

**LÍLIAN EMÍDIO RIBEIRO**

**INFLUÊNCIA DA GLICOSE NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE XILOSE  
EM *Spathaspora passalidarum***

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

Orientador: Luciano Gomes Fietto

Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira  
Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R484i  
2022

Ribeiro, Lílian Emídio, 1992-  
Influência da glicose na regulação do metabolismo de xilose  
em *Spathaspora passalidarum* / Lílian Emídio Ribeiro. – Viçosa,  
MG, 2022.  
1 tese eletrônica (99 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 85-95.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.202>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Spathaspora passalidarum*. 2. Fermentação. 3. Glicose -  
Metabolismo. 4. Xilose - Metabolismo. I. Fietto, Luciano  
Gomes, 1973-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.56

**LÍLIAN EMÍDIO RIBEIRO**

**INFLUÊNCIA DA GLICOSE NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE XILOSE  
EM *Spathaspora passalidarum***

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

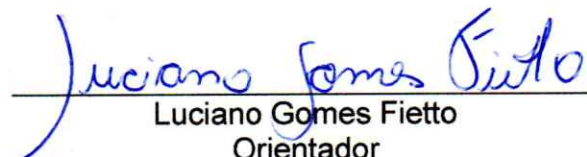
APROVADA: 04 de abril de 2022.

Assentimento:



---

Lílian Emídio Ribeiro  
Autora



---

Luciano Gomes Fietto  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde e colocar pessoas especiais na minha vida, que me incentivaram a progredir nessa longa caminhada.

Aos meus pais, Marta e José do Carmo, pelo amor e apoio incondicional, e por sempre acreditarem que eu seria capaz. Às minhas irmãs, Letícia e Lívia, que torceram e vibraram comigo a cada passo. Aos meus sobrinhos, Henrique e Heitor, que com seus sorrisos me deram forças. Ao meu noivo, André, por todo amor, paciência, companheirismo, auxílio e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa por toda minha formação acadêmica, pelas imensas oportunidades e estrutura oferecida.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional. A todos os professores do departamento de Microbiologia pelos valiosos ensinamentos e conhecimento compartilhado.

Ao professor Luciano Gomes Fietto pela oportunidade, confiança em meu trabalho, ensinamentos e compreensão.

Aos professores Tiago Mendes e Wendel da Silveira pelas contribuições, ensinamentos e disponibilidade.

Aos demais membros da banca, Prof<sup>a</sup>. Andréa Ribon e Dr. Fernando da Silveira, pela disponibilidade e contribuições para deste trabalho.

A todos aqueles que passaram e aos que continuam no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM), meu muito obrigada. Agradeço por contribuírem para meu crescimento profissional e pessoal, através do conhecimento compartilhado, imensa ajuda e amizade. Em especial à Fernanda, minha parceira e amiga nessa jornada, que sempre esteve ao meu lado em cada etapa deste trabalho e tornou o processo mais leve, proporcionando valiosos momentos de discussão e troca de experiências.

À Patrícia e Alex que sempre estiveram dispostos a ajudar nos experimentos e imenso apoio.

Ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo acolhimento. A todos os professores e funcionários pela ajuda e convivência, em especial ao João Guilherme pelo auxílio no manuseio do HPLC.

Muito obrigada às velhas amigas, pelos momentos de descontração e incentivo. Em especial à Aline e Gabriel, minha família viçosense. À Larissa por sempre me incentivar, mesmo não estando por perto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À CAPES, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

RIBEIRO, Lílian Emídio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Influência da glicose na regulação do metabolismo de xilose em *Spathaspora passalidarum***. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A levedura *Spathaspora passalidarum* possui grande potencial de converter glicose e xilose de materiais lignocelulósicos em bioetanol. No entanto, essa levedura utiliza esses açúcares de forma sequencial, sendo a glicose consumida preferencialmente em relação à xilose. O presente trabalho buscou identificar as principais formas que glicose interfere no metabolismo de xilose em *S. passalidarum*. Primeiramente foi avaliado a influência da glicose no consumo de xilose, produção de etanol, expressão de genes e atividade das enzimas chave para assimilação de xilose, em condições de aeração e de limitação de oxigênio. Os principais resultados obtidos mostram que a glicose inibe o consumo de xilose dessa levedura, independente da condição de oxigenação e da sua concentração extracelular. Os genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR), xilose desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK) foram menos expressos quando glicose estava presente no meio, indicando a ocorrência de repressão por glicose no metabolismo de xilose. Porém, testes de crescimento utilizando o análogo de glicose 2-deoxiglicose (2DG) revelaram a ausência de repressão catabólica, embora a 2DG atrase o consumo de xilose quando presente no meio. Assim, é possível que a interferência da glicose no metabolismo da xilose de *S. passalidarum* possa estar ocorrendo a nível de transporte. Para entender a influência da glicose no transporte de xilose primeiramente identificamos potenciais transportadores de glicose e xilose no genoma dessa levedura. O perfil de expressão dos genes que codificam os potenciais transportadores, sugere que essa levedura possui vias de detecção e regulação transcricional de transportadores de açúcares. Para caracterização funcional, quatro prováveis transportadores foram selecionados e expressos na linhagem de *S. cerevisiae* DGLK1. Essa linhagem possui a deleção dos principais transportadores de hexose (hxt1-hxt7 e gal2) e, portanto, somente será capaz de crescer em meio contendo glicose ou xilose como fonte de carbono, através da expressão de um transportador heterólogo. Apenas um dos transportadores testados foi capaz de restaurar o crescimento de *S. cerevisiae* DGLK1 em meio sólido

com xilose ou glicose. A estrutura proteica deste alvo é característica de um transportador de açúcar e as análises de *docking* mostraram que a glicose tem maior afinidade de ligação a esse transportador, comparado à xilose e 2DG. Dessa forma, sugerimos que a glicose interfere no metabolismo de xilose através da inibição do transporte de xilose, por meio da competição pelo mesmo transportador. Além disso, a glicose controla, por mecanismos ainda desconhecidos, a expressão dos genes que codificam os transportadores de açúcares e os genes das principais enzimas do metabolismo da xilose. Assim, estes pontos de regulação precisam ser investigados e contornados para obter a máxima eficiência no consumo simultâneo destes açúcares por *S. passalidarum*.

Palavras-chave: *Spathaspora passalidarum*. Cofermentação. Repressão por glicose

## ABSTRACT

RIBEIRO, Lílian Emídio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Influence of glucose on the regulation of xylose metabolism in *Spathaspora passalidarum*.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

The yeast *Spathaspora passalidarum* presents great potential to convert glucose and xylose from lignocellulosic materials into bioethanol. However, this yeast uses these sugars sequentially, with glucose being preferably consumed than xylose. The present work sought to identify the main ways that glucose interferes with the xylose metabolism of *S. passalidarum*. First, the influence of glucose on xylose consumption, ethanol production, gene expression, and activity of key enzymes involved in xylose assimilation were evaluated under aeration and oxygen limiting conditions. The main results show that glucose inhibits xylose consumption regardless of the oxygen condition and extracellular concentration of glucose. The genes encoding the enzymes xylose reductase (XR), xylose dehydrogenase (XDH), and xylulokinase (XK) were less expressed when glucose was present in the medium, suggesting the occurrence of glucose repression on xylose metabolism. However, growth tests using the glucose analog 2-deoxyglucose (2DG) revealed the absence of catabolic repression, even though 2DG delayed the consumption of xylose when present in the medium. Thus, it is possible that the glucose interference on the xylose metabolism of *S. passalidarum* may occur at the transport level. To understand the influence of glucose on xylose transport, we first identified potential glucose and xylose transporters in the genome of this yeast. The expression profile of these putative transporter genes suggests that *S. passalidarum* presents pathways that detect and transcriptionally regulate the expression of sugar transporters. For the functional characterization assay, four putative transporters were selected and expressed in *S. cerevisiae* DGLK1. This strain has the main hexose transporters (hxt1-hxt7 and gal2) deleted from its genome, and therefore, it is only able to grow in a medium containing glucose or xylose as carbon sources through the expression of heterologous transporters. Only one of the evaluated transporters restored the growth of *S. cerevisiae* DGLK1 on solid media supplemented with xylose or glucose. The protein structure of this target is characteristic of a sugar transporter, and the docking analyzes showed that glucose has a higher binding affinity for this transporter than xylose and 2DG. Thus, we suggest



that glucose interferes with xylose metabolism by inhibiting xylose transport through competition for the same sugar transporter. In addition, glucose controls the expression of genes encoding sugar transporters and the main enzymes of xylose metabolism by yet unknown mechanisms. Thus, these regulatory points need to be investigated and bypassed to obtain maximum efficiency in the simultaneous consumption of these sugars by *S. passalidarum*.

Keywords: *Spathaspora passalidarum*. Co-fermentations. Glucose repression

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Bioetanol .....	12
1.2 <i>Spathaspora passalidarum</i> .....	13
1.3 Vias de sinalização à glicose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
1.4 Influência da glicose no metabolismo de xilose.....	20
1.5 Transportadores de açúcares em fungos .....	22
Capítulo I .....	26
1. INTRODUÇÃO .....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Linhagens e manutenção.....	29
2.2 Fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes condições de oxigênio.....	29
2.3 Métodos analíticos .....	30
2.4 Parâmetros fermentativos .....	30
2.5 Análise de expressão dos genes do metabolismo de xilose .....	31
2.6 Atividades enzimáticas.....	32
2.7 Efeito da concentração de glicose na utilização de xilose .....	33
2.8 Efeito de 2-deoxiglicose (2DG) na utilização de xilose. ....	33
3. RESULTADOS .....	34
3.1 Fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes condições de oxigenação...34	
3.2 Expressão dos genes <i>XYL1.1</i> , <i>XYL1.2</i> , <i>XYL2.1</i> e <i>XKS1</i> durante fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes níveis de oxigênio.....	37
3.3. Atividades enzimáticas de XR, XDH e XK durante fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes níveis de oxigênio .....	40
3.4 Efeito de diferentes concentrações de glicose e 2DG no metabolismo de xilose. ....	42
4. DISCUSSÃO .....	45
Capítulo II .....	51
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Linhagens e manutenção.....	53
2.2 Identificação dos potenciais transportadores de xilose e/ou glicose de <i>S. passalidarum</i> .....	54

2.3 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR .....	55
2.4 Caracterização funcional dos transportadores putativos de xilose e/ou glicose ..	57
2.5 Crescimento em meio sólido .....	59
2.6 Condições de fermentação .....	60
2.7 Modelagem da estrutura dos transportadores .....	61
2.8 Predição de afinidade .....	61
3. RESULTADOS .....	61
3.1 Identificação dos potenciais transportadores de xilose e/ou glicose .....	61
3.2 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR .....	64
3.3 Caracterização funcional dos transportadores putativos de xilose e/ou glicose. 69	
3.4 Modelagem molecular e <i>docking</i> .....	73
4. DISCUSSÃO .....	77
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
APÊNDICE .....	96

## INTRODUÇÃO GERAL

A produção de etanol de segunda geração pode contribuir para o aumento da produtividade de etanol no Brasil, pois resíduos da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar, gerados a partir da produção de etanol de primeira geração, são utilizados como matéria prima para sua obtenção (Zabed et al., 2017). Os açúcares estão nas frações celulósica e hemicelulósica da planta, sendo os mais abundantes a glicose e xilose (Socol et al., 2010). O consumo simultâneo desses açúcares pelo microrganismo fermentador contribui para a viabilidade do processo de produção (Kim et al., 2012). Entretanto, em um meio com mistura de açúcares, a maioria dos microrganismos utiliza preferencialmente a glicose e, somente após seu esgotamento, metaboliza xilose. Isso implica em menores rendimentos de etanol e aumento do tempo de fermentação. Além disso, o uso sequencial de açúcar pode resultar em consumo incompleto de substrato, pois os produtos podem atingir níveis inibitórios antes do metabolismo completo dos açúcares (Long et al., 2012; Lee et al., 1990).

A levedura *Spathaspora passalidarum* tem sido considerada a melhor candidata para domesticação visando a produção de etanol a partir de xilose (Cadete e Rosa, 2018). Embora existam estudos sobre o efeito da glicose sobre o consumo de xilose em *S. passalidarum* (Du et al., 2019; Hou, 2012; Long et al., 2012; Rodrussamee et al., 2018), ainda precisa ser investigado a nível molecular como glicose pode influenciar a regulação do seu metabolismo.

Os principais alvos descritos do metabolismo de xilose que poderiam ser afetados pela glicose são a expressão ou atividade das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), além do transporte de xilose para o interior da célula (Harner et al., 2015; Hou, 2012). Dessa forma, é importante investigar os efeitos da glicose na expressão de genes responsáveis pela assimilação de xilose, como as enzimas e transportadores desse açúcar. Porém, poucos detalhes são conhecidos sobre a caracterização do sistema de transporte de xilose e glicose de *S. passalidarum*, sendo necessária a identificação desses componentes. O presente trabalho teve como objetivo identificar a influência da glicose no consumo de xilose em diversas condições de cultivo. Além disso, foi avaliado a regulação da expressão e atividade das enzimas envolvidas na assimilação de xilose. Por fim, buscou-se identificar e caracterizar transportadores de xilose e glicose nessa levedura. O estudo das principais formas que glicose pode interferir no metabolismo de xilose de *S.*

*passalidarum* irá possibilitar a busca de estratégias que possibilite a obtenção de linhagens mais eficientes na assimilação desses substratos.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 Bioetanol**

O bioetanol é considerado uma alternativa importante ao uso de combustíveis fósseis. A queima de combustíveis fósseis para a produção de energia libera gases que contribuem para o efeito estufa. Entretanto, o bioetanol é produzido a partir da fermentação microbiana de várias fontes renováveis ricas em carboidratos como sacarose, amido, celulose e xilose (Zabed et al., 2017). Assim, a utilização do bioetanol reduz os impactos ambientais comparados aqueles gerados pelo uso de combustíveis fósseis (Dos Santos et al., 2016; Soccol et al., 2010). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, sendo a cana-de-açúcar a matéria-prima mais utilizada (Dos Santos et al., 2016). Dados da Renewable Fuels Association, mostram que em 2021, o Brasil produziu 7.500 milhões de galões de etanol, o que corresponde a 27% da produção mundial

A principal forma de produção de etanol no Brasil é a partir da fermentação microbiana da sacarose contida no caldo de cana-de-açúcar, gerando o etanol de primeira geração (1G). Entretanto, a produção do etanol 1G não aproveita todos os açúcares constituintes da planta, como aqueles presentes nas folhas, palha e bagaço (Soccol et al., 2010). Assim, o aproveitamento desses açúcares para a produção de etanol, o qual é conhecido de segunda geração (2G), contribui para o aumento da produção desse biocombustível (Dos Santos et al., 2016; Sharma et al., 2020; Soccol et al., 2010).

Portanto, o etanol 2G é produzido a partir da fermentação microbiana dos açúcares presentes nas frações celulósica e hemicelulósica da biomassa lignocelulósica. Os principais açúcares que constituem essas frações são a glicose e a xilose (Soccol et al., 2010). Esses monômeros encontram-se fortemente associados em complexos cristalinos, e para que se tornem acessíveis aos microrganismos fermentadores, é necessário que essa biomassa seja previamente tratada nos processos denominados como pré-tratamento e sacarificação. A etapa de pré-tratamento tem como objetivo a separação das frações de celulose, hemicelulose e

lignina que compõem a biomassa lignocelulósica, reduzindo a recalcitrância da parede celular da planta. A lignina é um polímero formado por resíduos fenólicos, e constitui uma barreira física que dificulta o acesso de enzimas e microrganismos às frações de celulose e hemicelulose (van Maris et al., 2006). Os métodos utilizados nessa etapa podem ser químicos, físicos ou biológicos. Após o pré-tratamento da biomassa, os polímeros de açúcares se tornam acessíveis ao complexo enzimático utilizado na etapa de sacarificação, liberando monômeros de açúcares a serem utilizados no processo de fermentação (Dos Santos et al., 2016).

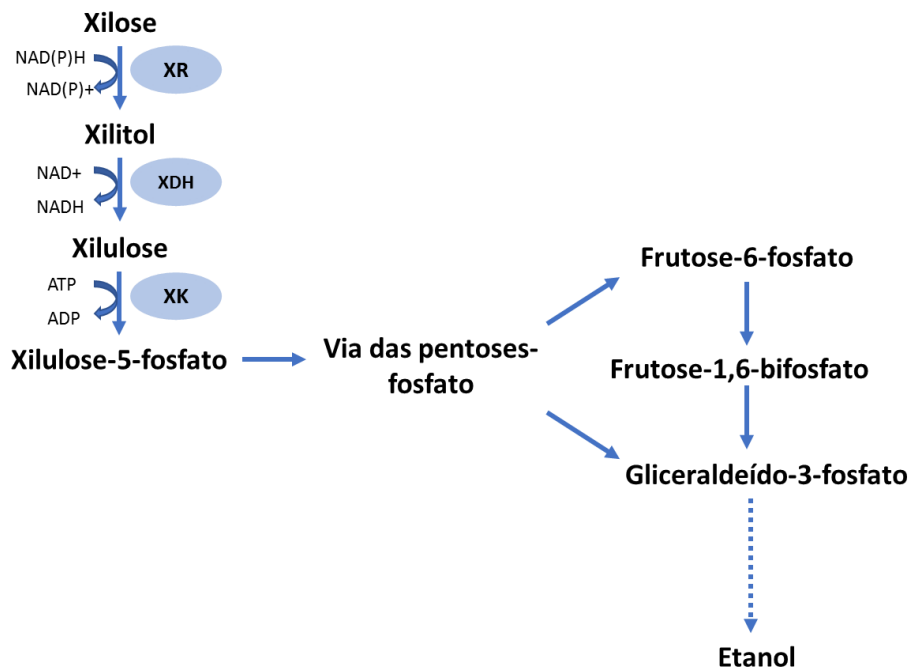
Na etapa de fermentação são utilizados microrganismos fermentadores capazes de converter os açúcares em etanol. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo predominantemente utilizado no processo industrial de etanol 1G, devido a sua capacidade de converter sacarose em etanol com altos rendimentos e maior tolerância ao etanol comparada a outras leveduras (Moysés et al., 2016). Para a produção de etanol 2G, o microrganismo utilizado nessa etapa deve ser capaz também de utilizar a pentose xilose, monômero liberado da fração hemicelulósica da planta. Entretanto, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não são capazes de eficientemente assimilar essa pentose, pois os genes que codificam as enzimas necessárias para o metabolismo de xilose são expressos em baixos níveis. Além disso, a levedura não possui transportadores específicos para xilose (Hahn-Hägerdal et al., 2007). Linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*, contendo genes do metabolismo e transportadores de xilose heterólogos vem sendo desenvolvidas. Porém, essas linhagens possuem limitações, visto que apresentam taxas de conversão de xilose a etanol inferiores comparadas ao cultivo com glicose (Moysés et al., 2016). Apesar da utilização de estratégias de engenharia metabólicas para melhorar a fermentação de xilose de linhagens de *S. cerevisiae*, ainda permanecem problemas como baixo consumo de xilose e baixos rendimentos de etanol (Ochoa-Chacón et al., 2021). Dessa forma, a fermentação de pentoses é um dos desafios da produção de etanol 2G. Neste contexto, diversas pesquisas focam no estudo de novas leveduras que naturalmente fermentam essa pentose.

## **1.2 *Spathaspora passalidarum***

A levedura *Spathaspora passalidarum* é caracterizada como uma eficiente fermentadora de xilose (Cadete e Rosa, 2018; Martinez-jimenez et al., 2021; Selim et

al., 2020), e frequentemente isolada de habitats associados com madeira em decomposição (Cadete et al., 2012; Nguyen et al., 2006; Rodrussamee et al., 2018). A linhagem tipo (NRRLY 27907) foi isolada a partir do intestino de besouros que se alimentam de madeira por (Nguyen et al., 2006). Estudos mostram que *S. passalidarum* apresenta maior produção de etanol a partir da fermentação de xilose, em comparação à *Sheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), levedura fermentadora de xilose amplamente estudada, e outras espécies do gênero *Spathaspora* (Cadete and Rosa, 2018; Hou, 2012; Veras et al., 2017). A maior eficiência de fermentação obtida por *S. passalidarum* pode estar relacionada ao balanço de cofatores existente entre as duas primeiras enzimas da via de utilização de xilose: xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) (Cadete et al., 2016; Cadete and Rosa, 2018; Hou, 2012).

Em leveduras, a via oxidorreductiva converte xilose em xilulose. A primeira reação é a redução de xilose a xilitol catalisada pela enzima XR. Posteriormente, a oxidação do xilitol à xilulose é mediada pela enzima XDH. Por fim, ocorre a fosforilação da xilulose pela enzima xiluloquinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato. A xilulose-5-fosfato pode ser convertida, através da via das pentoses-fosfato, em gliceraldeído-3-fosfato ou frutose-6-fosfato, e conectam-se com a via glicolítica (Figura 1) (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Hou, 2012).



**Figura 1:** Esquema simplificado do metabolismo fermentativo de xilose. Fonte: modificado de Moysés *et al.*, 2016.

*S. passalidarum* apresenta dois genes que codificam a enzima xilose redutase (*XYL1.1* e *XYL1.2*) (Wohlbach et al., 2011). A enzima codificada pelo gene *XYL1.1* é estritamente dependente de NADPH, enquanto que o gene adicional *XYL1.2* codifica uma enzima que utiliza NADPH e NADH, com preferência por NADH (Cadete et al., 2016) (Figura 1). A maioria das enzimas XR de outras leveduras prefere ou utiliza apenas NADPH, enquanto que a segunda enzima XDH de todas as leveduras descritas até o momento, é estritamente dependente NAD<sup>+</sup> como cofator (Cadete et al., 2016; Hou, 2012). Assim, ocorre um equilíbrio redox entre oferta e demanda de cofatores através das enzimas XR e XDH da via de assimilação de xilose em *S. passalidarum*, o que não é observado nas demais leveduras, e que contribui para a maior eficiência de fermentação nas condições limitantes de oxigênio (Cadete et al., 2016; Hou, 2012).

Apesar da capacidade fermentativa de *S. passalidarum*, alguns entraves limitam sua utilização biotecnológica para produção de etanol 2G, como por exemplo, a baixa tolerância aos principais inibidores (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético), os quais são produzidos durante a hidrólise da lignocelulose (Harner et al., 2015). Os estudos que investigaram a fermentação de *S. passalidarum* na presença desses inibidores em meio sintético, mostram que o ácido acético é o que mais afeta o desempenho fermentativo dessa levedura (Campos et al., 2022; Soares et al., 2020). Diversas estratégias vêm sendo estudadas para contornar esse problema, como a aplicação de uma alta densidade celular inicial para diminuir os efeitos prejudiciais dos compostos inibidores (Soares et al., 2020), adaptação da célula aos inibidores gerados e processos de desintoxicação (Jönsson et al., 2013). No entanto os principais aspectos a serem melhorados para aumentar o desempenho fermentativo de *S. passalidarum*, são a baixa tolerância ao produto de interesse etanol e o efeito negativo da glicose no metabolismo de xilose (Campos et al., 2022). Para obter uma levedura robusta capaz de contornar esses problemas, são necessários mais estudos investigando as principais formas de regulação da levedura relacionados a esses fatores.

Os principais açúcares constituintes da biomassa lignocelulósica são a glicose e xilose presentes nas frações celulósica e hemicelulósica. Assim, tem-se o interesse por microrganismos fermentadores que sejam capazes de consumir simultaneamente ambos os açúcares, tornando o processo de produção de etanol economicamente viável (Kim et al., 2012). Entretanto, a maioria dos microrganismos tem preferência ao



consumo de glicose, e somente após seu esgotamento, consome outra fonte de carbono disponível no meio, como por exemplo a xilose. Na levedura modelo *S. cerevisiae*, esse fenótipo ocorre devido ao mecanismo de repressão por glicose no uso de fontes, sendo as principais vias envolvidas, a via Snf3/Rgt2 e a via Snf1/Mig1p (Conrad et al., 2014). Porém ainda não é conhecido como o metabolismo de xilose é regulado por glicose em *S. passalidarum* (Long et al., 2012). Compreender os mecanismos moleculares de regulação do metabolismo de xilose de *S. passalidarum* irá permitir desenvolver linhagens recombinantes, capazes de eliminar um dos obstáculos existentes para a fermentação com alto rendimento a partir da biomassa lignocelulósica.

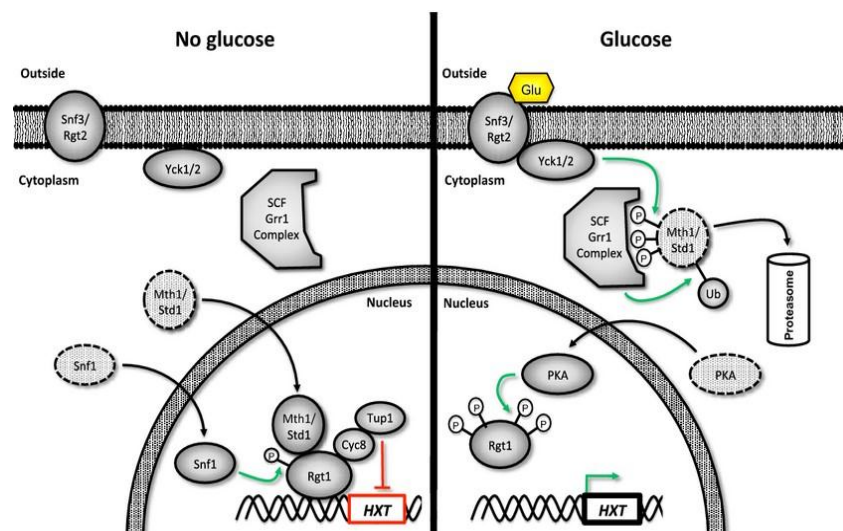
### **1.3 Vias de sinalização à glicose em *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *S. cerevisiae* possui diversas vias que detectam as mudanças de concentrações de nutrientes no ambiente. A glicose é preferencialmente consumida pela célula, sendo utilizada como fonte de energia e esqueleto de carbono para a maioria das moléculas biológicas. As vias Snf3/Rgt2, Snf1/Mig1p e cAMP/PKA estão relacionadas à sinalização desse nutriente (Rødkær and Færgeman, 2014).

