIDIS *et al.*, 2018). Além disso, uma vez descrito o mecanismo de internalização, a predição de sítios de ubiquitinação e sua deleção podem aumentar o tempo de permanência dos transportadores na membrana das células, o que pode aumentar o tempo de captação dos açúcares e, por sua vez, as taxas de fermentação (SEN *et al.*, 2016).

Figura 17 – Análise microscópica das linhagens transformadas com os transportadores de *T. reesei* de cultivos contendo xilose como única fonte de carbono e de um cultivo contendo xilose e glicose.

6. Conclusão

- O uso da via oxirredutora de metabolismo da xilose aumentou significativamente o crescimento da levedura em xilose como única fonte de carbono.
- O transportador Str3 codificado pelo gene Tr62380 de *T. reesei* foi capaz de melhorar o consumo de xilose e o rendimento da produção de etanol.
- Tr82309 parece ser funcional quando expresso de forma heteróloga em *S. cerevisiae*, porém, sua expressão não aumentou significativamente o consumo de xilose e não melhorou o rendimento da produção de etanol até 120 horas de cultivo
- Análises posteriores, como caracterização bioquímica e um melhor entendimento de processos de internalização, deverão ser realizadas para uma conclusão a respeito da capacidade de Tr82309 transportar xilose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

- ACHEAMPONG, Michael *et al.* In pursuit of Sustainable Development Goal (SDG) number 7: Will biofuels be reliable? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 75, n. 7, p. 927–937, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.074>
- ADITIYA, H. B. *et al.* Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 66, p. 631–653, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- ANWAR, Zahid; GULFRAZ, Muhammad; IRSHAD, Muhammad. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- APEL, Amanda Reider *et al.* Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. December 2015, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep19512>
- AYODELE, Bamidele Victor; ALSAFFAR, May Ali; MUSTAPA, Siti Indati. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 245, p. 118857, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118857>
- AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 10, n. February, p. 52–61, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 89–105, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- BARUAH, Julie *et al.* Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, [s. l.], v. 6, n. DEC, p. 1–19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- BASSO, Luiz C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS**

Yeast Research, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>

BENOCCI, Tiziano *et al.* Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–25, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0841-x>

BHATIA, Shashi Kant *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 300, n. October 2019, p. 122724, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>

BORIN, Gustavo Pagotto *et al.* Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129275>

BOROWITZKA, Michael Armin; MOHEIMANI, Navid Reza. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 13–25, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9271-9>

BUENO, João Gabriel Ribeiro *et al.* Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–20, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01782-0>

CABALLERO, Antonio; RAMOS, Juan Luis. Enhancing ethanol yields through D-xylose and L-arabinose co-fermentation after construction of a novel high efficient L-arabinose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Microbiology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 163, n. 4, p. 442–452, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1099/mic.0.000437>

CHATTOPADHYAY, Atrayee *et al.* Characterization of two sugar transporters responsible for efficient xylose uptake in an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 695, n. August, p. 108645, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108645>

CHAUDHARY, Nitika *et al.* Proteome scale census of major facilitator superfamily transporters in *Trichoderma reesei* using protein sequence and structure based classification enhanced ranking. **Gene**, [s. l.], v. 585, n. 1, p. 166–176, 2016. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.043>

COLABARDINI, Ana Cristina *et al.* Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–19, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-46>

CUNHA, Joana T. *et al.* Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>

DE SOUZA, Amanda P. *et al.* Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 24–35, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9366-8>

DOS REIS, Thaila Fernanda *et al.* Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0611-1>

DOS REIS, Thaila Fernanda *et al.* The low affinity glucose transporter HxtB is also involved in glucose signalling and metabolism in *Aspergillus nidulans*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. February, p. 1–15, 2017.

Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/srep45073>

DOS SANTOS, Leandro Vieira *et al.* Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0017>

DOS SANTOS CASTRO, Lilian *et al.* Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2014.

Disponível em:

<https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-41>

EGUCHI, Yuichi *et al.* Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring the expression limits of glycolytic proteins. **eLife**, [s. l.], v. 7, p. 1–23, 2018.

Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.34595>

FELSENSTEIN, Joseph. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>

FERREIRA, Danielly *et al.* XYLH encodes a xylose/H⁺ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 585–596, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12061>

GAO, Meirong; PLOESSL, Deon; SHAO, Zengyi. Enhancing the co-utilization of biomass-derived mixed sugars by yeasts. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. JAN, p. 1–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03264>

GIETZ, R. Daniel; SCHIESTL, Robert H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 31–34, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>

GUPTA, Vijai Kumar *et al.* The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 970–982, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003>

HAMACHER, Tanja *et al.* Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, [s. l.], v. 148, n. 9, p. 2783–2788, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2783>

HAVUKAINEN, Sami *et al.* Electrophysiological characterization of a diverse group of sugar transporters from *Trichoderma reesei*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93552-7>

HAVUKAINEN, Sami *et al.* Functional characterization of a highly specific l-arabinose transporter from *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–20, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01666-4>

HECTOR, Ronald E. *et al.* Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 675–684, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1583-2>

HSU, Kai Cheng *et al.* Igemdock: A graphical environment of enhancing gemdock using pharmacological interactions and post-screening analysis. **BMC Bioinformatics**,

[s. l.], v. 12, n. SUPPL. 1, p. S33, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S33>

HUANG, Jun *et al.* Transcription analysis of recombinant *Trichoderma reesei* HJ-48 to compare the molecular basis for fermentation of glucose and xylose. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 1467–1479, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/JMB.2004.04007>

JAHIRUL, Mohammad I. *et al.* Biofuels production through biomass pyrolysis- A technological review. **Energies**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 4952–5001, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en5124952>

JIANG, Yi *et al.* Identification and Characterization of an Efficient d -Xylose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 68, n. 9, p. 2702–2710, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07113>

KHATIWADA, Dilip *et al.* Optimizing ethanol and bioelectricity production in sugarcane biorefineries in Brazil. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 85, p. 371–386, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.06.009>

KIM, Soo Rin *et al.* Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: A promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 274–282, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.005>

KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

KWAK, Suryang; JIN, Yong Su. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0694-9>

LEANDRO, Maria José; GONÇALVES, Paula; SPENCER-MARTINS, Isabel. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: First molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 395, n. 3, p. 543–549, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20051465>

- LEANDRO, Maria José; SPENCER-MARTINS, Isabel; GONÇALVES, Paula. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. **Microbiology**, [s. l.], v. 154, n. 6, p. 1646–1655, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015511-0>
- LEE, Sangseok; LEE, Dong Kyu. What is the proper way to apply the multiple comparison test? **Korean Journal of Anesthesiology**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 353–360, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>
- LIN, Yan; TANAKA, Shuzo. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>
- MAITAN-ALFENAS, Gabriela Piccolo; VISSER, Evan Michael; GUIMARÃES, Valéria Monteze. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- MARTINS, Gisele Marta *et al.* The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 162–168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.014>
- MAUÉS, David Batista. **Diversidade molecular de orange carotenoid protein em linhagens de cianobactérias da amazônia**. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal do Pará. Belém, p. 41, 2017.
- MOHR, Alison; RAMAN, Sujatha. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Efficiency and Sustainability in Biofuel Production: Environmental and Land-Use Research**, [s. l.], v. 63, p. 281–310, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.033>
- MOON, Jaewoong *et al.* New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 247–254, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.005>
- NIJLAND, Jeroen G. *et al.* Engineering of an endogenous hexose transporter into a

specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0168-9>

NOGUEIRA, Karoline Maria Vieira *et al.* Sugar transporters from industrial fungi: Key to improving second-generation ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 131, n. June, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109991>

NOGUEIRA, Karoline M. V. *et al.* Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 84, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1084-1>

OLIVEIRA, Marcos. Entre açúcares e genes. **Revista Pesquisa Fapesp**, [s. l.], v. 200, p. 86–89, 2012.