A via Snf3p/Rgt2p está envolvida na regulação dos genes que codificam as proteínas transportadoras de hexose (HXT). As proteínas Snf3 e Rgt2 são sensores presentes na membrana plasmática, com a função de detectar a glicose no meio extracelular. Essas proteínas são estruturalmente semelhantes às proteínas transportadoras de glicose, possuindo 12 hélices transmembranas. Diferentemente, os sensores apresentam longas caudas C terminal, que estão voltadas para o lado citoplasmático da membrana plasmática, e não são capazes de transportar qualquer substrato. O sensor Snf3p é um sensor de alta afinidade e detectam baixas concentrações de açúcares. Enquanto a proteína Rgt2p é um sensor de baixa afinidade, responsável por detectar altas concentrações de glicose. A ligação de glicose a esses sensores desencadeia uma cascata de sinalização que regulam a expressão dos genes *HXT* (Conrad et al., 2014; Rødkær and Færgeman, 2014).

A proteína Rgt1p possui um domínio de ligação ao DNA e está associada aos promotores dos genes *HXT*, juntamente com as proteínas repressoras Cyc8/Tup1, e Mth1/Std1, impedindo a expressão desses genes quando glicose está ausente no meio extracelular. Quando glicose está presente, é detectada pelos sensores

Snf3/Rgt2, os quais interagem e estimulam duas caseínas quinases Yck1/2. Essas quinases fosforilam as proteínas regulatórias Mth1 e Std1, desencadeando sua ubiquitinação dependente de Grr1 e subsequente degradação via proteassoma. Conseqüentemente o repressor transcricional Rgt1 fica livre para ser fosforilado pela proteína-quinase A dependente de cAMP (PKA). A hiperfosforilação causa a dissociação de Rgt1 aos promotores dos genes *HXT*, aliviando a repressão da transcrição *HXT* (Conrad et al., 2014; Horák, 2013; Rødkær and Færgeman, 2014) (Figura 2).



**Figura 2:** Via Snf3/Rgt2. Na ausência de glicose, Mth1p/Std1p estão ligados à Rgt1p, juntamente com as proteínas repressoras Tup1/Cyc8. Como os sítios de hiperfosforilação de Rgt1p por PKA estão mascarados por Mth1p/Std1p, Rgt1p é monofosforilada por Snf1p, o que permite a sua ligação ao DNA, impedindo a transcrição dos genes *HXT*. A glicose é detectada pelos sensores de membrana Snf3p/Rgt2p, quando presente no meio extracelular. Posteriormente ocorre a ativação das caseína-quinases Yck1/2p, levando à fosforilação dos fatores de transcrição Mth1p/Std1p. A fosforilação é reconhecida pelo complexo ubiquitina ligase SCF<sup>Grr1</sup>, e tais proteínas são marcadas para degradação. Isso permite que Rgt1p seja fosforilado por PKA, deixando de se ligar ao DNA, permitindo a transcrição de genes *HXT*. A seta verde indica ativação, a caixa e linha vermelhas indica inibição e as setas pretas indicam eventos de realocação. Adaptado de Rødkær e Færgeman, 2014.

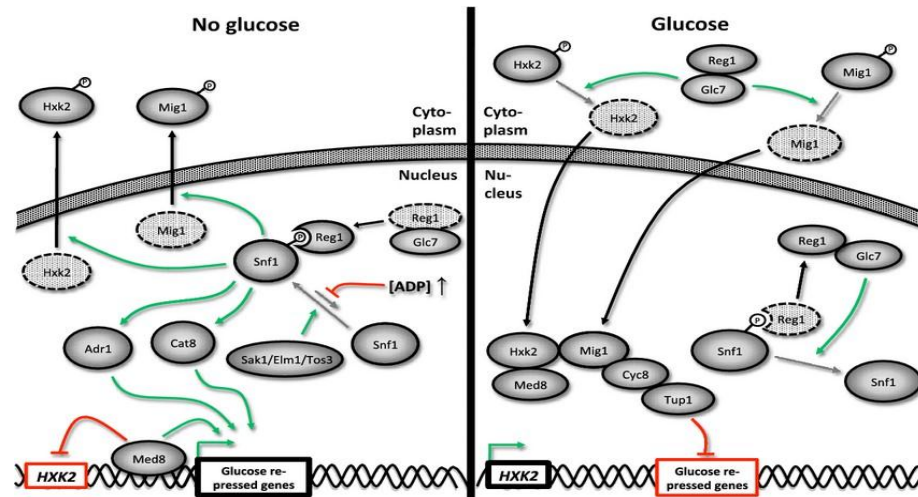
A via Snf1/Mig1p está principalmente envolvida na regulação de genes relacionados à utilização de fontes alternativas de carbono, e genes envolvidos na gliconeogênese, função respiratória e alguns genes transportadores *HXT* (Horák, 2013; Rødkær e Færgeman, 2014). Os principais componentes dessa via são as proteínas Snf1, Mig1 e a enzima Hxk2 (Conrad et al., 2014).

A proteína Mig1 possui domínio de ligação ao DNA, atuando como repressor, induzido por glicose, de genes relacionados a utilização de fontes alternativas, como: *GAL83*, *SUC2*, *MAL62*, *LAC4* e *LAC12* (Nurcholis et al., 2019; Santangelo, 2006). A capacidade de Mig1p atuar como repressor depende da sua localização subcelular, de acordo com seu status de fosforilação (Conrad et al., 2014). A enzima hexoquinase 2 (Hxk2p) é uma proteína bifuncional que atua no citoplasma e no núcleo da célula. No núcleo, age como um repressor transcricional em um complexo com Mig1p e outras proteínas, e no citoplasma, participa da via glicolítica, catalisando a conversão hexoses para hexoses-6-fosfato, em uma reação dependente de ATP (Conrad et al., 2014; Santangelo, 2006).

Snf1p é uma proteína serina/treonina cinase heterotrimérica que possui um papel central na via Snf1/Mig1p. É composta pelas subunidades catalítica  $\alpha$  (Snf1), regulatória  $\gamma$  (Snf4) e a subunidade  $\beta$  (Gal83, Sip1 ou Sip2). A  $\beta$ -subunidade é responsável pela localização subcelular de Snf1. Na ausência de glicose, a proteína Snf1p contendo Sip1 é realocada à membrana vacuolar, contendo Gal 83 localiza-se no núcleo e com Sip2 permanece citoplasmática. A ativação de Snf1 está associada ao aumento da fosforilação do resíduo Thr210 pelas proteínas quinases Sak1, Tos3 e Elm1. A desfosforilação é realizada pelas proteínas fosfatases Reg1-Glc7 (Conrad et al., 2014).

Quando a glicose está presente no meio, a cascata de sinalização por essa via, envolve primeiramente o transporte de glicose para o interior celular e subsequente fosforilação por Hxk2p. Esse sinal causa a desfosforilação de Mig1 e Hxk2 pelas fosfatases Reg1-Glc7, o que ocasiona a translocação dessas proteínas ao núcleo. Dentro do núcleo, Mig1 e Hxk2 mediam a repressão da glicose de múltiplos genes por interagir com o complexo mediador Med8 e as proteínas repressoras Cyc8-Tup1. O complexo Med8 é uma subunidade da RNA polimerase II que possui efeito repressor no gene *HXK2* e ativador de genes reprimidos por glicose, como o gene *SUC2*. Nessa situação a Snf1 encontra-se inativa, sendo desfosforilada pelas proteínas fosfatases

Reg1-Glc7 *HXT* (Conrad et al., 2014; Horák, 2013; Rødkær and Færgeman, 2014) (Figura 3).



**Figura 3:** Via Snf1/Mig1. Na ausência de glicose, Snf1 é fosforilada em Thr210, subsequentemente fosforila os alvos Hxk2 e Mig1, acarretando dissociação do complexo repressor Tup1-Cyc8. Hxk2 e Mig1 fosforiladas são exportadas do núcleo, havendo a desrepressão de genes. Snf1 também fosforila os fatores de transcrição Cat8 e Adr1, que se ligam no promotor dos genes alvos. Na presença de glicose, Snf1, Hxk2 e Mig1 são desfosforiladas pela fosfatase Glc7-Reg1, o que causa a importação nuclear de Hxk2 e Mig1, restabelecendo sua atividade repressora. A seta verde indica ativação, a caixa e linha vermelhas indicam inibição, a seta cinza indica reação metabólica e as setas pretas indicam eventos de realocação. Adaptado de Rødkær e Færgeman, 2014.

Na ausência de glicose, a aumento da concentração de ADP protege Snf1 contra a desfosforilação de Thr210, ativando assim a quinase. Também ocorre a ativação de Snf1 através da sua fosforilação por proteínas quinases, ocasionando a fosforilação dos seus alvos, como Mig1 e HxK2, o que impede a localização nuclear desses repressores. Consequentemente, Med8 estimula a transcrição de genes reprimidos por glicose e inibe a expressão gênica de Hxk2. Outros alvos fosforilados por Snf1 são os fatores de transcrição Cat8, responsável pela indução de genes da gliconeogênese, e Adr1, envolvido na indução de genes envolvidos na oxidação de

ácidos graxos e metabolismo do etanol (Conrad et al., 2014; Horák, 2013; Rødkær and Færgeman, 2014) (Figura 3).

Outra via que sinaliza as concentrações de glicose extracelular é a via cAMP/PKA. Essa via controla vários processos importantes, incluindo o crescimento eficiente da célula e proteção a vários estresses. Em resposta à presença de glicose, essa via estimula a fermentação e reprime a tolerância ao estresse e mecanismos de adaptação (Conrad et al., 2014; Rødkær and Færgeman, 2014).

#### **1.4 Influência da glicose no metabolismo de xilose**

Os mecanismos de repressão por glicose em *S. cerevisiae* são bem elucidados, porém ainda não é conhecido como o metabolismo de xilose é regulado por glicose, visto que linhagens selvagens não utilizam de forma eficiente essa pentose. Brink e colaboradores (2021) revisaram diversos trabalhos que avaliaram a detecção e sinalização de xilose em *S. cerevisiae* engenheirada, com as vias de utilização de xilose, e algumas linhagens selvagens. Os autores resumiram mecanismos hipotéticos para a detecção dessa pentose em *S. cerevisiae*, os quais devem ser investigados futuramente. Esses mecanismos propõem que a molécula de xilose pode ser reconhecida por algumas vias e os sensores de glicose podem detectar também a xilose, porém com intensidades diferentes da glicose. Os metabólitos formados pelo catabolismo de xilose são detectados pelas vias de sinalização de *S. cerevisiae*, porém em diferentes níveis comparados ao catabolismo de glicose. Por fim, as diferenças no nível energético a partir da assimilação de xilose é sinalizada como uma mudança na homeostase celular, o que limita a célula entrar nos estados de fermentação ou respiração (Brink et al., 2021).

Nesse contexto, o conhecimento da sinalização endógena de xilose da levedura não-convencional *S. passalidarum* é importante para esclarecer os mecanismos moleculares e desenvolver novas estratégias de engenharia. Até o momento, os estudos sobre a cofermentação de glicose e xilose por *S. passalidarum* focam na avaliação do consumo desses açúcares.

Estudos relatam que o nível de oxigênio no meio interfere o consumo de glicose e xilose pela linhagem *S. passalidarum* NRRLY 27907 (Hou, 2012; Long et al., 2012). Segundo Hou (2012), a glicose poderia interferir no transporte de xilose para o interior celular, pela ocupação dos transportadores, bloqueando a passagem de xilose. Nesse

estudo, *S. passalidarum* consumiu sequencialmente glicose e xilose em condições anaeróbicas, e simultaneamente em condições aeróbicas. Em condições anaeróbicas provavelmente o único sistema de transporte utilizado por esta levedura é de difusão facilitada de baixa afinidade, visto que a depleção de ATP pode impedir o simporte de xilose e próton. Portanto, a glicose poderia estar ocupando este transporte e bloqueando a passagem intracelular de xilose. Além disso, foi observado uma repressão significativa da atividade enzimática das enzimas XR e XDH na presença de glicose, sugerindo que a glicose pode causar um sinal de repressão na expressão induzida por xilose dos genes que codificam as enzimas XR e XDH (Hou, 2012). Esse perfil de bloqueio do consumo de xilose pela glicose também foi observado na cofermentação de glicose, xilose e celobiose em condições limitantes de oxigênio por Long *et al.* (2012). Enquanto que em condições aeróbicas também foi observado consumo simultâneo de glicose e xilose (Long *et al.*, 2012). Recentemente, Bonan e colaboradores (2020) avaliaram a cofermentação de glicose e xilose em quatro diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ), e nenhuma das condições avaliadas *S. passalidarum* consumiu xilose e glicose simultaneamente como observado anteriormente por Long *et al.* (2012) e Hou (2012).

Em outro estudo, foi realizado a cofermentação de xilose (10% (m/v) e glicose (2% e 4% (m/v)) por *S. passalidarum* em meio sintético e em aerobiose. Nesse estudo, a taxa de consumo de xilose foi menor na presença de glicose, e o aumento da concentração de glicose resultou em maior redução na taxa de consumo de xilose. Conseqüentemente, foi observada a redução da eficiência de fermentação e a produtividade de etanol (Campos *et al.*, 2022). Na fermentação do hidrolisado também foi observado que a taxa de consumo de xilose aumentou somente após a depleção de glicose (Lima *et al.*, 2015).

Apesar destes estudos demonstrarem o fenótipo de consumo dos açúcares glicose e xilose por *S. passalidarum* NRRLY 27907 em diversas condições (Hou, 2012; Long *et al.*, 2012), estudos a nível transcricional em condições de misturas de açúcares são importantes, a fim de compreender se a regulação do metabolismo de xilose por glicose ocorre em parte na expressão dos genes do seu metabolismo.

## 1.5 Transportadores de açúcares em fungos

Existem mecanismos a nível de transporte que regulam a entrada, no interior celular, dos diferentes carboidratos disponíveis no meio. Essa regulação é estabelecida por uma complexa rede regulatória, que em conjunto, ocasiona o fenótipo de consumo preferencial de glicose (Horák, 2013).

Em *S. cerevisiae* é compreendido que a glicose e hexoses facilmente fermentáveis, como a frutose, são capazes de regular o transporte de outras fontes de carbono, nos níveis de expressão gênica e pós-traducional. A via Snf1p-Migp é a principal via de repressão por glicose de genes que codificam as proteínas envolvidas no transporte e utilização de fontes alternativas de carbono, como galactose, maltose, sacarose e outras (Conrad et al., 2014; Horák, 2013). Em nível pós-traducional ocorre o processo denominado inativação catabólica, no qual proteínas transportadoras de fontes alternativas de carbono são reguladas negativamente quando células estão em meio com a fonte alternativa e são expostas à glicose. A eliminação dessas proteínas transportadoras presentes na membrana ocorre através da ubiquitinação, de um ou mais resíduos de lisina, promovida pela glicose, o que desencadeia a internalização pela via endocítica e degradação no vacúolo (Horák, 2013). Além dessas vias regulatórias, as diferentes afinidades de ligação de glicose e os demais açúcares à proteína transportadora, estabelece uma ordem de importação dos açúcares (Farwick et al., 2014).

Os transportadores de açúcares pertencem à superfamília *Major Facilitator Superfamily* (MFS) e são proteínas ancoradas na membrana plasmática que possuem 12  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas transmembranas, divididas em dois conjuntos de seis, conectados por um loop hidrofílico. Esse transporte varia quanto ao mecanismo de captação de açúcares, podendo ser classificado em difusão facilitada e transporte ativo (Leandro et al., 2009). Na levedura *S. cerevisiae* o transporte de hexoses ocorre através de difusão facilitada e é mediado por uma família composta por 20 proteínas diferentes (Hxt1p a Hxt17p, Gal2p, Snf3p e Rgt2p). As proteínas Hxt1p a Hxt17p realizam a captação de glicose e outras hexoses, enquanto Snf3p e Rgt2p são sensores de glicose e não são capazes de transportar açúcares. A proteína Gal2p é responsável pela captação de galactose (Boles and Hollenberg, 1997; Horák, 2013; Leandro et al., 2009). O transporte de maltose por essa levedura ocorre pelo

mecanismo de transporte ativo, através do simporte com prótons, e pode ser realizado pelos transportadores Malp, Agt1p, Mph2p e Mph3 (Horák, 2013).

Os transportadores também podem ser classificados quanto sua afinidade pelo substrato, em baixa, moderada ou alta afinidade. A expressão dos genes HXT é regulada para otimizar o crescimento e o metabolismo celular de acordo com a presença e concentração de glicose no meio (Horák, 2013). Os genes HXT1 e HXT3 codificam transportadores de baixa afinidade pela glicose, os genes HXT2 e HXT4 de afinidade moderada e os genes HXT6 e HXT7 transportadores de alta afinidade. A proteína transportadora codificada pelo gene HXT5 possui afinidade moderada por glicose, e sua expressão não é regulada pela concentração extracelular desse açúcar, mas pela taxa de crescimento da célula. Os genes HXT8 a HXT17 são expressos em níveis muito baixos (Horák, 2013; Leandro et al., 2009). Quando esses genes são super-expressos individualmente em uma linhagem mutante *hxt1-17 gal2*, todos esses transportadores são capazes de restaurar o crescimento em hexoses (glicose, frutose, manose ou galactose), exceto HXT12. Assim, as proteínas Hxt8p-Hxt17p são consideradas transportadores de hexoses funcionais, no entanto, não contribuem para o transporte de glicose nas condições comuns de crescimento (Horák, 2013). As linhagens de *S. cerevisiae hxt-null* não possuem todos os transportadores de hexoses (*hxt 1-17*) ou os principais (*hxt 1-7*) e são utilizadas como plataformas para a caracterização de transportadores endógenos ou exógenos (Reifenberger et al., 1995; Wieczorke et al., 1999).

Em outras leveduras, como por exemplo *Kluyveromyces lactis*, o transporte de hexoses é realizado por dois transportadores não redundantes, Rag1p e Hgt1p, os quais realizam o mecanismo de difusão facilitada. A proteína Rag1p é um transportador de baixa afinidade, enquanto Hgt1p é um transportador de alta afinidade (Chen et al., 1992; Horák, 2013; Leandro et al., 2009). Em algumas linhagens o gene RAG1 é substituído por dois genes homólogos, KHT1 e KHT2 (Leandro et al., 2009; Weirich et al., 1997). Além disso, essa levedura possui o transportador de alta afinidade Frt1p que realiza o simporte de frutose/H<sup>+</sup> e um sensor de glicose Rag4p (Diezemann and Boles, 2003; Horák, 2013). A levedura *Candida albicans* possui uma família de proteínas de transporte Hgt1p-Hgt3p e Hgt5p-Hgt20p (Fan et al., 2002) e um sensor de hexose Hgt4p (Brown et al., 2006). Na levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, os primeiros transportadores de glicose, Sut1p, Sut2p e Sut3p, foram identificados e caracterizados por Wieczorke e colaboradores (1999). Posteriormente,



o sequenciamento do genoma dessa levedura identificou o gene SUT4 (Jeffries et al., 2007), o qual também foi caracterizado como um transportador funcional de glicose por complementação em *S. cerevisiae* (Moon et al., 2013).

O transporte de xilose ocorre através do sistema de difusão facilitada de baixa afinidade, o qual também transporta glicose, e de um sistema de simporte de prótons de alta afinidade (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Leandro et al., 2009). *S. cerevisiae* não apresenta transportadores específicos para essa pentose, e o transporte desse açúcar pode ser realizado pelos transportadores de hexose Hxtp, porém com baixa afinidade por xilose (Leandro et al., 2009). Assim, em meios contendo misturas de glicose e xilose, o consumo de glicose ocorre preferencialmente. Diversos genes que codificam transportadores de xilose são identificados em leveduras e fungos filamentosos que são capazes de assimilar naturalmente essa pentose. Em muitos estudos, as linhagens de *S. cerevisiae* hxt-null, recombinantes com os genes da via de metabolização de xilose, são utilizadas para a identificação e caracterização a partir da expressão heteróloga de transportadores de xilose (Leandro et al., 2006; Sloothaak et al., 2016; Young et al., 2011). A levedura *Candida intermedia* possui os transportadores Gxf1p e Gxs1p caracterizados como facilitador de glicose/xilose e simporte de glicose/xilose, respectivamente (Leandro et al., 2006). No genoma de *S. stipitis* os genes XUT (XUT1-7) são anotados como transportadores putativos de xilose (Jeffries et al., 2007). O transportador Xyp29p (Xut6p) foi caracterizado de forma molecular e bioquímica como específico de xilose, o qual realiza o mecanismo de difusão facilitada, e não transporta a glicose (Du et al., 2010). Young e colaboradores (2011) avaliaram a funcionalidade dos genes XUTs e identificaram que os genes XUT1 e XUT3 são capazes de transportar hexoses e xilose, porém com maior preferência pela glicose. Posteriormente, Moon e colaboradores (2013) identificaram que os genes RGT2 e XUT7 são capazes de transportar xilose através da super-expressão desses genes em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* recombinante com o gene xilose isomerase. Essa foi a primeira evidência de que Rgt2p é capaz de transportar xilose nessa levedura, mesmo sendo previamente anotado como transportador/sensor de glicose (Moon et al., 2013). Dentre os fungos filamentosos, os transportadores XltAp, XltBp e XltCp foram caracterizados como específicos para xilose em *Aspergillus niger* (Sloothaak et al., 2016). Em *Neurospora crassa*, o gene AN25 foi identificado como facilitador específico de xilose, sem atividade de glicose (Du et al., 2010). Os genes XAT-1 e XYT-1 também foram caracterizados em *N. crassa*

como transportadores de xilose, enquanto XAT-1 também é capaz de transportar arabinose (Li et al., 2014).

Para a levedura *S. passalidarum*, ainda não existem estudos sobre seu sistema de transporte (Rodrussamee et al., 2018). Identificar transportadores específicos de xilose nessa levedura é importante para melhorar sua utilização de xilose e em *S. cerevisiae* recombinante para aplicações na produção de etanol 2G. Além disso, é importante compreender se a glicose regula o transporte de xilose nessa levedura.

Capítulo I  
Influência da glicose na metabolização da xilose por *Spathaspora passalidarum*

Este capítulo é referente ao artigo publicado: Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., de Souza, G. B., Mendonça, J. G., Rosa, C. A., Mendes, T. A. O., Santana M. F., Silveira, W. B., Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose metabolism by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*, 157, 103624.

## 1. INTRODUÇÃO

O etanol de primeira geração (1G) é majoritariamente produzido a partir de cana de açúcar e milho, e sua utilização diminuiu a dependência em relação aos combustíveis fósseis. Entretanto a demanda pelo etanol compete com o uso de áreas agrícolas que poderiam ser utilizadas para produção de alimentos (Dos Santos et al., 2016; Soccol et al., 2010). Nesse contexto, o etanol de segunda geração (2G), que é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, é uma alternativa para aumentar a produção de etanol sem expandir as áreas de cultivo. Os açúcares mais abundantes nesta biomassa são a glicose, presente em ambas as frações, e a xilose presente na fração hemicelulósica. Para tornar o processo mais viável economicamente, é desejável que os microrganismos fermentadores sejam capazes de consumir simultaneamente ambos os açúcares (Kim et al., 2012). No entanto, a maioria apresenta repressão da glicose, o que causa o consumo preferencial de glicose devido à repressão de genes envolvidos no metabolismo de outras fontes de carbono, como a xilose (Conrad et al., 2014). Além da regulação da expressão gênica, outro mecanismo que leva ao consumo sequencial de glicose e xilose é a competição pelo mesmo transportador de açúcar. A inibição competitiva ocorre porque a afinidade de transporte pela glicose é muitas vezes maior do que pela xilose (Farwick et al., 2014). O uso sequencial dos açúcares aumenta o tempo de fermentação e pode levar ao consumo incompleto dos substratos diminuindo os rendimentos e produtividades de etanol do processo (Kim et al., 2012; Long et al., 2012).

Estudos mostram a potencial utilização da levedura *Spathaspora passalidarum* para produção de etanol a partir da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, pois essa levedura converte xilose a etanol com altos rendimentos (Cadete et al., 2016; Cadete e Rosa, 2018; Hou, 2012; Long et al., 2012, Su et al, 2015). Em limitação de oxigênio, condição industrialmente relevante, esta levedura obteve altos valores de produtividade específica de etanol ( $0,21-0,28 \text{ g.g}^{-1} \text{ CDW. h}^{-1}$ ) e um rendimento de etanol de  $0,48 \text{ g.g}^{-1}$ , que está próximo do máximo teórico ( $0,51 \text{ g.g}^{-1}$ ) para a fermentação de xilose (Cadete et al., 2016; Cadete and Rosa, 2018). Estudos sugerem que a eficiência de fermentação de xilose por esta levedura está relacionada ao balanço dos cofatores NADH e NADPH existente entre as duas primeiras enzimas da via de utilização de xilose, xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), respectivamente. A enzima XR em *S. passalidarum* é codificada por dois genes (XYL

1.1 e XYL 1.2) (Wohlbach et al., 2011). Cadete (2016) demonstrou que a enzima codificada pelo gene XYL1.1 é estritamente dependente de NADPH, enquanto o gene adicional XYL1.2 codifica uma enzima que utiliza NADPH e NADH, com preferência por NADH. Assim, a presença da enzima XR codificada por XYL 1.2 contribui para que a fermentação de xilose seja mais eficiente em *S. passalidarum*, pois estabelece um equilíbrio redox com a próxima enzima da via, visto que a enzima XDH utiliza NAD<sup>+</sup> como cofator (Cadete et al., 2016; Cadete and Rosa, 2018).

Apesar dos estudos demonstrarem o alto potencial fermentativo de xilose da levedura *S. passalidarum*, pouco se sabe sobre a regulação de seu metabolismo. Os mecanismos de repressão por glicose são bem compreendidos na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Conrad et al., 2014). Porém ainda não é conhecido como o metabolismo de xilose é regulado por glicose visto que *S. cerevisiae* não utiliza naturalmente essa pentose (Long et al., 2012). Compreender os efeitos da glicose no metabolismo da xilose é fundamental para a aplicação de leveduras fermentadoras de xilose nativas para a produção de etanol 2G.

A presença de glicose no meio pode atrasar ou inibir a taxa de utilização de xilose em *S. passalidarum*, sugerindo que o metabolismo de xilose nesta levedura está sujeito ao mecanismo de repressão por glicose (Du et al., 2019; Hou, 2012; Long et al., 2012). Em condição limitante de oxigênio, esta levedura é capaz de cofermentar xilose e celobiose (Long et al., 2012). O consumo de xilose por *S. passalidarum* em cofermentação pode ocorrer simultaneamente ou não ao consumo de glicose, dependendo do nível de oxigênio no meio de cultura (Hou, 2012). Segundo Hou (2012), a glicose pode reprimir a captação de xilose por difusão facilitada para o interior celular, o que é especialmente importante em condições anaeróbicas, pois provavelmente é a única maneira de transporte de xilose. Além disso, a expressão ou atividade das enzimas XR e XDH podem ser reprimidas na presença de glicose (Harner et al., 2015; Hou, 2012). Dessa forma, a captação e/ou utilização de xilose podem ser inibidos por glicose na cofermentação desses açúcares (Hou, 2012).

Embora estudos tenham demonstrado que a glicose interfere no metabolismo da xilose em *S. passalidarum*, os mecanismos regulatórios não são compreendidos. Até onde sabemos, os efeitos da glicose na expressão de genes do metabolismo da xilose durante a cofermentação ainda não foram avaliados. Assim, o trabalho objetivou avaliar a influência da glicose no consumo de xilose, produção de etanol, expressão

gênica e atividade de enzimas-chave do metabolismo da xilose em *S. passalidarum* sob condições aeróbicas e limitantes de oxigênio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens e manutenção

As leveduras *Spathaspora passalidarum* NRRLY 27907 e *Kluyveromyces marxianus* CCT7735 foram utilizadas neste trabalho. Todas as leveduras foram estocadas e mantidas em meio YPD (10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> peptona, 20 g L<sup>-1</sup> glicose) com 20% de glicerol (v/v) a -80 °C. Para utilização rotineira, as leveduras foram plaqueadas em meio YPD-ágar (2% w/v) e uma colônia isolada foi utilizada para preparação do pré-inoculo.

### 2.2 Fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes condições de oxigênio

Os experimentos de fermentação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura. O meio de cultivo utilizado é composto por extrato de levedura (5 g.L<sup>-1</sup>), peptona (5 g.L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>Cl (2 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O (0,3 g.L<sup>-1</sup>). As fontes de carbono foram avaliadas nas concentrações de 80 g.L<sup>-1</sup> xilose ou 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose, para as fermentações com açúcares individuais, e 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose, para as cofermentações. O pré-inóculo foi preparado em 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose ou 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose para as fermentações com açúcares individuais e 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose para as cofermentações, seguido de incubação a 32 °C e 150 rpm *overnight*. Após o crescimento as células foram centrifugadas, lavadas com solução salina 0.85% (m/v) e transferidas para o mesmo meio de cultivo ajustando a DO<sub>(600nm)</sub> inicial para 2.0.

Em aerobiose, os frascos foram tampados com tampão de algodão e incubados a temperatura de 32 °C sob agitação de 200 rpm. Em limitação de oxigênio, os frascos foram vedados com tampão de borracha contendo uma agulha que permitia a saída do dióxido de carbono gerado na fermentação. Nesta condição, nitrogênio gasoso foi borbulhado por 15 min antes da inoculação para expulsar o oxigênio dissolvido no meio. Após a inoculação, os frascos foram incubados a temperatura de 32 °C sob agitação de 60 rpm.

Amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo para a avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro à 600 nm e quantificação de substratos e produtos por cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography*; HPLC). Adicionalmente, nos tempos de 6 h e 12h foram coletadas amostras para análise de expressão gênica dos genes do metabolismo de xilose e avaliação da atividade enzimática de xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK). Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

### 2.3 Métodos analíticos

Uma curva de calibração correlacionando densidade óptica a 600nm com massa seca em  $\text{g.L}^{-1}$  foi construída para cada fonte de carbono utilizada a fim de avaliar o crescimento da levedura. O consumo de substratos (xilose, glicose e 2-deoxiglicose [2DG]) e a produção de metabólitos (etanol, xilitol, glicerol e ácido acético) foram quantificados por HPLC usando a coluna Aminex HPX-87H (BIORAD) a 45 °C, acoplada a um detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu). A fase móvel foi ácido sulfúrico 5 mM aplicado a uma taxa de fluxo de  $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ . As curvas padrão foram preparadas para glicose, xilose, xilitol (3–100 mM), glicerol, ácido acético (5–100 mM), etanol (4–200 mM) e 2DG (0,6–12 mM). Todas as amostras foram diluídas e filtradas em uma membrana  $0,22 \mu\text{m}$ .

### 2.4 Parâmetros fermentativos

O rendimento de etanol  $Y_{P/S}$  ( $\text{g.g}^{-1}$ ) foi calculado pela razão da massa de etanol produzido e massa de substrato consumido no tempo de maior produção de etanol. A produtividade de etanol  $Q_p$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi calculada pela razão da massa de etanol produzido pelo tempo com maior produção de etanol em  $\text{g.L}^{-1}$ . Para estimar a taxa específica de consumo de substrato ( $q_s$  ( $\text{g.g}^{-1}\text{CDW}.\text{h}^{-1}$ )) foi construída a regressão linear entre a massa seca *versus* concentração de substrato durante a fase exponencial. O coeficiente angular (rendimento de consumo) dessa regressão foi multiplicado pela velocidade de crescimento ( $\mu$ ). As análises estatísticas foram feitas no GraphPad Prism 5 utilizando análise de variância (ANOVA não paramétrica) seguida de teste Tukey para comparação de médias a 5% de significância.

## 2.5 Análise de expressão dos genes do metabolismo de xilose

A análise transcricional dos genes *XYL1.1*, *XYL1.2*, *XYL2.1* e *XKS1* foram feitas via RT-qPCR. As amostras foram coletadas nos tempos de 6h e 12h durante as fermentações em aerobiose e limitação de oxigênio, e foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, antes da extração de RNA. A sequência dos genes de *S. passalidarum* foram obtidas do banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os oligonucleotídeos específicos para os genes (*XYL 2.1* e *XKS 1*) foram construídos com o software Primer3. Os outros oligonucleotídeos foram validados por Cadete et. al. (2016) (Tabela 1).

O RNA total das culturas foi extraído pelo método *hot fenol* (Collart *et.al.*, 2001) e tratado com DNase I (Sigma). A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) de acordo com os ciclos: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min. As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com orientações do fabricante e nas seguintes condições de amplificação: 95 °C por 10 min, e 40 ciclos de 94 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Uma curva de *melting* foi obtida para cada reação para avaliar sua especificidade de amplificação.

Os níveis de expressão dos genes foram analisados pelo método de quantificação relativa por curva-padrão. Foi construída uma curva padrão de cada gene correlacionando o Ct médio com o log10 de diferentes concentrações do cDNA da amostra controle (3,9-250 ng/μL). O gene da actina (*ACT1*) foi utilizado como controle endógeno. As análises estatísticas foram feitas no GraphPad Prism 5 utilizando ANOVA e o pós teste comparação múltipla de Bonferroni.

Tabela 1: Oligonucleotídeos específicos para RT-qPCR

Gene	Proteína	Sequência 5'-3'	Referência
<i>XYL1.1</i>	Xilose redutase	CTCAGGTCACCTTGATGCCTTTAG TCTTTAAACCGTCACCGACTTCC	Cadete et al.,2016
<i>XYL1.2</i>		GCCACCATTTCCTCAGCAAATTTAC CTCTTAACAAGACCGTCTTCAATAGC	Cadete et al.,2016



<i>XYL2.1</i>	Xilitol desidrogenase	TGCTGCCAGAGTCATTGTCATTG AACATTTGGTTCAACACCGTCAA	Este trabalho
<i>XKS1</i>	Xiluloquinase	GGTCCAGTCCACGGTAACTT CGCCCTTTTGTTCACACTCA	Este trabalho
<i>ACT1</i>	Actina	AGATACCCAATTGAACACGGTATC GATTTAGGATTCATTGGAGCTTCA	Cadete et al.,2016

## 2.6 Atividades enzimáticas

As células coletadas nos tempos de 6h e 12h foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. A extração de proteínas totais foi feita com esferas de vidro sob agitação em vortex por 30 segundos seguido de repouso em gelo por 30 segundos. Este ciclo foi repetido por 5 vezes. O homogeneizado final foi centrifugado por 10 min a 10000 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios enzimáticos. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A mistura da reação para dosagem da atividade de XR continha 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0, 0,1 mM de NADH ou NADPH, 50 mM de xilose, extrato bruto e água destilada. A mistura da reação XDH continha 100 mM de tampão glicina pH 9,0, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NAD, 150 mM de xilitol, extrato bruto e água destilada. A mistura da reação XK continha 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de ATP, 0,1 mM NADH, 0,2 mM fosfoenolpiruvato, 5 U/mL de piruvato quinase, 5 U/mL de lactato desidrogenase, 2 mM de xilulose, extrato bruto e água destilada.

Cada reação foi iniciada pela adição do substrato específico para cada enzima testada. A oxidação de NADH/NADPH e a redução de NAD<sup>+</sup> foram monitoradas pela mudança da absorbância a 340 nm ( $\Delta A_{340}$ ) a cada 15 segundos, durante um tempo total de 5 minutos. O valor de 6.22 mL ( $\mu\text{mol cm}^{-1}$ ) foi usado como coeficiente de absorção molar de NAD(P)H por minuto. A atividade específica aparente das enzimas XR, XDH e XK foi expressa em unidades por mg de proteína total ( $\text{U mg}^{-1}$ ), sendo a unidade de enzima definida como 1  $\mu\text{mol}$  de cofator oxidado ou reduzido por minuto (Equação 1). As análises estatísticas foram feitas no GraphPad Prism 5 utilizando ANOVA e o pós teste comparação múltipla de Bonferroni.

$$\frac{\frac{\Delta A(340)}{\text{min}} \cdot \text{vol reaction (mL)}}{6.22 \left( \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol.cm}} \right) \cdot \text{vol extract (mL)} \cdot \text{protein concentration (mg/mL)} \cdot \text{light path (cm)}} \quad (1)$$

## 2.7 Efeito da concentração de glicose na utilização de xilose

A levedura *S. passalidarum* foi previamente crescida em meio YPD sob agitação de 150 rpm a 30°C *overnight*. A partir do pré- inóculo, as células foram centrifugadas, lavadas com solução salina 0,85% (m/v) e a densidade óptica D.O(600nm) inicial foi ajustada para 1,0. As células foram transferidas para o meio YP 20 g.L<sup>-1</sup> xilose contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose e mantidas sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 24h. Amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo para a avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro à 600nm e quantificação de substratos e produtos por HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.8 Efeito de 2-deoxiglucose (2DG) na utilização de xilose.

As leveduras *S. passalidarum* e *K. marxianus* foram previamente crescidas como descrito no item 2.7. A partir da densidade óptica D.O(600nm) ajustada para 1,0, foram realizadas diluições decimais (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>). As células foram semeadas (10 µL) em placas de Petri com YP sólido contendo 2% (m/v) xilose ou glicose e 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% (m/v) de 2DG. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Para a avaliação em meio líquido, as células foram ajustadas para uma DO<sub>600</sub> inicial de 1,0 e transferidas para meio YP contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose ou xilose e 0,5% (m/v) 2DG. Os frascos foram incubados a 30 °C e 150 rpm por 24 h na condição aeróbia. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA e teste de Tukey ao nível de significância de 5% (GraphPad Prism 5).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes condições de oxigenação.

Em aerobiose, a fermentação de xilose resultou em maior rendimento e produtividade de etanol quando comparado à fermentação de glicose, na qual houve maior produção de biomassa celular. Os rendimentos de etanol obtidos na fermentação e cofermentação com xilose foram estatisticamente iguais na aerobiose, enquanto a produtividade em etanol foi maior na cofermentação (Tabela 2).

Na condição limitante de oxigênio, os rendimentos e produtividades de etanol nas fermentações de xilose e de glicose não foram estatisticamente diferentes. O cultivo em glicose também gerou maior rendimento em biomassa, como observado em aerobiose. Durante a cofermentação houve aumento do rendimento e produtividade de etanol comparada à fermentação somente de xilose. O melhor rendimento de etanol ( $0.46 \text{ g.g}^{-1}$ ) foi encontrado nessa condição de limitação de oxigênio, no entanto, a produtividade de etanol foi menor quando comparado à cofermentação em aerobiose. De maneira geral, as produtividades de etanol foram menores em limitação de oxigênio, independentemente da fonte de carbono, devido à menor taxa do consumo de açúcar nessa condição (Tabela 2).

Tabela 1: Parâmetros fermentativos de *Spathaspora passalidarum* em condições aeróbicas e limitantes de oxigênio em meio de fermentação contendo 80 g.L<sup>-1</sup> de xilose, 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose.

		Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>(P/S)</sub> <sup>1</sup> (g.g <sup>-1</sup> )		Qp <sup>2</sup> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		Massa seca (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo <sup>3</sup> (horas)	qs <sup>4</sup> (g <sub>sugar</sub> g <sup>-1</sup> CDW.h <sup>-1</sup> )
Aeróbico	Xilose	30.68±1.34	0.39±0.009	a	1.28±0.06	b	14.60±1.79	24	0.66
	Glicose	22.85±1.69	0.27±0.02	b	0.63±0.05	c	35.41±2.81	36	0.50
	Xilose e Glicose	36.10±1.41	0.39±0.04	a	1.50±0.06	a	19.32±1.43	24	0.76 <sub>(glicose)</sub>
Limitação de oxigênio	Xilose	20.39±0.22	0.33±0.01	b	0.42±0.004	b	8.00±0.42	48	0.54
	Glicose	21.43±0.33	0.34±0.01	b	0.45±0.01	b	15.30±0.70	48	0.33
	Xilose e Glicose	27.09±2.82	0.46±0.04	a	0.56±0.06	a	8.78±0.56	48	0.38 <sub>(glicose)</sub> 0.10 <sub>(xilose)</sub>

As análises estatísticas compararam os efeitos das diferentes fontes de carbono em cada condição por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey a 5% de significância. As letras a, b e c são usadas para representar médias diferentes.

1 Rendimento em Etanol (Y(P/S));

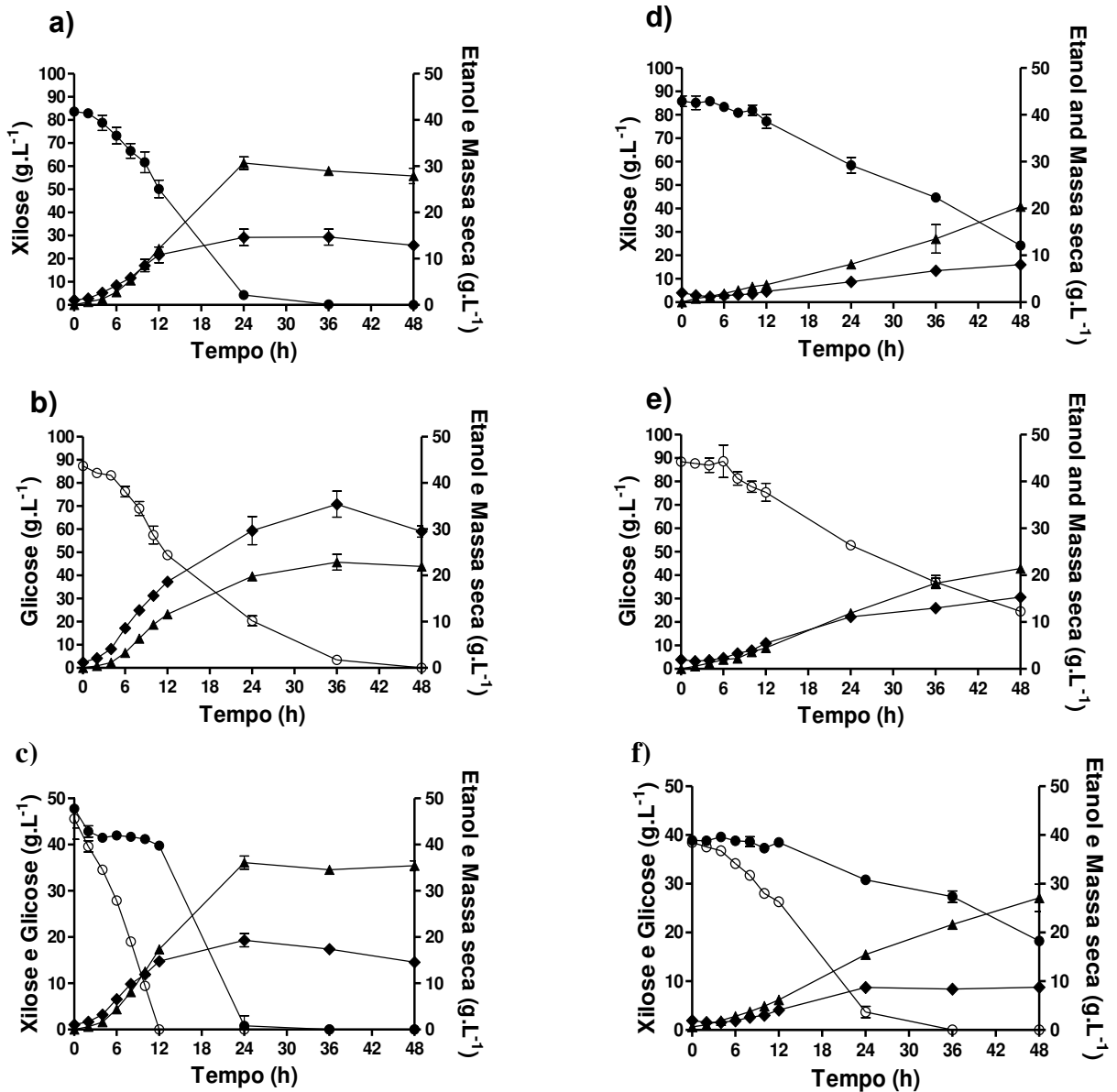
2 Produtividade de etanol (Q(P));

3 O tempo necessário para que os valores máximos de concentração de etanol e massa seca sejam atingidos em cada condição. Y(P/S) e Qp também foram calculados neste momento;

4 Taxa de consumo específico de açúcar (qs). Calculado durante a fase exponencial.

Em todos os ensaios fermentativos os subprodutos xilitol, glicerol e ácido acético foram produzidos em concentrações não-relevantes (dados não mostrados).

A taxa de consumo de xilose foi sempre maior quando este açúcar foi utilizado como única fonte de carbono. Nos cultivos de cofermentação, o consumo de açúcar diferiu de acordo com o nível de oxigênio. Na condição aeróbia, *S. passalidarum* consumiu glicose completamente, e somente após a depleção de glicose iniciou-se o consumo de xilose. A taxa de consumo de glicose durante a fase exponencial nessa foi  $0.76 \text{ g.g}^{-1}_{\text{CDW.h}^{-1}}$ , e a xilose não foi consumida nesse período. Na condição de limitação de oxigênio, o consumo de glicose também ocorreu preferencialmente ao consumo de xilose. A glicose foi consumida desde o início do cultivo, com uma taxa de  $0.38 \text{ g.g}^{-1}_{\text{CDW.h}^{-1}}$ , enquanto a xilose começa a ser consumida a partir de 12 h a uma taxa de  $0.10 \text{ g.g}^{-1}_{\text{CDW.h}^{-1}}$ , antes do esgotamento da glicose (Figura 1, Tabela 2).



**Figura 1:** Cinética de fermentação em condições aeróbicas (a, b e c) e limitação de oxigênio (d, e e f) com meio de fermentação contendo 80 g.L<sup>-1</sup> xilose, 80 g.L<sup>-1</sup> glicose e 40 g.L<sup>-1</sup> xilose e 40 g.L<sup>-1</sup> glicose, respectivamente. Xilose (círculo fechado), Glicose (círculo aberto), Etanol (triângulo fechado), Massa Seca (losango fechado).

### 3.2 Expressão dos genes *XYL1.1*, *XYL1.2*, *XYL2.1* e *XKS1* durante fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes níveis de oxigênio

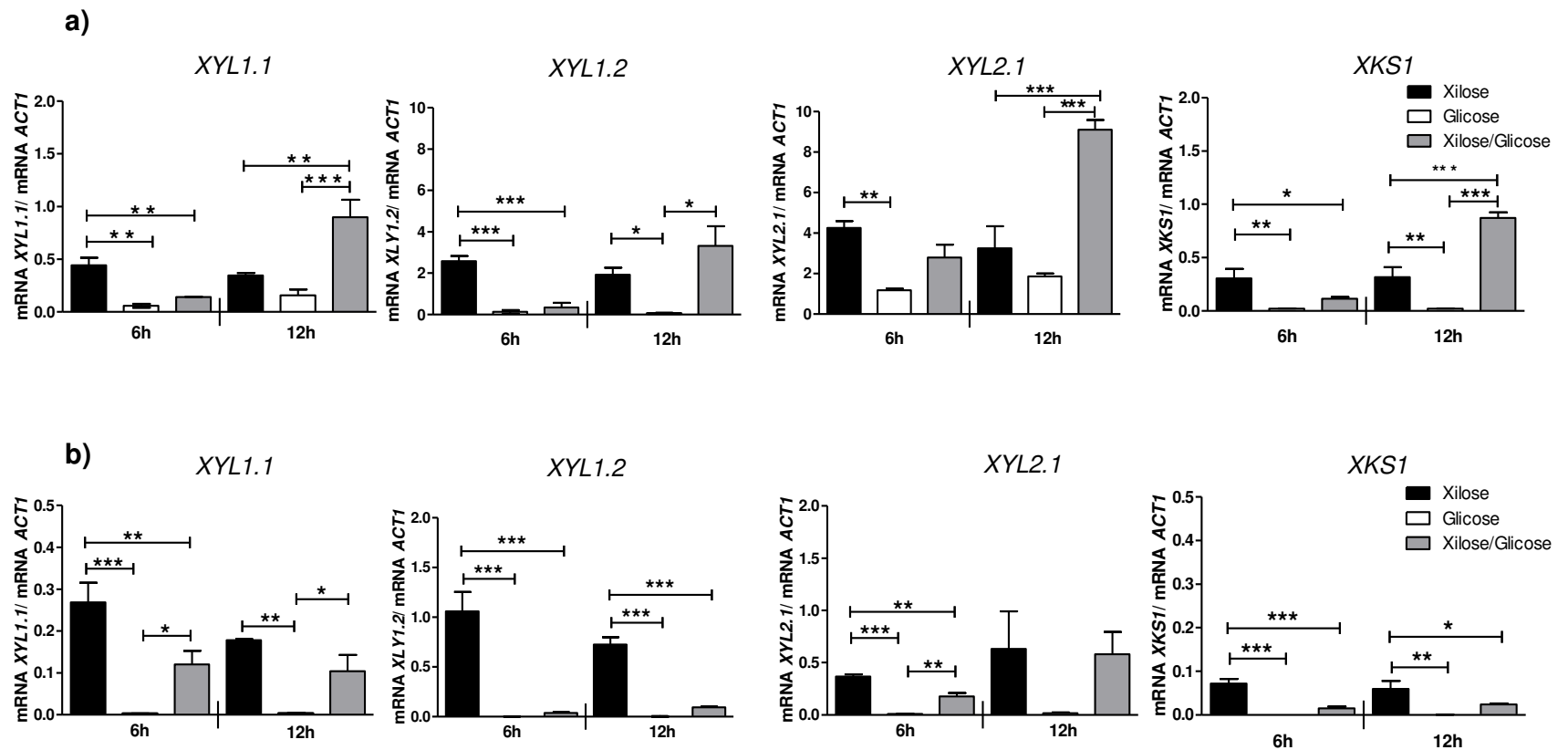
A expressão dos genes que codificam as três principais enzimas do metabolismo de xilose em *S. passalidarum* foram avaliadas nos tempos de 6 e 12 horas nas diferentes condições de fermentação avaliadas. As concentrações de

glicose e xilose nesses tempos de fermentação são mostradas na figura 1, e os perfis de expressão desses genes são mostrados na figura 2.

Após 6h de cultivo, todos os genes avaliados apresentaram maior expressão na presença de xilose comparados ao cultivo em glicose em ambas condições de oxigênio (Figuras 2).