OSIRO, Karen O. *et al.* Assessing the effect of D-xylose on the sugar signaling pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in strains engineered for xylose transport and assimilation. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox096>

PANDEY, Ajay Kumar *et al.* Evaluation of divergent yeast genera for fermentation-associated stresses and identification of a robust sugarcane distillery waste isolate *Saccharomyces cerevisiae* NGY10 for lignocellulosic ethanol production in SHF and SSF. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1379-x>

PAPAPETRIDIS, Ioannis *et al.* Laboratory evolution for forced glucose-xylose co-consumption enables identification of mutations that improve mixed-sugar fermentation by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy056>

PARACHIN, Nádia Skorupa *et al.* Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 508–517, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.05.005>

PENG, Bingyin *et al.* Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories

on different carbon substrates and across the diauxic shift: A comparison of yeast promoter activities. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0278-5>

PEREIRA, Francisco B. *et al.* Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and**

Bioengineering, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 130–136, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.022>

QUISTGAARD, Esben M. *et al.* Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**,

[s. l.], v. 17, n. 2, p. 123–132, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>

RASTOGI, Meenal; SHRIVASTAVA, Smriti. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation

processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 80, n. January, p.

330–340, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>

RAUD, M. *et al.* Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production

technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 111, n. July 2018,

p. 44–56, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.020>

ROMANÍ, Aloia *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource**

Technology, [s. l.], v. 179, p. 150–158, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.020>

SAINI, Jitendra Kumar; SAINI, Reetu; TEWARI, Lakshmi. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts

and recent developments. **3 Biotech**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 406–425,

1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

SALOHEIMO, Anu *et al.* Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied**

Microbiology and Biotechnology, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 1041–1052, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0747-1>

SCARCELLA, Ana Sílvia de Almeida *et al.* Holocellulase production by filamentous fungi: potential in the hydrolysis of energy cane and other sugarcane varieties. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01304-4>

SEN, Arpita *et al.* Internalization of heterologous sugar transporters by endogenous α -arrestins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. 24, p. 7074–7085, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02148-16>

SHARMA, Nilesh Kumar *et al.* **Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.006>

SHIN, Minhye *et al.* Comparative global metabolite profiling of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* SR8 and *Scheffersomyces stipitis*. [s. l.], 2019.

SLOOTHAAK, Jasper *et al.* Biotechnology for Biofuels Identification and functional characterization of novel xylose transporters from the cell factories *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for biofuels**, [s. l.], v. 9, n. 148, p. 1–15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0564-4>

SOCOL, Carlos Ricardo *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>

SU, Ting *et al.* Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 24, p. 56–60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.005>

VAN ZYL, W. H. *et al.* Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. **Interface Focus**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 196–211, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsfs.2010.0017>

VERAS, Henrique César Teixeira; PARACHIN, Nádia Skorupa; ALMEIDA, João

Ricardo Moreira. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–8, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0766-x>

VIEIRA, Sabrina *et al.* Sustainability of sugarcane lignocellulosic biomass pretreatment for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 299, n. October 2019, p. 122635, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122635>

WANG, Chengqiang *et al.* Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 30, p. 79–88, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.04.007>

WATERHOUSE, Andrew M. *et al.* Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>

WISEDCHAI SRI, Goragot *et al.* Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein Xyle. **Nature Communications**, [s. l.], v. 5, p. 1–11, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms5521>

YAN, Nieng. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 151–159, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.003>

YAN, Nieng. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 44, p. 257–283, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>

YANG, Jinn Moon. Development and evaluation of a generic evolutionary method for protein-ligand docking. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 843–857, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.20013>

YANG, Jinn Moon; CHEN, Chun Chen. GEMDOCK: A Generic Evolutionary Method for Molecular Docking. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 288–304, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.20035>

YANG, Jinn Moon; FRANK HSU, D. Consensus scoring criteria in structure-based virtual screening. **Emerging Information Technology Conference 2005**, [s. l.], v.

2005, p. 165–167, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/EITC.2005.1544376>

YOUNG, Eric *et al.* Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 10, p. 3311–3319, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02651-10>

YOUNG, Eric M. *et al.* Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 131–136, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1311970111>

ZABED, H. *et al.* Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 71, n. January, p. 475–501, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

ZABED, H. *et al.* Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 66, p. 751–774, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>

ZHANG, Chenlu *et al.* Screening of transporters to improve xylohextrin utilization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184730>

ZHANG, Weixin *et al.* Identification of residues important for substrate uptake in a glucose transporter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 27, p. 1–10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep13829>

ZUCKERKAND, EMILE;; L, Pauling. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. *In*: EUROPHYSICS LETTERS. [S. l.: s. n.], 1965. p. 97–166. Disponível em: <https://doi.org/10.1209/epl/i1998-00224-x>