Na cofermentação em aerobiose, após 6 horas de cultivo, os genes *XYL1.1*, *XYL1.2* e *XKS1* foram menos expressos comparados ao cultivo em xilose. Consistentemente, as dosagens em HPLC mostraram que a levedura consumiu apenas glicose nas primeiras 6 h de cultivo (Figuras 1c e 2a). Por outro lado, após 12 h, a glicose foi esgotada e todos os genes foram induzidos na condição de cofermentação. Neste momento, a expressão do gene *XYL1.2* não apresentou diferença estatística na comparação entre as condições de cofermentação e xilose, enquanto os demais genes apresentaram maior expressão na cofermentação em comparação com a fermentação somente de xilose (Figuras 1c e 2a).

Na cofermentação em limitação de oxigênio, em 6 h de cultivo, a expressão de todos os genes avaliados foi menor do que na condição com xilose como única fonte de carbono (Figura 2b). Novamente, apenas a glicose foi consumida pela levedura até este momento (Figura 1f). No entanto, no tempo de 12h, a glicose ainda estava presente no meio, e a expressão dos genes *XYL1.2* e *XKS1* permaneceu menor na cofermentação do que no cultivo com xilose. O gene *XYL2.1* não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. O gene *XYL1.1* foi induzido e não apresentou diferença estatística em relação à sua expressão no cultivo de xilose (Figuras 1f e 2b).



**Figura 2:** Análise de expressão dos genes *XYL1.1*, *XYL1.2*, *XYL2.1* e *XKS1* em *Spathaspora passalidarum* em meios contendo 80 g.L<sup>-1</sup> xilose (barras pretas), 80 g.L<sup>-1</sup> glicose (barras brancas), ou 40 g.L<sup>-1</sup> xilose e 40 g.L<sup>-1</sup> glicose (barras cinzas) em condições aeróbicas (a) e com limitação de oxigênio (b). O asterisco indica os valores das médias que são estatisticamente diferentes de acordo com a análise de variância e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

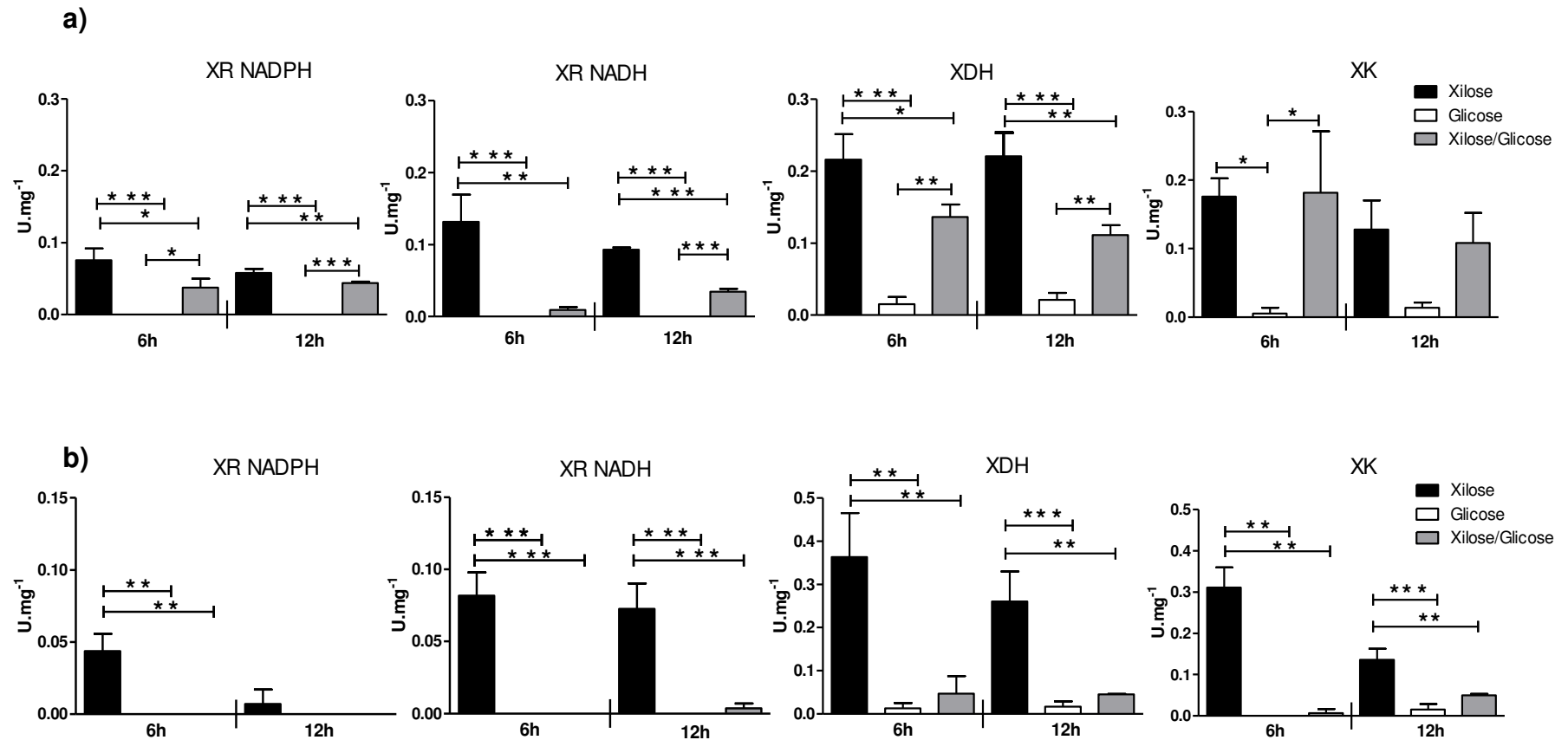


### 3.3. Atividades enzimáticas de XR, XDH e XK durante fermentações de xilose e/ou glicose em diferentes níveis de oxigênio

Todas as enzimas avaliadas apresentaram atividades mais altas no meio contendo apenas xilose, independente da condição de oxigênio do meio. No cultivo somente com glicose, as três enzimas apresentaram baixa ou nenhuma atividade em ambos os tempos e condições avaliadas (Figura 3).

No cultivo com xilose em aerobiose, a enzima XR apresentou maior atividade específica com o cofator NADH, resultando nas razões NADH/NADPH de 1,744 e 1,603 em 6 e 12h, respectivamente. Na presença de glicose durante a cofermentação em aerobiose, as atividades específicas das enzimas foram menores, exceto para XK (figura 3a). Nessa condição a razão NADH/NADPH da enzima XR foi menor que 1 (0,25 e 0,788 em 6 e 12 h, respectivamente), indicando que a enzima XR possui preferência pelo cofator NADPH. Enquanto a glicose estava presente no meio (6h), a atividade específica aparente de XR com o cofator NADH foi  $0.009 \pm 0,004 \text{ U mg}^{-1}$ . Quando a glicose foi esgotada (12h), a atividade de XR com NADH aumentou para  $0,035 \pm 0,004 \text{ U mg}^{-1}$ , enquanto a sua atividade com NADPH permaneceu aproximadamente estável (Figura 3a).

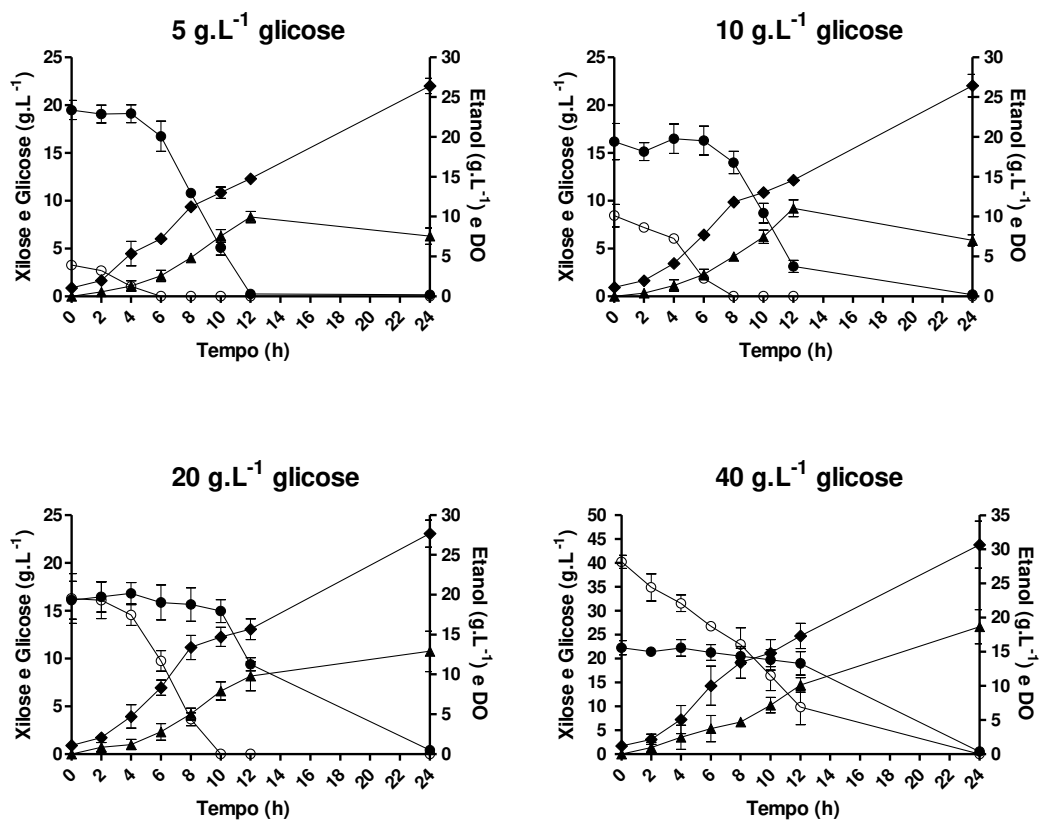
Em condição limitante de oxigênio, no cultivo com xilose a razão NADH/NADPH da enzima XR em 6h de cultivo com xilose foi de 1,87, enquanto em 12h XR apresentou atividade específica apenas com NADH. Na cofermentação, as atividades específicas de XDH e XK são menores em comparação ao cultivo somente com xilose, enquanto a enzima XR não apresentou nenhuma atividade nos tempos avaliados (Figura 3b).



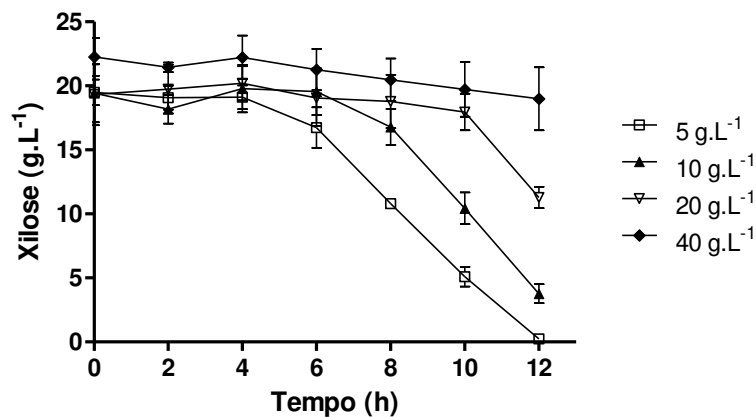
**Figura 3:** Atividades específicas de xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK) em extratos de brutos de *Spathaspora passalidarum* crescendo em meio contendo 80 g.L<sup>-1</sup> xilose (barras pretas), 80 g.L<sup>-1</sup> glicose (barras brancas), ou 40 g.L<sup>-1</sup> xilose e 40 g.L<sup>-1</sup> glicose (barras cinzas) sob condições aeróbicas (a) e de limitação de oxigênio (b). A análise estatística comparou os efeitos das diferentes fontes de carbono em cada tempo usando a análise de variância e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

### 3.4 Efeito de diferentes concentrações de glicose e 2DG no metabolismo de xilose.

Para testar se o nível de repressão da utilização de xilose está correlacionado à concentração de glicose no meio extracelular, o perfil de consumo de xilose de *S. passalidarum* foi avaliado em meio contendo concentrações crescentes de glicose. Observamos anteriormente que *S. passalidarum* utiliza xilose somente após o esgotamento da glicose (Figura 1c). Esse perfil de inibição do consumo de xilose por glicose se manteve, mesmo nas concentrações mais baixas de glicose avaliadas (Figura 4). O aumento da concentração de glicose no meio diminuiu o consumo de xilose por *S. passalidarum* (Figura 5).

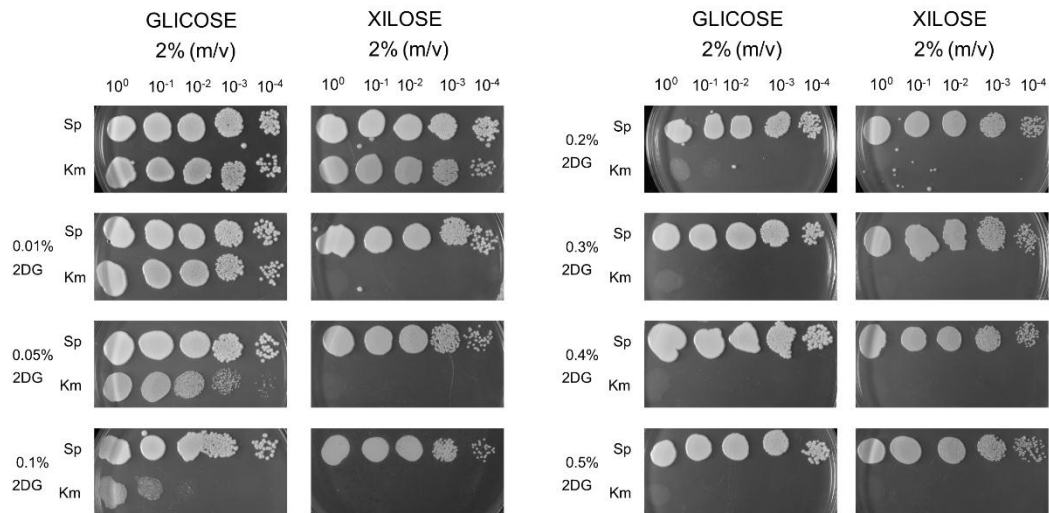


**Figura 4:** Cinética de fermentação de *Spathaspora passalidarum* em meio YP contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 5, 10, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Xilose (círculo fechado), Glicose (círculo aberto), Etanol (triângulo fechado), DO (600 nm) (losango fechado).



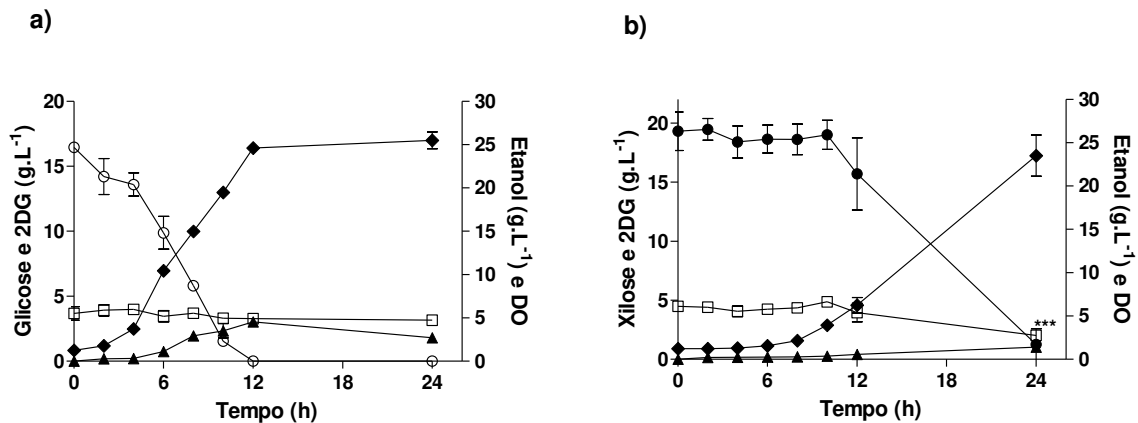
**Figura 5:** O efeito de diferentes concentrações de glicose (5, 10, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>) no consumo de xilose por *Spathaspora passalidarum* em meio YP contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose na condição aeróbica.

A sensibilidade de *S. passalidarum* ao análogo da glicose 2DG foi avaliada na presença de diferentes concentrações deste composto. A 2DG é muito utilizada em estudos de repressão catabólica em leveduras (Lane *et al.*, 2011; Rodrussame *et al.*, 2011; Suprayogi, *et al.*, 2015; Sreenath e Jeffries, 1999). *K. marxianus* foi utilizada como controle positivo, pois estudos demonstram que linhagens desta levedura estão sujeitas a repressão de glicose no metabolismo de xilose (Rodrussamee *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2019). Os ensaios também foram feitos com 2% (m/v) de glicose para testar o efeito letal de 2DG na célula. No cultivo com glicose, *K. marxianus* apresentou menor tolerância ao 2DG, pois concentrações superiores a 0.1% (w/v) foram letais para essa levedura. Em contrapartida, a maior concentração testada (0.5% m/v) não inibiu o crescimento de *S. passalidarum*. No meio com xilose, a linhagem *S. passalidarum* NRRLY 27907 cresceu em todas as concentrações de 2DG avaliadas, enquanto o crescimento de *K. marxianus* foi inibido desde a menor concentração (0.01% m/v) desse composto (Figura 6).



**Figura 6:** O efeito da 2-desoxiglicose (2DG) no uso de xilose em *Spathaspora passalidarum* e *Kluyveromyces marxianus*. As cepas de levedura foram cultivadas em placas de ágar com YP contendo apenas 2% (p/v) de açúcares (glicose ou xilose) ou em combinação com 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% ou 0,5% (m/v) 2DG. A D.O(600nm) em diluições da esquerda para a direita são  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Sp = *Spathaspora passalidarum*, Km = *Kluyveromyces marxianus*

O crescimento de *S. passalidarum* também foi avaliado em meio líquido contendo glicose ou xilose na presença de 0,5% (m/v) de 2DG, devido sua maior tolerância a este composto em meio sólido (Figura 7 a e b). Na presença de glicose e 2DG, o crescimento celular e o consumo de glicose não foram inibidos por esse composto e 2DG não foi consumido pela levedura (Figura 7a). No entanto, no meio contendo xilose e 2DG, houve inibição do crescimento celular durante 8 horas de cultivo e o consumo efetivo dos açúcares ocorreu a partir de 10 horas. Além disso, 2DG foi internalizada juntamente com xilose, e a redução em sua concentração extracelular (~50%) foi estatisticamente significativa (Figura 7b).



**Figura 7:** Perfil de crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol de *S. passalidarum* em meio líquido YP contendo 20 g.L<sup>-1</sup> glicose e 0,5% (m/v) 2DG (a) ou 20 g.L<sup>-1</sup> xilose e 0,5% (m/v) 2DG (b) em condições aeróbicas. O asterisco indica o valor médio de 2DG que é estatisticamente diferente de acordo com a análise de variância e teste de Tukey (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Xilose (círculo fechado), Glicose (círculo aberto), 2-deoxiglicose (quadrado aberto), Etanol (triângulo fechado), D.O(600nm) (diamante fechado).

#### 4. DISCUSSÃO

A levedura *S. passalidarum* tem sido considerada a melhor candidata para domesticação e fonte de genes para engenharia de *S. cerevisiae* para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (Cadete e Rosa, 2018). O presente trabalho analisou e trouxe novas perspectivas de como a glicose influencia o metabolismo da xilose, os açúcares mais abundantes na biomassa vegetal.

Nossos resultados indicam que *S. passalidarum* NRRLY 27907 consumiu eficientemente glicose e xilose. Em aerobiose, o rendimento em etanol obtido a partir da fermentação da xilose foi superior ao rendimento em etanol obtido na fermentação da glicose, pois a glicose foi preferencialmente utilizada para o crescimento. Na limitação de oxigênio, o cultivo com glicose também gerou mais biomassa, porém não houve diferenças no rendimento de etanol comparando as fermentações com xilose ou glicose. Esse resultado pode estar relacionado a uma reoxidação ineficiente do NADH pela cadeia transportadora de elétrons na baixa concentração de oxigênio. Durante as cofermentações os rendimentos e produtividades de etanol foram maiores

ou similares à fermentação somente de xilose, indicando que a glicose, nas condições testadas, não interfere negativamente na formação do produto de interesse.

Embora os rendimentos e a produtividades de etanol não foram afetados durante a cofermentação, em comparação à fermentação de xilose, a levedura consumiu preferencialmente a glicose quando ambos os açúcares estavam presentes. A preferência pela glicose atrasou o consumo de xilose independentemente do nível de oxigênio no meio. Caso o consumo de xilose e glicose fossem simultâneos, a produtividade do processo poderia ser ainda melhor (Kim et al., 2012). O consumo preferencial de glicose por *S. passalidarum* NRRLY 27907 também foi observado na cofermentação de glicose e xilose em condição anaeróbica (Hou, 2012). Em condição limitante de oxigênio, Long e colaboradores (2012) mostraram que esta linhagem cofermenta xilose e celobiose na presença de glicose. No entanto, a co-utilização desses açúcares iniciou-se somente após 15 h de cultivo. Em condições aeróbicas, ao contrário de nossa investigação, esses estudos mostraram um consumo simultâneo de glicose e xilose durante a cofermentação de ambos os açúcares (Hou, 2012; Long et al., 2012). Essas divergências podem estar relacionadas a diferenças nas condições experimentais quanto à disponibilidade de oxigênio no meio de cultura. Além disso, a resolução de tempo no estudo de Hou (2012) é muito ampla para afirmar que *S. passalidarum* pode co-consumir glicose e xilose em condições aeróbicas. Enquanto o presente trabalho avaliou o consumo de açúcares durante a fase exponencial de crescimento da levedura, o estudo de Hou (2012) avaliou o consumo em um intervalo de tempo de 20 h.

A expressão dos genes que codificam as enzimas da via de assimilação de xilose foi analisada a fim de verificar se o bloqueio do uso da xilose por glicose, observado anteriormente (Figura 1), é ocasionado em parte a repressão transcricional desses genes. Na cofermentação, a expressão desses genes foi significativamente menor comparado ao cultivo somente com xilose. Após o esgotamento da glicose (12h), em aerobiose, todos os genes mostraram aumento no nível de expressão. Em limitação de oxigênio, no tempo de 12 h, a glicose não foi totalmente consumida, e os genes permaneceram menos expressos, exceto para *XYL1.1*. A partir deste momento iniciou-se o consumo de xilose. Assim, a indução do gene *XYL1.1* poderia ser o início da reprogramação transcricional da levedura para permitir o metabolismo da xilose. A baixa expressão desses genes quando glicose está presente no meio pode ser devido a interferência da glicose no transporte de xilose, o que acarretaria a não indução dos

genes. Uma outra possibilidade é o mecanismo de repressão canônica por glicose também ser presente em *S. passalidarum*. A repressão dos genes que codificam para enzimas do metabolismo de xilose nas duas condições de oxigenação avaliadas está de acordo com os nossos dados de inibição do consumo de xilose na presença de glicose.

A glicose também influenciou a atividade enzimática de XR, XDH e XK durante a cofermentação. A presença de glicose diminuiu a atividade específica dessas enzimas, o que pode estar relacionado à menor expressão dos genes. Na fermentação somente com a xilose, a enzima XR apresentou preferência pelo cofator NADH, estabelecendo um equilíbrio redox na via, visto que a segunda enzima (XDH) utiliza NAD<sup>+</sup> como cofator. De fato, o gene *XYL1.2*, que codifica a enzima XR com a preferência NADH, apresentou maior expressão do que o gene *XYL1.1* (razões *XYL1.2/XYL1.1* em torno de 5 e 4 para as condições aeróbicas e limitantes de oxigênio, respectivamente), que codifica o XR que é estritamente dependente de NADPH, em meio contendo somente xilose. Cadete e colaboradores (2016) também relataram que o gene *XYL1.2* de *S. passalidarum* NRRLY 27907 foi 6-9 vezes mais expresso do que o gene *XYL1.1* em sob condições moderadas e severas de limitação de oxigênio. Em relação aos ensaios de cofermentação, nossos dados não mostraram correlação entre os resultados de expressão gênica e atividade enzimática. Embora o gene *XYL1.2* tenha apresentado maior expressão do que o gene *XYL1.1* na condição aeróbia, a atividade XR foi predominante com o cofator NADPH. Assim, sugerimos que a regulação dessa atividade enzimática também pode depender da disponibilidade desses cofatores na célula. Na cofermentação em aerobiose, XR apresentou maior atividade com o cofator NADPH nas primeiras horas de fermentação (6h). Após a depleção de glicose (12h), a atividade específica dessa enzima com NADH aumentou. Assim, sugerimos que o cofator NADH foi direcionado para a produção de etanol via glicolítica, diminuindo a disponibilidade deste cofator para o consumo de xilose.

O perfil de consumo de xilose por *S. passalidarum* em meio com diferentes concentrações de glicose foi avaliado para investigar se a inibição do consumo de xilose observada na cofermentação permaneceria mesmo em baixas concentrações de glicose. Observamos que *S. passalidarum* NRRLY 27907 utiliza a xilose somente após o esgotamento de glicose, independente da concentração testada. Esses dados estão de acordo com nossos resultados observados nas cofermentações em



aerobiose e limitação de oxigênio, demonstrando que a glicose exerce inibição no metabolismo de xilose.

Os resultados da expressão gênica demonstraram que a glicose controla de alguma maneira a expressão dos genes do metabolismo de xilose. Para avaliar se o mecanismo de repressão por glicose em *S. passalidarum* apresenta características da repressão clássica por glicose descrita para outras leveduras, nós avaliamos o seu crescimento na presença de 2DG. Após entrar na célula, o 2DG é fosforilado pela hexoquinase para formar 2-deoxiglicose fosfato (2DG-P), mas não é mais metabolizado. Portanto, o fluxo metabólico pela via glicolítica fica comprometido. Assim, leveduras submetidas à repressão de glicose não podem crescer em meio de cultura contendo 2DG e outra fonte de carbono. O 2DG ativa as vias de sinalização de repressão da glicose, que por sua vez reprime a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na assimilação de outras fontes de carbono (Hua et al., 2019; Suprayogi et al., 2015). O composto 2DG não foi letal para *S. passalidarum* e, curiosamente, seu crescimento em xilose não foi inibido em nenhuma concentração de 2DG avaliada, sugerindo que *S. passalidarum* não sofre repressão clássica por glicose. Por outro lado, a linhagem *K. marxianus* CCT7735 apresentou repressão por glicose no metabolismo de xilose desde a menor concentração de 2DG testada. Além disso, *K. marxianus* CCT7735 apresentou menor tolerância ao composto 2DG no meio com glicose. Assim, é possível observar que a extensão da inibição da glicose no uso da xilose difere entre as leveduras que naturalmente utilizam essa pentose. Em nosso trabalho, o efeito de repressão de glicose em *S. passalidarum* NRRLY 27907 foi observado apenas em cultivos contendo glicose e xilose. Como esse efeito não foi observado quando 2DG foi usado em vez de glicose, hipotetizamos que essa levedura tenha uma via de repressão de glicose não canônica ou mecanismos desconhecidos de tolerância a 2DG. Alguns estudos sugerem que a regulação do metabolismo da xilose pela glicose em *S. passalidarum* pode afetar o transporte de xilose para dentro da célula, o que também seria evidenciado pelos ensaios com 2DG (Hou, 2012; Rodrussamee et al., 2018).

Hou (2012) avaliou o crescimento e consumo de xilose da mesma linhagem de *S. passalidarum* NRRLY 27907 que utilizamos em meio líquido contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 0,1% de 2DG em condições aeróbicas. Nesta condição, a presença de 2DG reduziu o consumo de xilose de *S. passalidarum*. Segundo Hou (2012), 2DG poderia interferir na capacidade da célula de transportar xilose para seu interior, pois esse

composto poderia ocupar os transportadores de difusão facilitada. Além disso, a 2DG poderia estar impedindo o transporte ativo devido a falta de energia na célula, uma vez que estaria sendo internalizada e convertida a 2DG-P, que não é metabolizada e não resultaria na produção de ATP. No presente trabalho, além de avaliar o consumo de xilose e o crescimento celular de *S. passalidarum* NRRLY 27907 em meio líquido contendo 0,5% (m/v) de 2DG, nós avaliamos também o consumo de 2DG por HPLC. Assim como relatado por Hou (2012), nossos resultados também mostraram que o 2DG atrasou o consumo de xilose em aerobiose. A concentração de 2DG no meio extracelular diminuiu pela metade nessa condição, demonstrando que 2DG foi internalizado na presença de xilose. Nós avaliamos também o efeito celular de 0,5% 2DG na presença de glicose. Nessa condição, 2DG não foi internalizado pela célula. Nossos resultados sugerem que o efeito de 2DG em *S. passalidarum* é extracelular, e poderia afetar o transporte de xilose possivelmente por meio de uma sinalização por receptores de membrana. Além disto a não internalização de 2DG na presença de glicose indica uma alta especificidade por glicose dos transportadores de açúcares que são expressos nesta condição.

Um novo isolado de *S. passalidarum* (CMUWF-1) identificado por Rodrussamee et. al. (2018) também foi capaz de crescer em meio sólido contendo 2% (m/v) de xilose e 0,2% (m/v) de 2DG. Nesse estudo também foi realizado a cofermentação de glicose e xilose, e os resultados mostraram que o consumo de xilose foi atrasado, em comparação a fermentação somente de xilose, semelhante aos nossos resultados. No entanto, os autores concluíram que esta linhagem não possui repressão por glicose no metabolismo de xilose, visto que é capaz de crescer em 2DG. Segundo os autores, o consumo preferencial de glicose pode ser devido não à repressão da glicose na utilização de xilose, mas às diferenças de afinidade para glicose e xilose dos transportadores. Rodrussamee e colaboradores (2018) sugeriram que esses açúcares são transportados pelo mesmo transportador, e a maior afinidade por glicose faz com que esse açúcar seja importado primeiro. Apesar de nossos resultados mostrarem que a linhagem *S. passalidarum* NRRLY 27907 cresceu na presença de xilose e 2DG em todas as concentrações testadas, também mostramos que a glicose regulou negativamente a expressão dos genes do metabolismo da xilose (*XYL1.1*, *XYL1.2*, *XYL2.1* e *XKS1*). Dessa forma, sugerimos que o análogo de glicose 2DG não é uma molécula ideal para avaliar repressão em *S. passalidarum*, visto que o efeito da 2DG nessa levedura é também extracelular.

Em *S. cerevisiae*, a via Snf3p/Rgt2p detecta a presença de glicose no meio pelos sensores de membrana Snf3p e Rgt2p, que por sua vez interagem com proteínas reguladoras para controlar a transcrição de genes que codificam transportadores de hexose (Conrad et al., 2014). Vias de sinalização por sensores semelhantes à via de *S. cerevisiae* também podem estar presentes em *S. passalidarum*. Com base em nossos resultados, esses sensores poderiam detectar glicose e 2DG no ambiente extracelular e, de alguma forma, desencadear a inibição do transporte de xilose. De fato, o sensor Snf3p é capaz de reconhecer análogos de glicose, como 2DG (Dietvorst et al., 2010). Nossos resultados indicam que o efeito do 2DG nesta levedura também é extracelular, e sugerimos que os transportadores presentes no meio contendo xilose são menos específicos para este açúcar e podem transportar 2DG. Por outro lado, transportadores presentes em meio com glicose são mais específicos e não internalizam 2DG. Estudos futuros ainda devem ser realizados para testar essa hipótese. Até o momento, não há detalhes sobre o sistema de transporte de *S. passalidarum* relatado na literatura (Rodrussamee et al., 2018). Identificar e caracterizar o sistema de transporte de açúcar desta levedura é fundamental para investigar esta hipótese.

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a glicose inibe o consumo de xilose, independente da condição de oxigenação e da concentração de glicose que foram testadas. Os genes que codificam as enzimas chave do metabolismo de xilose também foram menos expressos quando glicose estava presente no meio. A presença de glicose reduziu a atividade específica das enzimas XR, XDH e XK, e parece influenciar no balanço redox da via metabólica da xilose. No entanto, esse perfil de repressão não foi exercido pelo análogo de glicose 2DG. Assim, sugerimos que a interferência da glicose no metabolismo da xilose de *S. passalidarum* pode estar ocorrendo no nível de repressão transcricional ou inativação do transporte, e a menor expressão de genes do metabolismo da xilose na presença de glicose pode estar relacionada a falta de sua indução por xilose ou um produto de seu metabolismo. Estudos adicionais devem ser realizados para determinar os mecanismos moleculares de sinalização da glicose nesta levedura para identificar os componentes da via e esclarecer como *S. passalidarum* controla o transporte de açúcares.

Capítulo II  
Identificação e perfil de expressão dos transportadores putativos de xilose e glicose  
em *Spathaspora passalidarum*

## 1. INTRODUÇÃO

O metabolismo celular é regulado em diferentes níveis, sendo a entrada do substrato na célula, por meio de proteínas transportadoras, o primeiro nível de controle. Os principais transportadores de açúcares das células pertencem à família de proteínas MSF (*major facilitator superfamily*). As proteínas desta família são muito semelhantes em estrutura e estão presentes em todos os domínios da vida (Leandro et al., 2009). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é amplamente utilizada na produção de etanol, possui um sistema de transporte de açúcares composto por 20 proteínas MSF (Hxt1p a Hxt17p, Gal2p, Snf3p e Rgt2p), as quais funcionam, preferencialmente, como sensores e transportadores de hexoses. Embora, algumas proteínas deste sistema possam transportar também xilose com baixa eficiência, o controle da expressão destes transportadores e a presença de glicose impede a utilização de xilose na maioria das linhagens conhecidas de *S. cerevisiae*. A xilose é o segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica, e por isso a fermentação de xilose é importante para a produção de etanol de segunda geração (2G) (Soccol et al., 2010). Entre as estratégias para utilizar a xilose da biomassa lignocelulósica, estão a obtenção de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar eficientemente essa pentose por meio da incorporação de genes heterólogos da via de assimilação e de transportadores eficientes de xilose (Moysés et al., 2016). Uma outra estratégia é a utilização de leveduras que fermentem naturalmente a xilose. Nesse contexto, estudos que buscam o conhecimento da fisiologia e genética de leveduras capazes de fermentar xilose naturalmente são fundamentais para o aumento da produtividade do etanol 2G.

A levedura *Spathaspora passalidarum* fermenta xilose a etanol com rendimento próximo ao teórico (Cadete et al., 2016). Entretanto, durante a cofermentação de glicose e xilose, a levedura consome primeiramente glicose, atrasando o consumo de xilose, independentemente da concentração de glicose extracelular (Ribeiro et al., 2021). O fenótipo desejável para a produção de etanol 2G é o consumo simultâneo de xilose e glicose, no intuito de obter altos rendimentos de etanol, sem aumentar o tempo de fermentação (Kim et al., 2012). Assim, é necessário compreender como a glicose influencia a assimilação de xilose nessa levedura. Porém, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nessa regulação ainda é escasso.

A glicose é amplamente preferida como substrato fermentável e fonte de energia por leveduras. Em *S. cerevisiae*, diversas vias de sinalização operam no sentido de metabolizar primeiramente glicose em meios que também contém outras fontes de carbono. Isso acontece porque as vias detectam a presença de glicose e regulam de forma negativa principalmente genes relacionados ao transporte e utilização de fontes alternativas de carbono (Leandro et al., 2009). No entanto, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não metabolizam xilose e espera-se que a resposta dessas vias a uma fonte de carbono não natural ocorra de maneira diferente. Existem muitos estudos que questionam se *S. cerevisiae* engenheirada detecta e sinaliza a xilose, através das vias que controlam a expressão de genes, como açúcar metabolizável (Brink et al., 2021). O conhecimento da sinalização de açúcares em leveduras que naturalmente fermentam xilose irá contribuir para programas de melhoramento genético de leveduras para a produção de etanol 2G.

A influência da glicose no metabolismo de xilose em *S. passalidarum* ainda tem muito a ser investigado. Apesar de glicose inibir o consumo de xilose, o análogo 2-deoxiglicose não demonstrou esse perfil de inibição. Por outro lado, os genes que codificam as principais enzimas do metabolismo da xilose são menos expressos quando a glicose está presente no meio (Ribeiro et al., 2021). Esse perfil é curioso e sugere que essa levedura apresenta mecanismos de sinalização diferentes da repressão clássica por glicose. O principal ponto de regulação por glicose nessa levedura pode estar ocorrendo no transporte de xilose para o interior celular, porém poucos detalhes são conhecidos sobre os sistemas de transporte de *S. passalidarum* até o momento. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar transportadores de açúcares nessa levedura.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Linhagens e manutenção**

As linhagens utilizadas foram *Spathaspora passalidarum* NRRLY 27907, disponibilizada pelo professor Carlos Augusto Rosa do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e *Saccharomyces cerevisiae* DLG-K1, disponibilizada pelo professor Boris Stambuk da Universidade Federal de Santa Catarina, e obtida da Coleção de Microrganismos,

DNA e Células da UFMG (número de acesso UFMG-CM-Y5856). A manutenção da levedura *S. passalidarum* foi realizada em meio YPD (10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> peptona, 20 g L<sup>-1</sup> glicose) e *S. cerevisiae* em meio YPM (10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> peptona, 20 g L<sup>-1</sup> maltose) com 20% de glicerol (v/v) a -80 °C. Para utilização rotineira, as leveduras foram estriadas em meio YPD-ágar ou YPM-ágar (2% m/v) e uma colônia isolada foi utilizada para preparação do pré-inoculo. A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Molecular, foi utilizada para amplificação do plasmídeo p426-GDP (Figura 1) e cultivada em meio Luria-Bertani (10 g·L<sup>-1</sup> triptona, 5 g·L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g·L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio) e ampicilina (100 mg·L<sup>-1</sup>).

## **2.2 Identificação dos potenciais transportadores de xilose e/ou glicose de *S. passalidarum***

As sequências de aminoácidos dos transportadores de glicose de *Saccharomyces cerevisiae* S288C e dos transportadores de glicose e/ou xilose de *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 foram obtidas do *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org/>) e do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), respectivamente. Essas sequências foram utilizadas como *query* na ferramenta BLASTp do NCBI contra as sequências de proteínas de *S. passalidarum* (GCA\_000223485.1). As proteínas com E-value menores que 1E-05 foram anotadas como possíveis alvos. A procura por domínios de transportadores de açúcar foi realizada através do alinhamento das sequências dos potenciais transportadores contra o banco de dados PFAM (Finn et al., 2014) utilizando “hmmsearch” de HMMER tool (Potter et al., 2018). O programa TMHMM Server v.2.2 (Krogh et al., 2001) foi utilizado para predição das hélices transmembrana. Posteriormente, as sequências das potenciais proteínas de transporte foram alinhadas com sequências de transportadores de açúcar de fungos caracterizados experimentalmente utilizando o alinhamento Muscle no programa MEGA (v 6.06) (Tamura et al., 2013). Esse mesmo programa foi utilizado para a construção da árvore filogenética usando o método estatístico de Maximum Likelihood (Número de Bootstrap: 1000). O alinhamento de sequências para avaliar a conservação de motivos foi feito através do Clustal Omega (Madeira et al., 2019). A

predição de sítios de ubiquitinação foi feita em BDM-PUB (<http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php>).

### 2.3 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

A expressão gênica dos potenciais transportadores de glicose e xilose identificados no item 2.2 foi avaliada em meio de cultivo contendo 20 g·L<sup>-1</sup> xilose ou glicose, e em cofermentação (20 g·L<sup>-1</sup> xilose e 20 g·L<sup>-1</sup> glicose).

A levedura *S. passalidarum* foi previamente cultivada em meio YP (10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> peptona) sob agitação de 150 rpm a 30 °C. O pré-inóculo para os ensaios com açúcares individuais foram realizados com 20 g L<sup>-1</sup> xilose ou glicose. Para os ensaios de cofermentação, o pré-inóculo foi realizado com 20 g L<sup>-1</sup> glicose. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 3000×g por 5 min, e lavadas com solução salina 0,85% (m/v). A densidade óptica (D.O(600nm)) inicial foi ajustada para 1, e as células foram transferidas para Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose e/ou glicose, e incubados a 30 °C sob agitação de 150 rpm. Nos ensaios contendo uma fonte de carbono (xilose ou glicose), amostras de células foram retiradas após 2 horas de cultivo. Nos ensaios de cofermentação, as amostras de células foram retiradas nos tempos de 6 e 12 horas de cultivo. Esses tempos foram escolhidos de acordo com resultados anteriores (Ribeiro et al., 2021) que demonstraram o perfil de consumo dos açúcares nessa condição de cultivo. Posteriormente, as amostras de células recolhidas foram imediatamente direcionadas para a extração de RNA total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a extração do RNA total, primeiramente as amostras de células coletadas foram submetidas ao tratamento com a enzima liticase de *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich). Em seguida, a extração do RNA foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade da extração do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL) em tampão TAE (Tris-Acetato (2M) e EDTA (0,5 M) e pH 8). A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5 microplate/cuvette reader (Molecular Devices) no comprimento de onda de 260 nm. Posteriormente, 1 µg de RNA total foi tratado com DNase I (Sigma), e em seguida, a síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante.



Os oligonucleotídeos específicos para os genes putativos foram construídos utilizando o programa GenScript Real-time PCR (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>). O controle endógeno utilizado foi o gene que codifica actina (*ACT1*) (Tabela 1). A reação de qPCR foi conduzida no aparelho Step One (Applied Biosystems), utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em duplicata técnica, de acordo com o manual do fabricante, e sob as seguintes condições de amplificação: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 94°C e 1 min a 60°C, com uma curva de *melting*. Os níveis de expressão dos genes foram analisados pelo método de quantificação relativa por curva padrão. Uma curva padrão de cada gene foi construída, correlacionando o Ct médio da duplicata técnica, com o log10 de diferentes concentrações de DNA genômico (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 ng/μL). A normalização dos dados foi feita pelo gene endógeno *ACT1*. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5 utilizando o teste T bicaudal e não pareado.

Tabela 1: Oligonucleotídeos específicos para os genes putativos de transportadores de açúcares selecionados para análise de qRT-PCR.

<b>Identificação</b>	<b>Primer Forward (5' - 3')</b>	<b>Primer Reverse (5' - 3')</b>
101944-Spas	TCCCTGAATCGCCTCGTTGG	ACCAATCGAGTTTGCGCTTT CC
101945-Spas	TTCGTCTGTTCTTCGCTTC	GCGTTACCTCTTTGGGAGAT T
137234-Spas	CTCCTGTGGCGTTTGAAAAT	CACCACTGTGCATTTGGTTC
137521-Spas	AGCTGCTGGTGTTCGGTAAGA	ATCGGCGACGTAACCGTTC A
137635-Spas	GGAAGAAGAAAGACAATACG GGTAGGA	AGCAAGCGTAGAACCCACG A
138600-Spas	AACGAGACTGCCAGCAACT	TTTCACCGTCAGGGCCAAC T
138605-Spas	ACAATCCTACCGCCGTGTCT	GACACCGGACCCTGAGGAA A
138780-Spas	ACGGCTGGTTCGTTCTTTGGA	ACTCGATGTGTTCAATGGCA ACC

139566-Spas	GGTGTCCGGTGTGGTTTCGG	TGACCCAACCCGTAAGAAA GGT
139957-Spas	TGTTGGCTGCTGGCAGATTC	CCCAGGTGATGGCCCATTG A
140117-Spas	TGGGTTCCCTCATCCCACCAG	TGATGATACACAGGGTTGCT GGA
140211-Spas	ACCCATTTCTTGTGCAATTGG	GCTGCCTGGGAATCACTGA CT C
182851-Spas	CACTGGAGGTAGAAATGACT	TGGCCTCAATTTCTTGGAT CTGGT TTGG
203886-Spas	TGTTTGGCTGGTGCTCTTGC	TGCCACACGGGAACAGTAG C
137928 - Spas	GGTTGATAAGGCTTGGCATT	CAGCTTGTTTCGCTGTCAGCT CTGC T
Act1- Spas	AGATACCCAATTGAACACGG	GATTTAGGATTCATTGGAGC TATC TTCA

#### 2.4 Caracterização funcional dos transportadores putativos de xilose e/ou glicose

A validação funcional dos transportadores putativos foi realizada através da complementação gênica na linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1 (Gonçalves et al., 2014). Essa linhagem não possui os principais genes transportadores de hexose (*HXT1* a *HXT7* e *GAL2*) e por isso é incapaz de crescer em meios contendo xilose, glicose e outros monossacarídeos como única fonte de carbono. A manutenção dessa levedura foi feita em maltose, devido a presença de transportadores para esse dissacarídeo codificados pelos genes *MAL*. Assim, a expressão de um transportador heterólogo nessa linhagem permitirá o crescimento e fermentação em glicose ou xilose. A capacidade de fermentar xilose ocorre devido à super-expressão dos genes *XYL1* e *XYL2*, de *S. stipitis*, e *XKS1*, de *S. cerevisiae*, em um plasmídeo integrativo, os quais codificam as enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK), respectivamente. As sequências codificadoras dos genes selecionados como transportadores de açúcares putativos foram amplificadas do genoma de *S.*

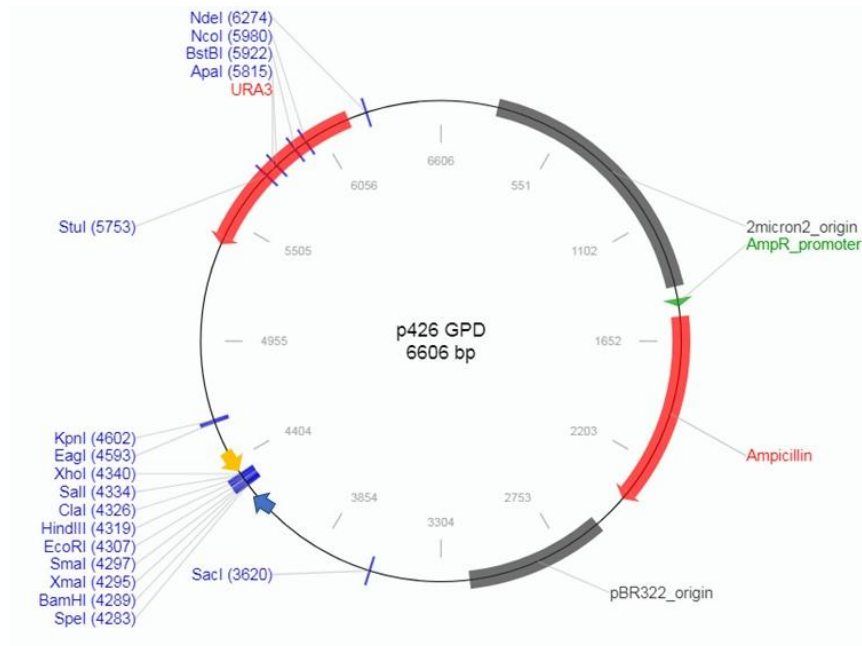
*passalidarum* NRRLY 27907, a partir de oligonucleotídeos contendo os sítios para as enzimas de restrição BamHI e XhoI (Tabela 2). Os produtos de PCR foram purificados e clonados no vetor de expressão p426-GDP. Esse vetor possui o promotor constitutivo oriundo do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e o terminador do gene citocromo C (CYC), a marca de seleção auxotrófica URA3 e o gene de resistência à ampicilina (Figura 1).

Os vetores construídos foram transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). Os transformantes foram selecionados em meio LB com ampicilina. A confirmação das clonagens foi feita por PCR, digestão e sequenciamento. A seguir, a linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1 foi transformada com os vetores construídos pelo método de acetato de lítio (Gietz e Schiestl, 2007). Os recombinantes foram selecionados em meio sintético YNB (6.7 g/L *yeast nitrogen base without amino acids*, Difco) sem uracila, acrescido de aminoácidos e maltose (20 g.L<sup>-1</sup>)

Tabela 2: Oligonucleotídeos específicos para os genes putativos de transportadores de açúcares selecionados para clonagem.

<b>Identificação</b>	<b>Primer Forward (5' - 3')</b>	<b>Primer Reverse (5' - 3')</b>
p426-521	TATATAGGATCCATGCACGG AGGTTTCAGAC	TATATTCTCGAGTTAAGCACT GTCAGCATCAG
p426-211	TATATAGGATCCATGGGTATT GAAGAAAGTTTA	TATATTCTCGAGTTAAACCTT TTCGATTTGTTC
p426-957	TATATAGGATCCATGTTCAAA TTTCTAGAGCG	TATATTCTCGAGTTATGGTC TCTTTTCTTGTG
p426-851	TATATAGGATCCATGGGTTTA GAAGATAATCAA	TATATTCTCGAGCTAAACTGA ATGTTTCGATTTTC
ProGPD- p426 F	CGGTAGGTATTGATTGTAATT CTG	
TerCYC1- p426 R		GCGTGAATGTAAGCGTGAC

As sequências sublinhadas indicam o sítio de restrição das enzimas BamHI e XhoI.



**Figura 1:** Representação do plasmídeo p426-GPD. As marcas para seleção em bactéria (*Ampr*) e em levedura (*URA3*) estão representadas em vermelho. A localização do promotor pGPD está indicada pela seta azul e do terminador tCYC pela seta amarela. As enzimas de restrição utilizadas para clonagem foram BamHI e XhoI. Fonte do mapa: Modificado de <https://www.addgene.org/vector-database/1632/>.

## 2.5 Crescimento em meio sólido

As linhagens de *S. cerevisiae* contendo o gene de interesse foram denominadas: DGLK1- 211, DGLK1- 521, DGLK1- 851 e DGLK1- 957. Uma colônia de cada levedura foi previamente inoculada em meio YNB sem uracila com 20 g·L<sup>-1</sup> maltose por 2 dias. A D.O<sub>600nm</sub> foi ajustada para 1,0, e em seguida, diluições decimais foram realizadas (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>). As células foram semeadas (10 μL) em placas de Petri contendo o em meio YNB sólido (2% m/v- ágar) sem uracila contendo 20 g·L<sup>-1</sup> de maltose, glicose ou xilose. As placas foram incubadas 30 °C. O período de incubação foi de 3 dias para o ensaio com maltose e de 7 dias para glicose ou xilose. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes.

## 2.6 Condições de fermentação

Para a obtenção de altas densidades celulares primeiramente uma colônia isolada das linhagens foi transferida tubos de 50 mL contendo 10 mL de meio YNB líquido sem uracila com  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de maltose e incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 48 horas, sob agitação de 150 rpm. Em seguida as células foram recolhidas e lavadas com solução salina 0,85% (m/v) e transferidas para Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL do mesmo meio de cultivo por 24 horas. Por fim, as células foram novamente recolhidas e lavadas, e transferidas Erlenmeyers de 1L contendo 250 mL de meio YNB sem uracila com  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de maltose e incubadas por 36 horas. Após esse período, o volume de inóculo correspondente a  $\text{DO}_{(600\text{nm})}$  7,0 foi centrifugado, as células lavadas com solução salina e transferidas para 50 mL de meio YNB sem uracila contendo  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose ou xilose. Da mesma forma, também foram realizadas as cofermentações de  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de maltose e  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glicose ou  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de maltose e  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  xilose. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL vedados com tampão de borracha contendo uma agulha que permitia a saída do dióxido de carbono gerado na fermentação. Os frascos foram incubados a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação de 100 rpm por 75 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em diferentes intervalos de tempo, amostras foram recolhidas para a avaliação da  $\text{DO}_{(600\text{nm})}$  em espectrofotômetro e quantificação de substratos por cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography*; HPLC). As amostras retiradas para HPLC foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em membrana de poro  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ . A quantificação foi realizada utilizando coluna Aminex HPX-87H (BIO-RAD) a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , acoplada ao detector de índice de refração (Shimadzu RID-10A). A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mM aplicado a uma taxa de eluição de  $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As curvas padrão para maltose (2,5 a 50 mM), glicose, xilose, xilitol (3 a 100 mM) e etanol (4 a 200 mM) foram previamente feitas nas mesmas condições. Adicionalmente amostras foram retiradas após 6 h de cultivo em maltose e xilose, após para extração de RNA total e síntese de cDNA, como descrito no item 2.3. A reação de RT-PCR foi realizada utilizando as seguintes condições: 5 min a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 35 ciclos de 30 s a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e 30 s a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  e 5 min a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 2.7 Modelagem da estrutura dos transportadores

O programa TMHMM Server v.2.2 (Krogh et al., 2001) foi utilizado para a predição de hélices transmembrana. A predição da estrutura tridimensional do transportador foi realizada utilizando Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine version 2.0) (Kelley et al., 2015), através da modelagem por homologia. A minimização de energia do modelo tridimensional gerado foi realizado pelo YASARA Energy Minimization Server (Krieger and Vriend, 2014). A qualidade do modelo foi avaliada usando Ramachandran Plot (Anderson et al., 2005), PROCHECK (Laskowski et al., 1993), ERRAT (Colovos and Yeates, 1993), PROVE (Pontius et al., 1996) e PROSA (Wiederstein e Sippl, 2007).

## 2.8 Predição de afinidade

O programa AutoDock Vina (Trott, O. e Olson 2010) foi utilizado para a predição da interação do transportador com os ligantes xilose, glicose e 2-deoxiglicose, utilizando os parâmetros padrão. Os arquivos mol2 contendo a estrutura tridimensional dos ligantes foram recuperados do banco de dados ZINC15 (<https://zinc.docking.org/>) com os números de acesso ZINC3833800 (glicose), ZINC1529214 (xilose) e ZINC3860328 (2-deoxiglicose). Os modelos foram analisados no programa Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

# 3. RESULTADOS

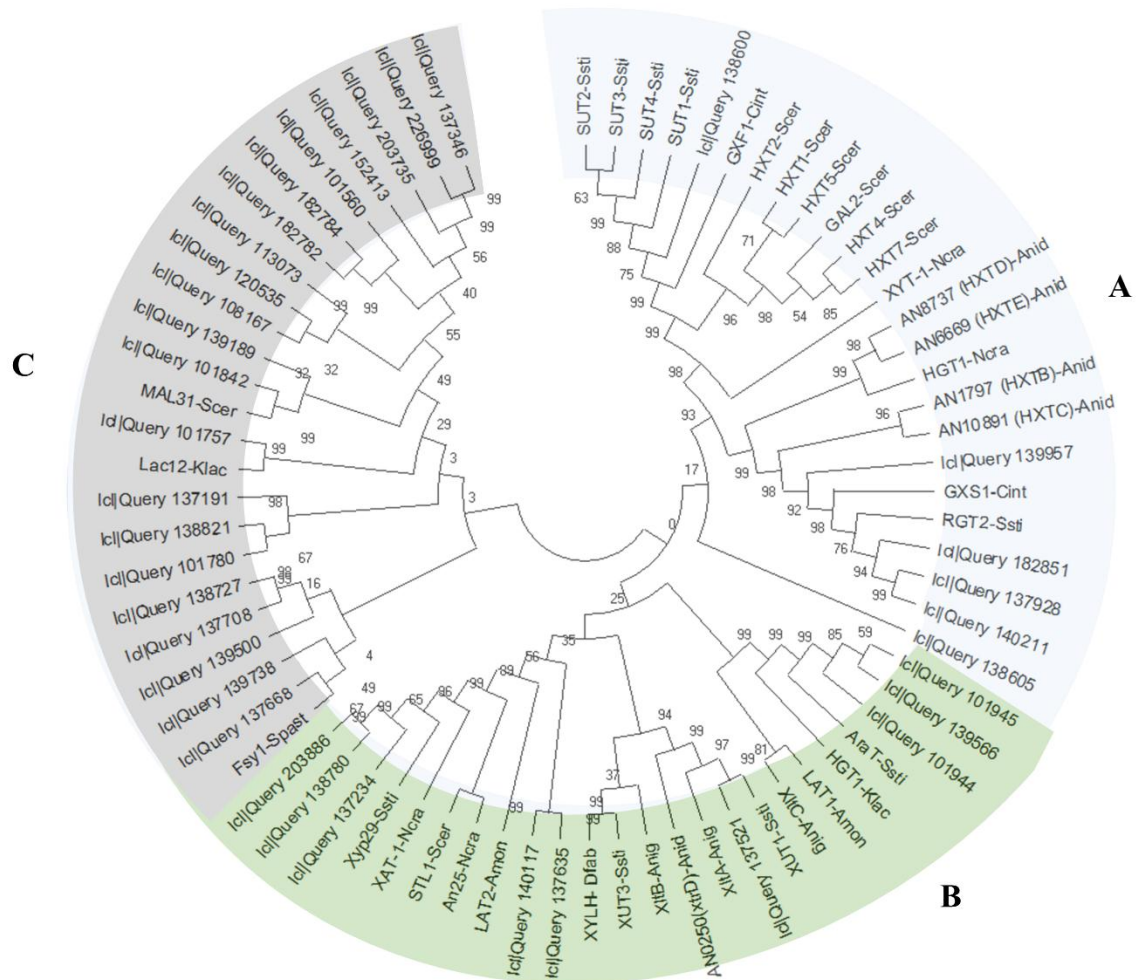
## 3.1 Identificação dos potenciais transportadores de xilose e/ou glicose

Um conjunto de transportadores de glicose de *S. cerevisiae* S288C, e transportadores de glicose e xilose da levedura *S. stipitis* CBS6054 foram selecionados dos bancos de dados (Apêndice, Tabela 1). Essas sequências foram utilizadas como *query* na ferramenta BLASTp contra o proteoma de *S. passalidarum* NRRLY 27907. Posteriormente, todas as sequências de proteínas de *S. passalidarum* NRRLY 27907 com E-value menores que 1E-05 foram avaliadas quanto a presença de domínios proteicos e hélices transmembranas nos bancos de dados PFAM e

TMHMM Server, respectivamente. Dessa forma, foram identificadas 36 sequências de proteínas de possíveis transportadores de glicose e/ou xilose.

As 36 sequências putativas de *S. passalidarum* NRRLY 27907 juntamente com sequências de transportadores de açúcares de fungos caracterizados experimentalmente (Apêndice, Tabela 2), foram usadas para análise filogenética. Os resultados destas análises mostram a separação destas proteínas em 3 grupos principais (Figura 2). O grupo A contém 6 proteínas de *S. passalidarum* e 19 proteínas previamente caracterizados como transportadores de glicose dos microrganismos *Scheffersomyces stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*. Além de transportadores de hexoses, o grupo A possui o transportador de xilose de *N. crassa* (XYT-1) e os transportadores de xilose e glicose de *Candida intermedia* (GXF1 e GXS1). O grupo B agrupou 9 sequências de proteínas de *S. passalidarum* e 9 transportadores de xilose funcionalmente caracterizados em *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *S. stipitis*, *Debaryomyces fabryi* e *N. crassa*. Este grupo também incluiu 3 proteínas transportadoras de arabinose das leveduras *S. stipitis* e *Ambrosiozyma monospora*, e as proteínas HGT1 de *Kluyveromyces lactis* e STL1 de *S. cerevisiae*, as quais transportam glicose e glicerol, respectivamente. O grupo C contém o transportador de frutose de *Saccharomyces pastorianus*, lactose de *Kluyveromyces lactis*, maltose de *S. cerevisiae* e 21 proteínas putativas de *S. passalidarum* (Figura 2). A predição de hélice transmembrana mostrou que a maioria dos transportadores de *S. passalidarum* dos grupos A e B possuem 12 transmembranas, com exceção de 137635, 140117, 137234 e 138780 (Tabela 3) e apenas as proteínas 137668 e 101757 do grupo C possuem 12 transmembranas, as demais possuem de 10 a 11.

Os grupos A e B possuem 15 proteínas de *S. passalidarum* que possivelmente transportam os açúcares glicose e/ou xilose. No banco de dados NCBI algumas dessas sequências são anotadas como transportadores de açúcar, enquanto outras são descritas como proteínas hipotéticas (Tabela 3). Os genes que codificam essas proteínas foram selecionados para avaliação da expressão em meio contendo glicose e/ou xilose.



**Figura 2:** Árvore filogenética construída a partir das sequências de aminoácidos das possíveis proteínas transportadoras de açúcares de *S. passalidarum* NRRLY 27907 e transportadores de açúcares caracterizados experimentalmente de fungos. No grupo A estão presentes principalmente os transportadores de glicose caracterizados pela literatura. O grupo B contém os transportadores de xilose. O grupo C apresenta outros transportadores de açúcares caracterizados (frutose, lactose e manose). Ssti = *Scheffersomyces stipitis*, Cint = *Candida intermedia*, Scer = *Saccharomyces cerevisiae*, Ncra = *Neurospora crassa*, Anid = *Aspergillus nidulans*, Klac = *Kluyveromyces lactis*, Amon = *Ambrosiozyma monospora*, Anig = *Aspergillus niger*, Dfab = *Debaryomyces fabryi*, Spast = *Saccharomyces pastorianus*, lcl|Query = transportadores putativos de *S. passalidarum* NRRLY 27907.



Tabela 3: Anotação no NCBI das sequências de proteínas de *S. passalidarum* pertencentes aos grupos A e B da filogenia.

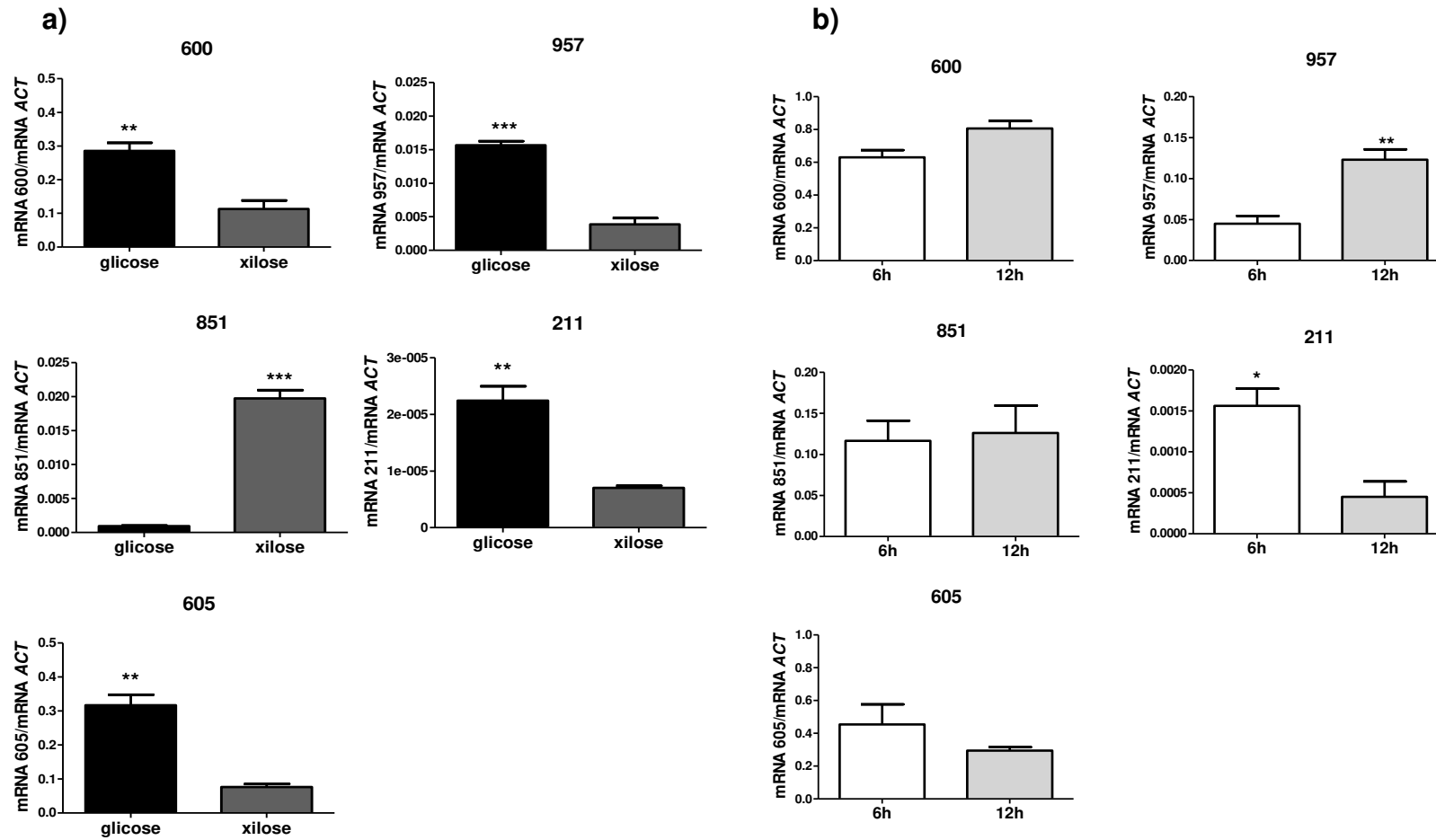
Query	Código de acesso NCBI	ID NCBI	Número de transmembranas
138600	XP_007374835.1	sugar transporter 1	12
139957	XP_007376192.1	hypothetical protein	12
182851	XP_007377994.1	glucose transporter/sensor	12
140211	XP_007376446.1	glucose transporter/sensor	12
138605	XP_007374840.1	hypothetical protein	12
101945	XP_007372242.1	hypothetical protein	12
139566	XP_007375801.1	high affinity glucose transporter	12
101944	XP_007372241.1	high affinity glucose transporter	12
137521	XP_007373756.1	putative sugar transporter, high affinity	12
137635	XP_007373870.1	hypothetical protein	11
140117	XP_007376352.1	hypothetical protein	7
137234	XP_007373469.1	hypothetical protein	10
138780	XP_007375015.1	hypothetical protein	10
203886	XP_007376697.1	hypothetical protein	12

### 3.2 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

A expressão gênica dos potenciais transportadores de glicose e/ou xilose foi primeiramente avaliada em meios contendo somente uma das fontes de carbono, com o intuito de identificar possíveis transportadores específicos. Posteriormente a expressão dos genes foi analisada durante a cofermentação, a fim de verificar a influência da glicose na regulação transcricional desses genes transportadores de

açúcares. Nessa condição, em 6h de cultivo, *S. passalidarum* consumiu apenas glicose e em 12h, a glicose se esgotou do meio e a levedura consumiu a xilose (Ribeiro et al., 2021).

A figura 3 mostra a expressão dos genes que codificam para transportadores putativos de glicose (grupo A, figura 2). Todos os genes foram induzidos na presença de glicose, exceto o gene 851, que foi significativamente ( $p$ -value  $<0.001$ ) induzido na presença de xilose (Figura 3a). Durante a cofermentação, o gene 211 foi induzido em 6h de cultivo, enquanto o gene 957 foi induzido em 12h. Os demais genes (600, 851 e 605) não apresentaram diferenças significativas entre os tempos de 6 e 12h (Figura 3b).

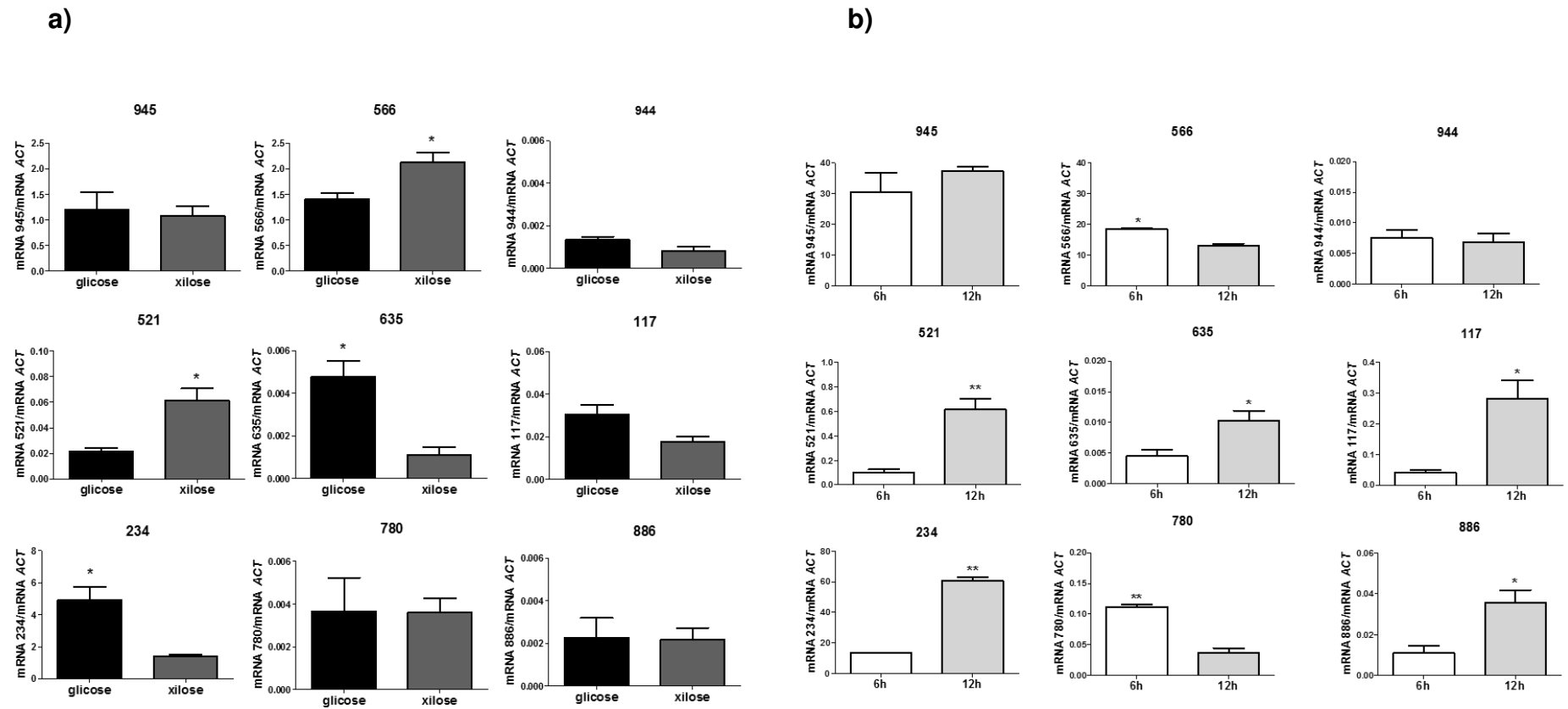


**Figura 3:** Expressão dos genes que codificam transportadores putativos do grupo A nas condições de cultivo glicose ou xilose (a) e cofermentação (b). A identificação dos genes são os três últimos números da identificação apresentada na figura 2 e tabela 3.

A análise da expressão dos genes que codificam para os transportadores putativos de xilose (grupo B) mostrou que 5 genes (945, 944, 117, 780 e 886) não apresentaram diferenças significativas na expressão entre o cultivo com glicose e o cultivo com xilose (Figura 4). Os genes 566 e 521 foram mais expressos na presença de xilose, enquanto os genes 635 e 234 foram mais expressos no meio contendo glicose (Figura 4a). Na cofermentação os genes 945 e 944 também não apresentaram diferenças significativas nos tempos analisados, demonstrando que esses genes não são regulados por essas fontes de carbono. Os genes 566 e 780 foram induzidos em 6h de cultivo, enquanto glicose ainda estava presente no meio. Em 12h, a glicose se esgotou do meio, e os genes induzidos foram 521, 635, 117, 234 e 886 (Figura 4b).

Os genes dos transportadores 211 e 521 apresentaram um nível de expressão gênica esperado de acordo com as análises filogenéticas. A proteína codificada pelo gene 211 pertence ao grupo A, que possui proteínas transportadoras de glicose. Dessa forma, era esperada uma expressão induzida em meio contendo apenas glicose e em 6h da cofermentação, visto que neste tempo a glicose ainda estava presente no meio (Figura 3). De forma similar, a proteína codificada pelo gene 521 pertence ao grupo B, o qual majoritariamente é composto por proteínas transportadoras de xilose. Assim, como esperado, a expressão desse gene foi maior em meio contendo apenas xilose e em 12h da cofermentação, tempo em que a xilose foi internalizada pela célula (Figura 4). Nesse sentido, os alvos 211 e 521 podem ser transportadores específicos de glicose e xilose, respectivamente. Assim, esses alvos foram selecionados para caracterização funcional.

Além desses genes, os alvos 851 e 957 também foram selecionados para a caracterização funcional em *S. cerevisiae*. De maneira inesperada, o gene 851 foi o único do grupo A que foi significativamente induzido na presença de xilose, sendo, portanto, um interessante candidato a transportador de xilose. Por outro lado, o gene 957 também pertence a esse grupo e foi induzido em meio contendo glicose. No entanto, na cofermentação a expressão desse gene foi aumentada em 12h, quando a glicose já havia se esgotado do meio (Figura 3).

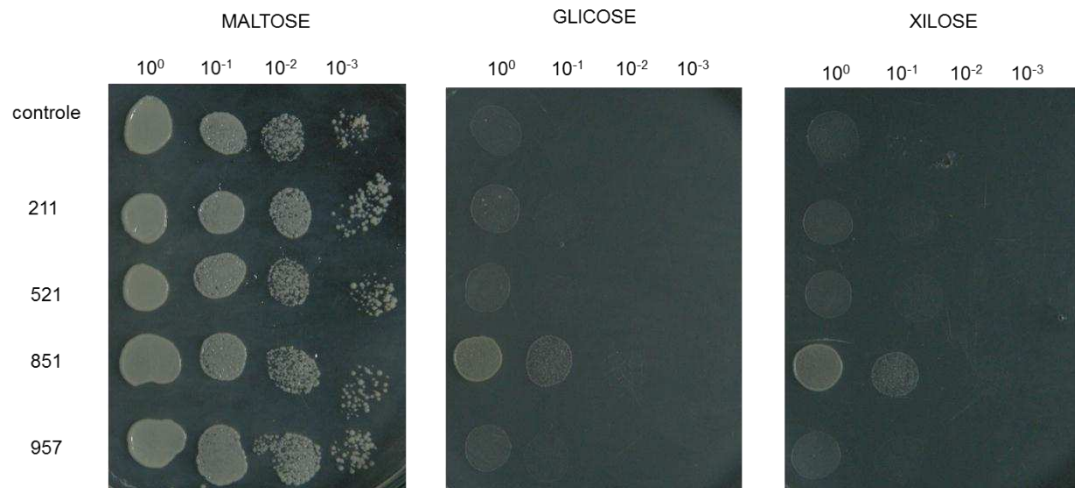


**Figura 4:** Expressão dos genes que codificam transportadores putativos do grupo B nas condições de cultivo glicose ou xilose (a) e cofermentação (b). A identificação dos genes são os três últimos números da identificação apresentada na figura 2 e tabela 3.

### **3.3 Caracterização funcional dos transportadores putativos de xilose e/ou glicose.**

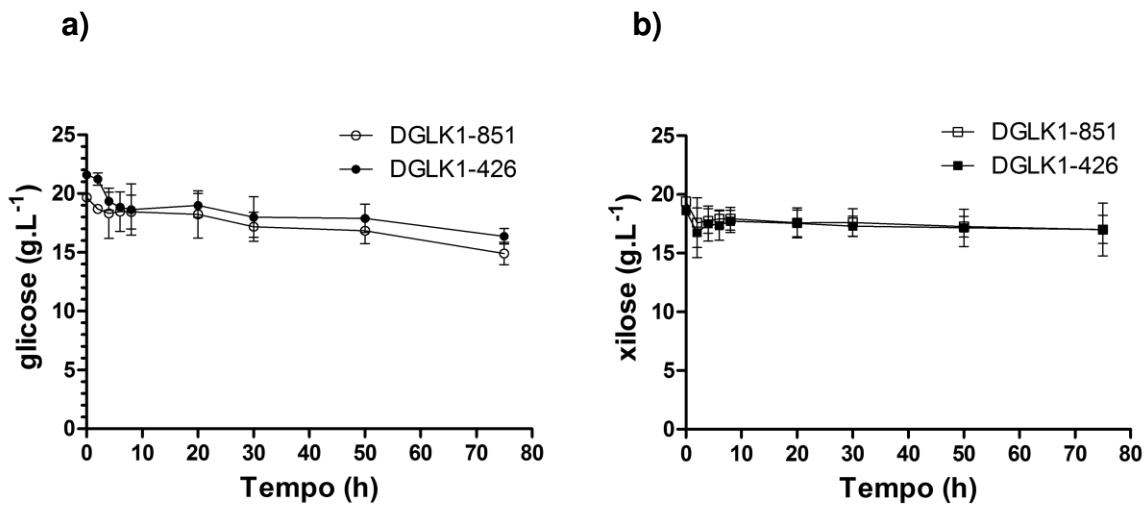
A caracterização funcional dos transportadores selecionados foi realizada através da complementação gênica utilizando a linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1. Essa linhagem não é capaz de consumir xilose, glicose e outros monossacarídeos como única fonte de carbono, pois apresenta os principais genes que codificam transportadores de hexose deletados do seu genoma. Assim, essa linhagem é ideal para investigar novos transportadores de xilose e/ou glicose, pois o transporte do açúcar será exclusivamente decorrente da funcionalidade da proteína investigada. Primeiramente, as sequências selecionadas (211, 521, 851 e 957) foram clonadas no vetor multicópia p426 e propagados em *E. coli* DH5 $\alpha$ . A verificação da construção dos vetores foi feita através de digestões por enzimas de restrição e por sequenciamento. Em seguida, esses vetores foram utilizados para transformar *S. cerevisiae* DLG-K1, e os transformantes foram selecionados em meio YNB sem uracila contendo maltose como fonte de carbono. Além das linhagens com os alvos selecionados, também foi construída uma linhagem de *S. cerevisiae* DLG-K1 controle, contendo o vetor p426-GPD vazio.

Primeiramente a caracterização dos transformantes obtidos foi feita em meio sólido YNB sem uracila. Os transformantes foram inoculados em diluições decimais em meio contendo as seguintes fontes de carbono: maltose, xilose ou glicose (Figura 5). Como esperado, todas as linhagens mantiveram o crescimento em maltose e a linhagem controle não cresceu no meio com glicose ou xilose. Somente a linhagem expressando o gene 851 foi capaz de crescer no meio contendo glicose ou xilose, indicando ser um transportador funcional.



**Figura 5:** Crescimento das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* expressando diferentes transportadores de açúcar (211, 521, 851 e 957). As linhagens foram cultivadas em meio YNB sólido sem uracila a 30 °C com 2% (m/v) por 3 dias (maltose) e 7 dias (glicose ou xilose). A D.O<sub>(600nm)</sub> da esquerda para a direita são 1 e as diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). O controle é a linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1 contendo o vetor p426-GPD vazio.

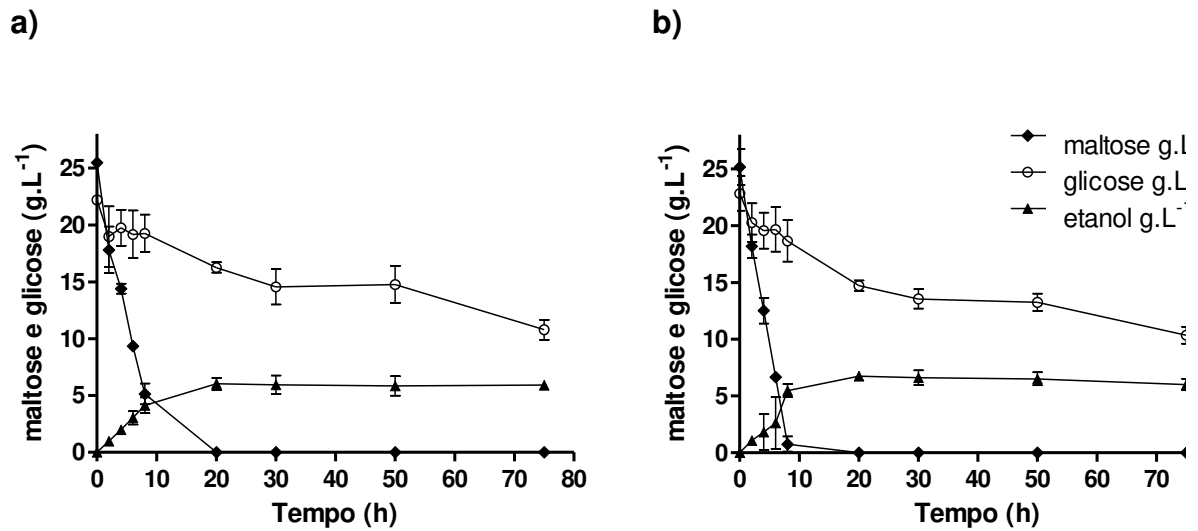
A partir desses resultados, foram realizadas fermentações com alta densidade celular das linhagens DGLK1- 851 e o controle DGLK1-p426, a fim de avaliar o consumo dos açúcares glicose ou xilose. Curiosamente, diferente do resultado obtido no meio sólido, não foi observado diferença de consumo dos açúcares entre a linhagem DGLK1-851 e o controle no meio líquido. Apesar de DGLK1-851 ter consumido cerca de  $4,77 \pm 0,90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose, a linhagem controle consumiu  $5,23 \pm 0,80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Já no cultivo com xilose, ambas as linhagens não consumiram o açúcar (Figura 6).



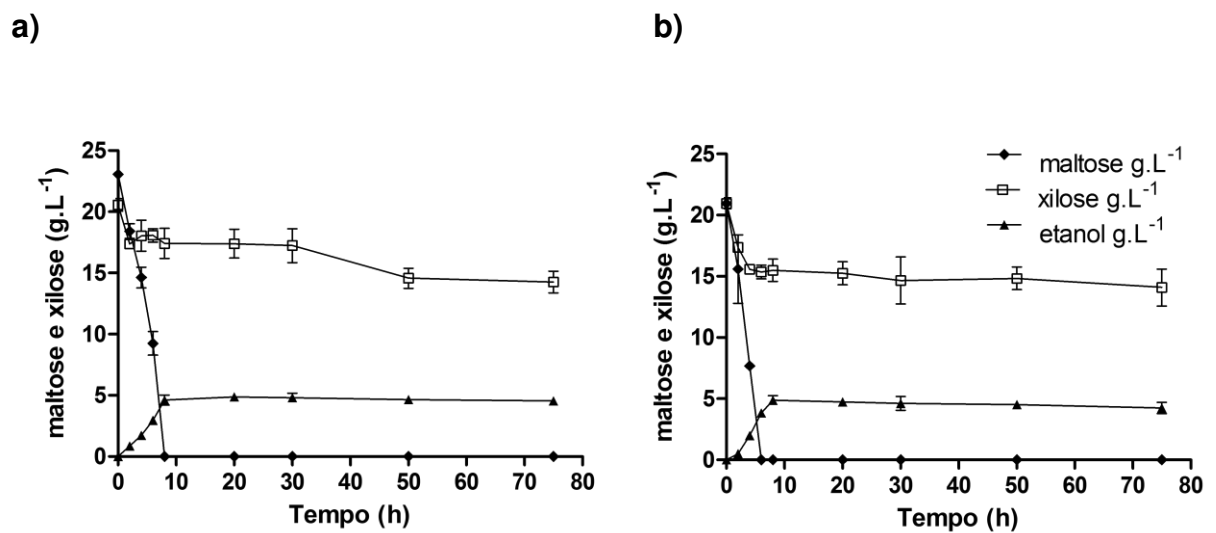
**Figura 6:** Fermentação com alta densidade celular (DO 7,0) das linhagens *S. cerevisiae* DGLK1-851 e DGLK1-426 em meio YNB sem uracila contendo 2% (m/v) de glicose (a) ou xilose (b).

Visto que as fermentações com glicose ou xilose não apresentaram consumo efetivo desses açúcares pela linhagem DGLK1-851, foram realizadas cofermentações contendo maltose e glicose ou maltose e xilose. As linhagens DGLK1-851 e DGLK1-p426 consumiram toda a maltose do meio em aproximadamente 10 h de cultivo. Na cofermentação com a levedura DGLK1-851 o consumo de glicose foi de  $11,42 \pm 0,94$  g·L<sup>-1</sup>, enquanto DGLK1-426 consumiu  $11,88 \pm 0,89$  g·L<sup>-1</sup> de glicose (Figura 7). Durante a cofermentação de maltose e xilose, a maltose foi totalmente consumida em 8h de cultivo por ambas as linhagens. As linhagens DGLK1-851 e DGLK1-p426, consumiram  $6,29 \pm 0,43$  e  $6,86 \pm 1,28$  g·L<sup>-1</sup> de xilose, respectivamente (Figura 8). A produção de etanol foi similar entre as linhagens e ocorreu a partir do consumo de maltose (Figuras 7 e 8).





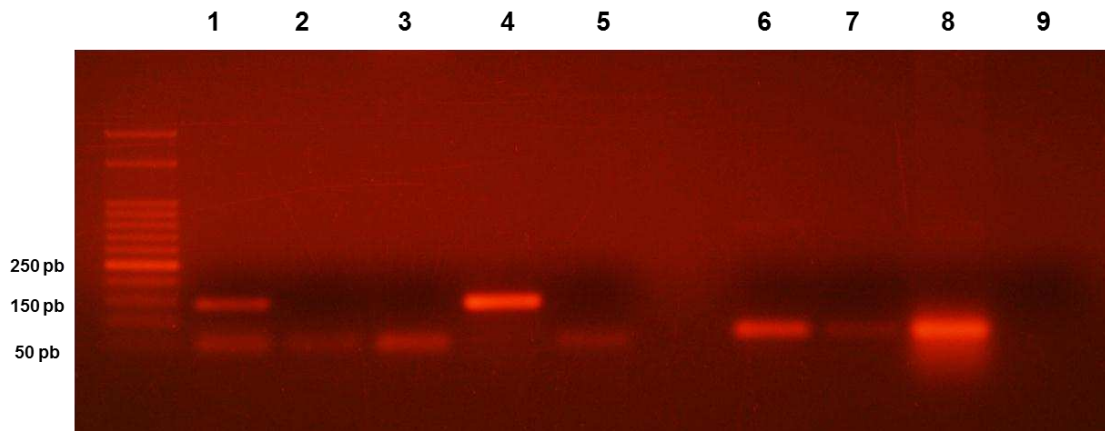
**Figura 7:** Fermentação com alta densidade celular (DO 7,0) das linhagens *S. cerevisiae* DGLK1-851 (a) e DGLK1-426 (b) em meio YNB sem uracila contendo 2% (m/v) de maltose e glicose.



**Figura 8:** Fermentação com alta densidade celular (DO 7,0) das linhagens *S. cerevisiae* DGLK1-851 (a) e DGLK1-426 (b) em meio YNB sem uracila contendo 2% (m/v) de maltose e xilose.

Com o intuito de verificar se DGLK1-851 está expressando o gene heterólogo, foi realizado o ensaio de RT-PCR. A análise de expressão foi feita para as linhagens DGLK1-851 e DGLK1-p426 após 6h de cultivo no meio contendo maltose e xilose.

Apesar do consumo dos açúcares serem semelhantes entre DGLK1-851 e o controle, a expressão do gene 851 foi detectada na linhagem DGLK1-851 (Figura 9).



**Figura 9:** Expressão do gene 851 (1-5) e *ACT1* (6-9) em meio YNB sem uracila contendo 2% (m/v) maltose e xilose das linhagens DGLK1-851 e da DGLK1-426. Marcador 50pb, (1) linhagem DGLK1-851, (2) linhagem DGLK-426, (3) vetor p426, (4) controle positivo- DNA genômico de *S. passalidarum*, (5) controle negativo, (6) linhagem DGLK1-851, (7) linhagem DGLK-426, (8) controle positivo- DNA genômico *S. cerevisiae*, (9) controle negativo. Para os controles negativos da PCR utilizou-se água.

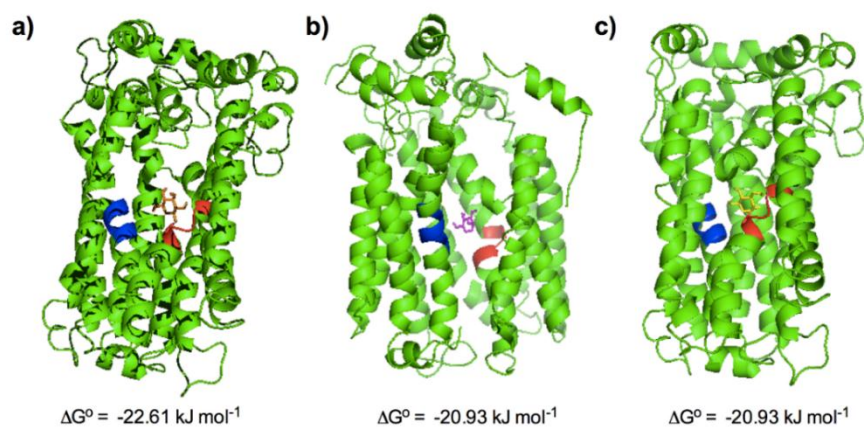
A análise do sequenciamento de Sanger confirmou a presença do gene 851 em quadro aberto de leitura. De fato, observamos a transcrição desse gene na linhagem DGLK1-851 (Figura 9). No entanto a qualidade do sequenciamento não foi suficiente para verificar se ocorreu mutações ou polimorfismos, os quais poderiam gerar uma proteína com funções diferentes ou incompleta. Assim, é necessário a realização de outro sequenciamento para verificar a correta sequência do gene 851 clonado em *S. cerevisiae* DGLK1.

### 3.4 Modelagem molecular e *docking*

A predição da estrutura tridimensional da proteína 851 foi feita por modelagem por homologia. O modelo da proteína codificada pelo gene 851 foi baseado em 20 moldes de estruturas PDB, com identidades de 26 a 8 % e confiança de 100%. A qualidade do modelo gerado foi avaliada quanto a estabilidade estérica e energética.

Posteriormente foi feita a minimização de energia no Yasara e os parâmetros de qualidade foram novamente avaliados.

A análise de *docking* da estrutura modelada com glicose e xilose demonstrou que ambos os açúcares podem se ligar à proteína 851. A glicose apresenta maior afinidade de ligação ( $-22,61 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) do que a xilose ( $-20,93 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). O análogo de glicose, 2-deoxiglicose, apresentou afinidade de ligação igual à xilose ( $-20,93 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (Figura 10).



**Figura 10:** Modelo estrutural e *docking* da proteína 851 com glicose (a), xilose (b) e 2-deoxiglicose (c). O motivo GGFLFG na transmembrana 1 em azul e motivo QQLTG na transmembrana 7 em vermelho.

A estrutura da proteína 851 é característica de um transportador de açúcar, contendo 12 transmembranas e motivos específicos (Figura 11). A primeira transmembrana possui o motivo GG/FXXXG, onde o X representa um aminoácido variável e não polar. Esse motivo é conservado entre transportadores funcionais e enriquecido em transportadores de xilose (Young et al, 2014). Na transmembrana 7 está presente o motivo QQLXG, que corresponde ao sítio de ligação à glicose encontrado em transportadores de hexose (Seatter et al., 1998; Peng et al., 2018). De fato, o *docking* mostrou que a glicose se apresenta mais próxima do motivo QQLTG, representado em vermelho na figura 10a, enquanto a xilose está próxima ao motivo GGFLFG destacado em azul (Figura 10b). Outro motivo importante também identificado na transmembrana 7 é o YYX(T/P), o que é importante para atividade e especificidade dos transportadores (Wang, et al. 2016). Os resíduos asparagina



XylE-Ecoli	LQTTIIVGVINLTFTVLAIMTVDKFGRKPLQIIGALGMAIGMFSLGTA-----	363
GXS1-Cint	TIISLATNIVNVGSTIPGILLMEVLGRRNMLMGGATGMSLSQLIVAIIVGVATS-----E	369
851	TIQMATNIVNVGMTFPGIALIELVGRRKLLSGSVVMSISQILVAAIGVAT-----	372
RGT2-Ssti	LIQMATNIVNFGSTVPGILLVETIGRRKLLGGSAVMSISQLIVAIIVGVAAG-----E	370
HXT14-Scer	ITSIILSSVNFSLTILGIYYVEKWHKTCCLLYGSTNLLFYMPTYATVGTGR-----	429
GAL2-Scer	ETSIVIGVVNFASFVFLWTVENLGHKRCLLLGAAATMMACMVIYASVGVTRLYPHGKSQP	426
	: . : * . * . . : : : * : : * : : . .	
XylE-Ecoli	YTQAPGIVALLSMLFYVAAFAMSWGVPVCWVLISEIFPNAIRGKALAIAVAQAQWLANYFVS	423
GXS1-Cint	NNKSSQSVLVAFSCIFIAFFAATWGPCAWVVVVGELFPLRTRAKSVSLCTASNWLWNWGIA	429
851	DSKAANQCLVAFCCIFIAGFAATWGPLCWAVIAENYSLNVRQKSVALCTASNWLWNFAIG	432
RGT2-Ssti	GSTSANKCLVAFVCFIAAFAATWGPLCWAVIAECYPLTVRQKSISLCTASNWLWNWGIA	430
HXT14-Scer	ETDFSNIVLIIVTCCFIFWFAITLGPVTFVLVSELFPPLRTRAIISMAICTFINWMFNFLIS	489
GAL2-Scer	SSKAGAGNCMIVFTCFYIFCYATTWAPVAWVITAESFPLRVKSKCMALASASNWVWGFLIA	486
	. : : : * : . * : : : * : : : : : : * : : .	
XylE-Ecoli	WTFPMMDKNSWLVAHFHNGFSYWIYGCMGVLAALFMWKFPETKTKTLEELEALWEPETK	483
GXS1-Cint	YATPYMVDDEK--NLGSNV-FFIWGGFNLACVFAWYFIYETKGLSLEQVDELYEHVSK	486
851	YATPYMVDSGPGNANLGSKV-FFIWGGCNAIGFLFVYFVYETKGLSLEQIDEMYLKVDK	491
RGT2-Ssti	YATPYMVNSGPGNANLGSKV-FFIWGGCNIIGGLFVWYLVYETKGLTLEQIDEMYEKVPK	489
HXT14-Scer	LLTFMIVSK-----IDFKL-GYIFAACLLALIFSWILVPETRKKNEQEINKIFEPE--	540
GAL2-Scer	FFTPTITSA-----INFYY-GYVFMGCLVAMFFYVFFVPETRKGLSLEEIQELWEEGVL	539
	* : . : : : : : : : * : . : : : : :	
XylE-Ecoli	KTQQTATL-----	491
GXS1-Cint	AWKSKGFVPSKHSFREQVDQQMDSKT----EAIMS-EEASV	522
851	AWQSSSFIPSEHAFREKNRVVVS--DS--KENVNEIEHSV-	527
RGT2-Ssti	AWQSTRFIPSEHAFTQPSAAAASVSSGK--AEGVSEVEEASV	528
HXT14-Scer	-----	540
GAL2-Scer	PWKSEGWIPSSRRGNNDLEDLQHDDKPWYKAMLE-----	574

**Figura 11:** Alinhamento múltiplo entre as sequências dos transportadores 851, XylE de *E. coli*, GXS1 de *C. intermedia*, RGT2 de *S. stipitis*, HXT14 e GAL2 de *S. cerevisiae*. As posições das 12 transmembranas previstas por TMHMM Server v.2.2 estão destacadas em cinza. Motivos e resíduos de aminoácidos estão destacados em negrito.

#### 4. DISCUSSÃO

As proteínas transportadoras de açúcar desempenham um papel crucial para o metabolismo da célula, pois a detecção ou a absorção do substrato é o primeiro nível de controle do fluxo metabólico celular (Elbing et al., 2004). A levedura *S. passalidarum* metaboliza eficientemente os açúcares glicose e xilose, porém pouco se sabe sobre o sistema de transporte desses açúcares. A identificação e o estudo da regulação de transportadores de xilose e/ou glicose em *S. passalidarum* poderá contribuir para sua aplicação biotecnológica na produção de etanol 2G.

Nesse trabalho, a identificação de possíveis proteínas transportadoras de açúcares em *S. passalidarum* NRRLY 27907 foi feita através da busca por similaridade com transportadores conhecidos de *S. cerevisiae* S288C e *S. stipitis* CBS 6054, leveduras fermentadoras de glicose e xilose, respectivamente. A partir da análise filogenética, das proteínas putativas de *S. passalidarum* NRRLY 27907 identificadas e transportadores de açúcares funcionalmente caracterizados de diversos fungos, foram selecionados 15 candidatos a transportadores de glicose e/ou xilose. A análise do perfil de expressão dos genes que codificam essas proteínas, em meios contendo glicose ou xilose, mostrou que a maioria desses alvos são regulados pela fonte de carbono.

O gene mais significativamente expresso na presença de xilose foi o 851, sendo, portanto, um potencial candidato a transportador de xilose. Outros genes que foram induzidos em meio com xilose foram o 521 e o 566. Os genes significativamente mais expressos em glicose foram todos pertencentes ao grupo A da análise filogenética, com exceção do 851. Adicionalmente, os genes 635 e 234, pertencentes ao grupo B também foram significativamente mais expressos em glicose.

A levedura *S. cerevisiae* fermenta preferencialmente glicose em relação a outras fontes de carbono que possam estar presentes no meio extracelular, como galactose, maltose e sacarose (Horák, 2013). Esse padrão é devido a ação de diferentes vias regulatórias no nível de expressão gênica e pós-traducional, sendo os transportadores de açúcares um dos principais alvos desse controle. As vias Snf3/Rgt2 e Snf1/Mig regulam a nível transcricional os genes transportadores de hexose e de fontes alternativas de carbono, respectivamente. Enquanto o mecanismo conhecido como inativação catabólica é responsável pelo controle pós-traducional das proteínas transportadoras de açúcar em *S. cerevisiae* (Horák, 2013). Recentemente,

demonstramos que *S. passalidarum* também consome preferencialmente glicose (Ribeiro et al., 2021). Analisando a expressão dos genes dos possíveis transportadores durante a cofermentação, podemos notar que o perfil de expressão da maioria não segue o padrão de expressão apresentado em meio contendo os açúcares separadamente. Por exemplo, o gene 851 foi induzido em meios contendo apenas xilose. Assim, durante a cofermentação se esperava uma indução em 12h, tempo em que a xilose foi internalizada pela célula. No entanto, esse gene não apresentou diferença de expressão entre os tempos de 6 e 12h. Isso sugere a existência de uma sinalização extracelular que detecta a presença destes açúcares e controla a expressão dos transportadores. De fato, assim como em *S. cerevisiae*, *S. passalidarum* possui os componentes da via Snf3/Rgt2 (dados não mostrados), sugerindo que a expressão destes transportadores possam ser também via detecção dos açúcares no meio extracelular.

Os transportadores putativos que apresentaram o mesmo padrão de expressão em meios com os açúcares individuais e em cofermentação foram os genes 211 e 521. O transportador 211, no genoma de *S. passalidarum* depositado no NCBI, é anotado como transportador/sensor de glicose e sua expressão foi induzida em meio com apenas glicose e em 6h da cofermentação, quando glicose estava sendo metabolizada. O transportador 521, anotado como transportador de açúcar putativo de alta afinidade, foi significativamente mais expresso em meio contendo apenas xilose e em 12h da cofermentação, quando a glicose se esgotou do meio. A proteína 521 possui 576 aminoácidos e 78,8% de identidade com o transportador XUT1 de *S. stipitis*. Recentemente, Knychala e colaboradores (2022) nomearam essa proteína como *SpXUT* e avaliaram sua funcionalidade. A linhagem *S. cerevisiae* DGLK1 expressando o gene *SpXUT*, com modificações, foi capaz de crescer e fermentar glicose ou xilose.

No presente trabalho, os ensaios de caracterização funcional dos transportadores putativos de *S. passalidarum* mostraram que apenas a linhagem DGLK-851 foi capaz de restaurar o crescimento em meio sólido com glicose ou xilose. Na análise filogenética a proteína 851 mostrou similaridade com os transportadores RGT2 e GXS1. O transportador GXS1 da levedura *C. intermedia* transporta glicose e xilose pelo mecanismo de simporte com prótons H<sup>+</sup> (Leandro et al., 2006). Moon e colaboradores (2013) identificaram que a proteína RGT2 de *S. stipitis* é capaz de transportar xilose, sem inibição da utilização de xilose por glicose. Esse transportador

é caracterizado por conferir a taxa de crescimento mais rápida em xilose, comparados a outros transportadores de *S. stipitis*, sendo um transportador eficiente de xilose (Young et al., 2014).

A relação estrutura e função dos transportadores GXS1 e RGT2 foram avaliados por Young e colaboradores (2014) que identificaram o motivo GG/FXXXG presente na transmembrana 1, o qual controla a seletividade do açúcar e está presente em transportadores que conferem crescimento à xilose. Mutações na parte variável desse motivo revelaram que os aminoácidos Phe38Ile39Met40 e Phe38Met40 em GXS1 e RGT2, respectivamente, conferem à linhagem mutante melhora no transporte de xilose e incapacidade de crescimento em glicose. Outro motivo previamente caracterizado envolvido na atividade e especificidade dos transportadores de açúcares é a sequência consenso YYX(T/P), presente na transmembrana 7 (Wang et al., 2016). Os dois resíduos de tirosina deste motivo são conservados entre os transportadores e atuam com interações específicas com a molécula glicose. Ao contrário, a quarta posição não é conservada, e através de mutações nessa posição, é possível obter transportadores de glicose mutantes com especificidade revertida para xilose (Wang et al., 2016). Essa transmembrana desempenha importante função na estrutura dos transportadores de açúcar. Sun e colaboradores (2012) relataram a estrutura cristalina do transportador Xyle de *Escherichia coli* em complexo com a xilose e glicose. Os autores identificaram que a transmembrana 7 forma o canal acessível ao solvente e uma hélice descontínua, o que poderia facilitar as mudanças conformacionais durante o transporte do substrato. Adicionalmente, a estrutura de Xyle com xilose mostrou que três resíduos polares (Q288, Q289 e N294) e um resíduo aromático Y298 presentes nessa transmembrana contribuem para o reconhecimento da xilose (Sun et al., 2012). Anteriormente, Seatter e colaboradores (1998) identificaram também na transmembrana 7 o motivo QLS, o qual interage com a glicose no carbono 1.

A proteína 851 possui os motivos GGXXXG e YYXT conservados na transmembrana 1 e 7, respectivamente. Nessa proteína a região variável do motivo da primeira transmembrana é Phe(38)Leu(39)Phe(40). A presença do resíduo Phe38 pode ser uma característica vantajosa para o transporte de xilose. Young e colaboradores (2014) avaliaram mutações da região variável desse motivo em GXS1. Nesse caso, a mutação Val38 por Phe38 conferiu ao mutante um aumento de 50% da taxa de crescimento em xilose, enquanto atenuou a taxa de crescimento em glicose.



De maneira geral, os resíduos 38 e 40 estão envolvidos na seletividade e o resíduo 39 controla a eficiência do transportador (Young et al., 2014). Outros resíduos também foram previamente caracterizados como pontos chave para melhorar o transporte de xilose, como os resíduos N na transmembrana 8 e o resíduo T na transmembrana 5 (Farwick et al., 2014). A proteína 851 possui todos esses resíduos conservados, mostrando ser um potencial transportador funcional de xilose e glicose. Apesar desses trabalhos mostrarem aminoácidos chaves envolvidos na melhoria do transporte de xilose, mutações em apenas um resíduo muitas vezes não são suficientes, de forma que diferentes mutações são necessárias para resultar no fenótipo desejado. Portanto, o conhecimento da estrutura de diversos transportadores irá auxiliar na engenharia dessas proteínas, com o intuito de obter um transportador eficiente de xilose, sem inibição por glicose.

A linhagem DGLK1- 851 cresceu em meio sólido contendo glicose e xilose, no entanto, as fermentações com alta densidade celular mostraram que não há diferença de consumo desses açúcares entre DGLK1- 851 e o controle DGLK1-p426 (vetor vazio). Visto que a proteína 851 está relacionada filogeneticamente com a proteína GXS1, identificada como um transportador ativo de glicose e xilose com simporte de prótons (Leandro et al., 2006), hipotetizamos que 851 também possa ser um transportador ativo com simporte de prótons. Assim, foram realizadas cofermentações com alta densidade celular com o dissacarídeo maltose. A maltose é a fonte de carbono, internalizada pelo transportador endógeno da linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1, fornecendo energia à célula, o que permitiria o transportador heterólogo 851 captar glicose ou xilose por transporte ativo. No entanto, mais uma vez, não houve diferença no consumo de glicose ou xilose entre a linhagem expressando a permease 851 e a linhagem controle contendo o vetor vazio. O fato da linhagem controle ter consumido os açúcares possivelmente ocorreu porque *S. cerevisiae* DGLK1 possui apenas os principais transportadores (Hxt 1-7, Gal2) deletados. Enquanto a linhagem EBY.VW4000, amplamente utilizada nos trabalhos de caracterização de transportadores heterólogos, possui o nocaute de todos os genes transportadores de hexose (Hxt1-17, Gal2) (Dos Reis et al., 2013; Du et al., 2010; Young et al., 2011). Assim, em fermentações com alta densidade celular, sugerimos que a linhagem DGLK1 internalize os açúcares pelos transportadores não deletados. Uma das possibilidades das diferenças de fenótipo obtidas pela linhagem DGLK1-851 em meio sólido e líquido, pode ser devido ao período de cultivo utilizado, pois em meio sólido a

incubação foi de 7 dias, enquanto em meio líquido foi de 3 dias. Diversos outros estudos também relataram não obter sucesso na caracterização funcional de transportadores em linhagens de *S. cerevisiae* hxt-null (Runquistetal., 2009; Du et al., 2010; Runquistetal., 2010; Young e tal., 2011). Essas linhagens apresentam muitas modificações genéticas que podem dificultar o cultivo, e conseqüentemente, a expressão heteróloga de transportadores (Moon et al., 2013).

Apesar de não observarmos o consumo de glicose ou xilose pela levedura DGLK1-851 nas fermentações com alta densidade celular, a expressão do gene 851 foi detectada por RT-PCR. Dessa forma, problemas na tradução do mRNA ou no enovelamento da proteína podem afetar a função da proteína. Outro fator é a localização errônea da proteína na célula, devido a problemas no seu tráfego para a membrana ou regulação pós traducional (Horák, 2013). Para verificar se a proteína em questão está sendo produzida, a técnica de Western Blotting poderia ser empregada.

A levedura *S. cerevisiae* possui vias endógenas de regulação pós-traducional de transportadores. Essas vias são desencadeadas pela presença ou ausência de glicose no meio, o que ocasiona a ubiquitinação de resíduos de lisina nas porções citosólicas N e C-terminal de transportadores de açúcar na membrana, sinalizando a internalização e degradação dessas proteínas no vacúolo (Horák, 2013). Knychala e colaboradores (2022), demonstraram que a expressão do gene *SpXUT1* de *S. passalidarum* não permitiu a levedura *S. cerevisiae* DGLK1 crescer em vários monossacarídeos avaliados. No entanto, a versão truncada da proteína *SpXUT1*, com remoção das lisinas que possivelmente são ubiquitinadas da região C terminal, permitiu o crescimento e fermentação da linhagem em meio contendo glicose ou xilose. Outros estudos também identificaram que a região C terminal de transportadores heterólogos desempenha importante papel na funcionalidade em *S. cerevisiae*. A retirada de 16 resíduos de aminoácidos da parte C terminal do transportador Stp1 do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* melhorou sua capacidade de transporte de glicose (Zhang et al., 2017). O transportador CDT-2 de *Neurospora crassa*, após a retirada de resíduos de lisina da região C-terminal, resultou em maior localização na membrana e menor no vacúolo de *S. cerevisiae*, melhorando o transporte de celobiose (Sen et al., 2016).

Além da utilização de transportadores heterólogos, a engenharia de transportadores endógenos (HXT) para melhorar o transporte de xilose em *S.*

*Cerevisiae* é promissora para a produção do etanol 2G (Gonçalves et al., 2014; Nijland et al., 2016). No entanto, esses transportadores com alta capacidade de transporte de xilose permanecem sujeitos à regulação pós-traducional por glicose. Nijland e colaboradores (2016) mostraram que a mutação de resíduos de lisina da porção N-terminal do transportador endógeno Hxt1 aumentou a estabilidade dessa proteína na membrana e a fermentação de xilose pela levedura. A predição de lisinas passíveis de serem ubiquitinadas na proteína 851 revelou a presença de resíduos desse aminoácido nas porções N e C terminais da proteína. Assim, é possível que essa proteína esteja sendo regulada a nível pós-traducional e direcionada à degradação, e por isso, o consumo efetivo dos açúcares glicose e xilose por DGLK1-851 não tenha sido observado. A verificação da localização subcelular do alvo 851 poderia ser feita através da fusão dessa proteína à molécula de GFP (*green fluorescent protein*) e posterior análise por microscopia de fluorescência.

As análises do *docking* mostraram que a glicose tem maior afinidade de ligação ao transportador 851, comparado à xilose. Isso demonstra que um dos motivos do consumo sequencial de glicose e xilose por *S. passalidarum* é devido a inibição competitiva. A inibição competitiva ocorre quando mais de um açúcar se liga ao transportador, porém com afinidades diferentes, e consequentemente o açúcar com maior afinidade será transportado primeiro (Farwick et al., 2014). É possível que *S. passalidarum* não possui transportadores exclusivos de xilose. Dois exemplos citados neste trabalho são das proteínas 521 e 851. Neste trabalho demonstramos que o transportador 521 possui expressão induzida em xilose, no entanto, foi demonstrado por Knychala e colaboradores (2022) que essa proteína transporta xilose e glicose. Da mesma maneira, a proteína 851 é induzida por xilose, mas não transporta apenas essa pentose. Juntamente com os dados de fisiologia de consumo desses açúcares (Ribeiro et al., 2021), é possível sugerir que o transporte de glicose e xilose em *S. passalidarum* é realizado pelo mesmo transportador.

Na cofermentação de glicose e xilose, a glicose é consumida primeiro por ter maior afinidade de ligação ao transportador (Ribeiro et al., 2021). Da mesma forma, no cultivo com glicose e 2DG, glicose é primeiramente internalizada, por possuir menor energia de ligação comparada a 2DG (Ribeiro et al., 2021). No entanto, no cultivo com xilose e 2DG, a competição entre esses ligantes é maior, visto que possuem a mesma energia de ligação. Neste caso, *S. passalidarum* não consumiu nenhum dos açúcares nas 8 primeiras horas de cultivo, provavelmente devido a

competição de xilose e 2DG pelo transportador. Após esse período, a xilose foi internalizada e houve a internalização de 2DG, pois sua concentração extracelular diminuiu pela metade. No entanto a 2DG não foi capaz de impedir o crescimento da célula, pois a levedura utilizou a xilose como fonte de carbono e energia (Ribeiro et al., 2021). Assim, mais uma vez, demonstramos que 2DG não é uma molécula ideal para avaliar a repressão clássica por glicose em *S. passalidarum*, devido ao seu efeito extracelular.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a proteína 851 é um transportador funcional de *S. passalidarum*, pois quando foi expressa em *S. cerevisiae* DGLK1 permitiu o consumo de xilose e glicose em meio sólido. No entanto, não foi possível quantificar o consumo desses açúcares, visto que em fermentações com alta densidade celular a linhagem DGLK1-851 não consumiu glicose ou xilose. Dessa forma, otimizações no cultivo da linhagem ou avaliação da regulação pós-traducional precisam ser realizadas para uma melhor caracterização funcional. Por fim, sugerimos que a principal forma de influência da glicose no transporte de xilose é através da inibição do transporte de xilose pela glicose devido às diferentes afinidades de ligação desses substratos ao transportador putativo 851.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- Os rendimentos e produtividades de etanol por *Spathaspora passalidarum* não foram afetados negativamente durante a cofermentação de glicose e xilose, em comparação à fermentação de xilose, nas condições avaliadas;
- A glicose inibe o consumo de xilose por *S. passalidarum* independente da sua concentração extracelular;
- Os genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR), xilose desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK) foram menos expressos quando glicose estava presente no meio;
- As atividades específicas das enzimas XR, XDH e XK foram menores na presença de glicose;
- O análogo de glicose 2-deoxiglicose (2DG) não inibiu o crescimento de *S. passalidarum* em meio de cultura contendo xilose como única fonte de carbono, e interfere no transporte de xilose para o interior celular;
- O perfil de expressão dos genes que codificam os potenciais transportadores durante a cofermentação, sugere que essa levedura possui vias de detecção e regulação transcricional de transportadores de açúcares;
- A estrutura proteica do transportador 851 é característica de um transportador de açúcar, e sua caracterização sugere que essa proteína é um transportador funcional em *S. passalidarum*;
- As análises de *docking* mostraram que a glicose tem maior afinidade de ligação ao transportador 851, comparado à xilose e 2DG;
- Os resultados em conjunto sugerem que a glicose interfere no metabolismo de xilose de duas maneiras: (1) inibe o transporte de xilose, por meio da competição pelo mesmo transportador e (2) controla, por mecanismos ainda desconhecido, a expressão dos genes que codificam os transportadores de açúcares e as principais enzimas do metabolismo da xilose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, R.J., Weng, Z., Campbell, R.K., Jiang, X., 2005. Main-chain conformational tendencies of amino acids. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 60, 679–689. <https://doi.org/10.1002/prot.20530>
- Anjos, J., Rodrigues, H., Sousa, D., Roca, C., Cássio, F., Luttk, M., Pronk, J.T., Salema-oom, M., Gonçalves, P., 2013. Fsy1 , the sole hexose-proton transporter characterized in *Saccharomyces* yeasts , exhibits a variable fructose: H + stoichiometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.08.011>
- Baruffini, E., Goffrini, P., Donnini, C., Lodi, T., 2006. Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast* <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00107.x>
- Boles, E., Hollenberg, C.P., 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 85–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00052-1)
- Bonan, C.I.D.G., Biazi, L.E., Dionísio, S.R., Soares, L.B., Tramontina, R., Sousa, A.S., Oliveira, C.A. De, Aline, F., Jaciane, C.C., 2020. Redox potential as a key parameter for monitoring and optimization of xylose fermentation with yeast *Spathaspora passalidarum* under limited oxygen conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02344-2>
- Brink, D.P., Borgström, C., Persson, V.C., Osiro, K.O., Gorwa-grauslund, M.F., 2021. D-Xylose Sensing in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights from D-Glucose Signaling and Native D-Xylose Utilizers *International Journal of Molecular Sciences*, 22,12410. <https://doi.org/10.3390/ijms222212410>
- Brown, V., Sexton, J.A., Johnston, M., 2006. A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 5, 1726–1737. <https://doi.org/10.1128/EC.00186-06>
- Cadete, R.M., De Las Heras, A.M., Sandström, A.G., Ferreira, C., Gírio, F., Gorwa-Grauslund, M.F., Rosa, C.A., Fonseca, C., 2016. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0570-6>
- Cadete, R.M., Melo, M.A., Dussán, K.J., Rodrigues, R.C.L.B., Silva, S.S., Zilli, J.E.,

- Vital, M.J.S., Gomes, F.C.O., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2012. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043135>
- Cadete, R.M., Rosa, C.A., 2018. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast* 35, 191–199. <https://doi.org/10.1002/yea.3279>
- Campos, V.J., Ribeiro, L.E., Albuini, F.M., de Castro, A.G., Fontes, P.P., da Silveira, W.B., Rosa, C.A., Fietto, L.G., 2022. Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00693-6>
- Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M., Fukuhara, H., 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and General Genetics MGG* 233, 97–105. <https://doi.org/10.1007/bf00587566>
- Colabardini, A.C., Nicolas, L., Ries, A., Brown, N.A., Fernanda, T., Savoldi, M., Goldman, M.H.S., Menino, J.F., Rodrigues, F., Goldman, G.H., 2014. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans* 1–19. *Biotechnology for Biofuels* 2014, 7:46 <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/46>
- Colovos, C., Yeates, T.O., 1993. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* 2, 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., Thevelein, J.M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Dietvorst, J., Karhumaa, Kaisa, Brandt-Kielland C., M., Brandt, A., 2010. Amino acid residues involved in ligand preference of the Snf3 transporter-like sensor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 191–198. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Diezemann, A., Boles, E., 2003. Functional characterization of the Frt1 sugar transporter and of fructose uptake in *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics* 43, 281–288. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0392-5>
- Dos Reis, F.T., Menino, J.F., Leite, V., Bom, P., Brown, N.A., Colabardini, C., Savoldi,

- M., Goldman, M.H.S., Rodrigues, F., 2013. Identification of Glucose Transporters in *Aspergillus nidulans*. PLOS ONE. 8, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081412>
- Dos Santos, L.V., De Barros Grassi, M.C., Gallardo, J.C.M., Pirolla, R.A.S., Calderón, L.L., De Carvalho-Netto, O.V., Parreiras, L.S., Camargo, E.L.O., Drezza, A.L., Missawa, S.K., Teixeira, G.S., Lunardi, I., Bressiani, J., Pereira, G.A.G., 2016. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. *Industrial Biotechnology* 12, 40–57. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0017>
- Du, C., Li, Y., Zhao, X., Pei, X., Yuan, W., Bai, F., Jiang, Y., 2019. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 2845–2855. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09625-1>
- Du, J., Li, S., Zhao, H., 2010. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. *Molecular BioSystems* 6, 2150–2156. <https://doi.org/10.1039/c0mb00007h>
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R.M., Albers, E., Snoep, J.L., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L., 2004. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5323–5330. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5323-5330.2004>
- Fan, J., Chaturvedi, V., Shen, S.H., 2002. Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *Journal of Molecular Evolution* 55, 336–346. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2330-4>
- Farwick, A., Bruder, S., Schadeweg, V., Oreb, M., Boles, E., 2014. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5159–5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323464111>
- Ferreira, C., Voorst, F. Van, Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-brandt, M.C., Lucas, C., Brandt, A., 2005. A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol / H<sup>+</sup> Symporter in *Saccharomyces cerevisiae* *Molecular Biology of the Cell*. 16, 2068–2076. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Ferreira, D., Nobre, A., Silva, M.L., Faria-Oliveira, F., Tulha, J., Ferreira, C., Lucas, C., 2013. XYLH encodes a xylose/H<sup>+</sup> symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 13,



- 585–596. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12061>
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L.L., Tate, J., Punta, M., 2014. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research* 42, 222–230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2, 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Gonçalves, D.L., Matsushika, A., de Sales, B.B., Goshima, T., Bon, E.P.S., Stambuk, B.U., 2014. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme and Microbial Technology* 63, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.003>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 937–953. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>
- Harner, N.K., Wen, X., Bajwa, P.K., Austin, G.D., Ho, C.Y., Habash, M.B., Trevors, J.T., Lee, H., 2015. Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1535-z>
- Horák, J., 2013. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Current genetics* 59, 1–31. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0388-8>
- Hou, X., 2012. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 205–214. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3694-4>
- Hua, Y., Wang, J., Zhu, Y., Zhang, B., Kong, X., Li, W., Wang, D., Hong, J., 2019. Release of glucose repression on xylose utilization in *Kluyveromyces marxianus* to enhance glucose-xylose co-utilization and xylitol production from corncob hydrolysate. *Microbial Cell Factories* 18, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1068-2>
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.S., Passoth, V., Richardson, P.M., 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting

- and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology* 25, 319–326. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6, 10. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/16>
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
- Kim, S.R., Ha, S.J., Wei, N., Oh, E.J., Jin, Y.S., 2012. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: A promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology* 30, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.005>
- Knychala, M.M., Santos, A.A., Kretzer, L.G., Gelsleichter, F., Jos, M., Fonseca, C., Stambuk, B.U., 2022. Strategies for Efficient Expression of Heterologous Monosaccharide Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal. Fungi*, 8, 84. <https://doi.org/10.3390/jof8010084>
- Krieger, E., Vriend, G., 2014. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30, 2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26, 283–291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- Leandro, M.J., Fonseca, C., Gonçalves, P., 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. *FEMS Yeast Research* 9, 511–525. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x>
- Leandro, M.J., Gonçalves, P., Spencer-Martins, I., 2006. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: First molecular characterization of a yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. *Biochemical Journal* 395, 543–549. <https://doi.org/10.1042/BJ20051465>
- Li, J., Lin, L., Li, H., Tian, C., Ma, Y., 2014. Transcriptional comparison of the

- filamentous fungus *Neurospora crassa* growing on three major monosaccharides D-glucose, D-xylose and L-arabinose. *Biotechnology for Biofuels* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-31>
- Lima, D.A., Lira, R., Luna, N.D.E., Martín, C., Gouveia, E.R., 2015. Comparison of bioethanol production from acid hydrolysates of waste office paper using *Saccharomyces*. *Cellulose Chemistry and Technology* 49, 463–469.
- Long, T.M., Su, Y.K., Headman, J., Higbee, A., Willis, L.B., Jeffries, T.W., 2012. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5492–5500. <https://doi.org/10.1128/AEM.00374-12>
- Martinez-jimenez, F.D., Neitzel, T., Biazi, L.E., Pereira, I.O., Vieira, L., Carvalho, A., Ienczak, J.L., 2021. Exploiting the Non-conventional Yeast *Spathaspora passalidarum* as a Platform for Hemicellulosic Hydrolysate Conversion into Bioproducts: a Mini Review. *BioEnergy Research* 14, 689–708. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10257-5>
- Moon, J., Lewis Liu, Z., Ma, M., Slininger, P.J., 2013. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.005>
- Moysés, D.N., Reis, V.C.B., de Almeida, J.R.M., de Moraes, L.M.P., Torres, F.A.G., 2016. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- Nguyen, N.H., Suh, S.O., Marshall, C.J., Blackwell, M., 2006. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycological Research* 110, 1232–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.002>
- Nijland, J.G., Vos, E., Shin, H.Y., De Waal, P.P., Klaassen, P., Driessen, A.J.M., 2016. Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0573-3>

- Nurcholis, M., Nitiyon, S., Suprayogi, Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Limtong, S., Kosaka, T., Yamada, M., 2019. Functional analysis of Mig1 and Rag5 as expressional regulators in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 395–410. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9462-y>
- Ochoa-Chacón, A., Martínez, A., Poggi-Varaldo, H.M., Villa-Tanaca, L., Ramos-Valdivia, A.C., Ponce-Noyola, T., 2021. Xylose Metabolism in Bioethanol Production: *Saccharomyces cerevisiae* vs *Non-Saccharomyces* Yeasts. *Bioenergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>
- Pontius, J., Richelle, J., Wodak, S.J., 1996. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *Journal of Molecular Biology* 264, 121–136. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0628>
- Potter, S.C., Luciani, A., Eddy, S.R., Park, Y., Lopez, R., Finn, R.D., 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46, W200–W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>
- Reifenberger, E., Freidel, K., Ciriacy, M., 1995. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Molecular Microbiology* 16, 157–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02400.x>
- Ribeiro, L.E., Albuini, F.M., Castro, A.G., Campos, V.J., Souza, G.B. De, Mendonça, G.P., Rosa, C.A., Mendes, T.A.O., Santana, M.F., Wendel, B., Fietto, L.G., 2021. Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*. 157, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>
- Rødkær, S. V., Færgeman, N.J., 2014. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 14, 683–696. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12157>
- Rodrussamee, N., Sattayawat, P., Yamada, M., 2018. Highly efficient conversion of xylose to ethanol without glucose repression by newly isolated thermotolerant *Spathaspora passalidarum* CMUWF1-2. *BMC Microbiology* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1218-4>
- Santangelo, G.M., 2006. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 253–282. <https://doi.org/10.1128/mnbr.70.1.253-282.2006>

- Seatter, M.J., Rue, S.A.D. La, Porter, L.M., Gould, G.W., 1998. QLS Motif in Transmembrane Helix VII of the Glucose Transporter Family Interacts with the C-1 Position of D -Glucose and Is Involved in Substrate Selection at the Exofacial Binding Site. *Biochemistry*, 37, 1322–1326.
- Sedlak, M., Ho, N.W.Y., 2004. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *YEAST* 671–684. <https://doi.org/10.1002/yea.1060>
- Selim, K.A., Easa, S.M., El-diwany, A.I., 2020. The Xylose Metabolizing Yeast *Spathaspora passalidarum* is a Promising Genetic Treasure for Improving Bioethanol Production. *Fermentation*.1–12. <https://doi:10.3390/fermentation6010033>
- Sen, A., Acosta-Sampson, L., Alvaro, C.G., Ahn, J.S., Cate, J.H.D., Thorner, J., 2016. Internalization of heterologous sugar transporters by endogenous  $\alpha$ -arrestins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 7074–7085. <https://doi.org/10.1128/AEM.02148-16>
- Sharma, B., Larroche, C., Dussap, C.G., 2020. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource Technology* 313, 123630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>
- Sloothaak, J., Tamayo-Ramos, J.A., Odoni, D.I., Laothanachareon, T., Derntl, C., Mach-Aigner, A.R., Martins Dos Santos, V.A.P., Schaap, P.J., 2016. Identification and functional characterization of novel xylose transporters from the cell factories *Aspergillus Niger* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0564-4>
- Soares, L.B., Bonan, C.I.D.G., Biazzi, L.E., Dionísio, S.R., Bonatelli, M.L., Andrade, A.L.D., Renzano, E.C., Costa, A.C., Ienczak, J.L., 2020. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. *Biomass and Bioenergy* 137, 105549. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105549>
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P. de S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Silva Bon, E.P. da, Moraes, L.M.P. de, Araújo, J. de A., Torres, F.A.G., 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology* 101, 4820–4825. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>

- Subtil, T., Boles, E., 2011. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotechnology for Biofuels*. 4, 38.
- Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y., Yan, N., 2012. Crystal structure of a bacterial homologue. *Nature* 490, 361–366. <https://doi.org/10.1038/nature11524>
- Suprayogi, Nguyen, M.T., Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Limtong, S., Kosaka, T., Yamada, M., 2015. A *Kluyveromyces marxianus* 2-deoxyglucose-resistant mutant with enhanced activity of xylose utilization. *International Microbiology* 18, 235–244. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.255>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *Journal of Computational Chemistry* 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>. AutoDock
- van Maris, A.J.A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A.H., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 90, 391–418. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7>
- Veras, H.C.T., Parachin, N.S., Almeida, J.R.M., 2017. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories* 16, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0766-x>
- Verho, R., Penttilä, M., Richard, P., 2011. Cloning of Two Genes ( LAT1 , 2 ) Encoding Specific L -Arabinose Transporters of the L -Arabinose Fermenting Yeast *Ambrosiozyma monospora* 604–611. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9161-y>
- Wang, M., Yu, C., Zhao, H., 2016. Identification of an Important Motif That Controls the Activity and Specificity of Sugar Transporters. *Biotechnology and Bioengineering*. 113, 1460–1467. <https://doi.org/10.1002/bit.25926>
- Weierstall, T., Hollenberg, C.P., Boles, E., 1999. Cloning and characterization of three genes ( SUT1 – 3 ) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Molecular Microbiology*. 31, 871–883.

- Weirich, J., Goffrini, P., Kuger, P., Ferrero, I., Breunig, K.D., 1997. Influence of mutations in hexose-transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Biochemistry* 249, 248–257. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00248.x>
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P., Boles, E., 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464, 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01698-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01698-1)
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* 35, 407–410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Wohlbach, D.J., Kuo, A., Sato, T.K., Potts, K.M., Salamov, A.A., LaButti, K.M., Sun, H., Clum, A., Pangilinan, J.L., Lindquist, E.A., Lucas, S., Lapidus, A., Jin, M., Gunawan, C., Balan, V., Dale, B.E., Jeffries, T.W., Zinkel, R., Barry, K.W., Grigoriev, I. V., Gasch, A.P., 2011. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13212–13217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103039108>
- Xie, X., Wilkinson, H.H., Correa, A., Lewis, Z.A., Bell-pedersen, D., Ebbole, D.J., 2004. Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 41, 1104–1119. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.009>
- Young, E., Poucher, A., Comer, A., Bailey, A., Alper, H., 2011. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 3311–3319. <https://doi.org/10.1128/AEM.02651-10>
- Young, E.M., Tong, A., Bui, H., Spofford, C., Alper, H.S., 2014. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111, 131-136. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311970111>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

Zhang, W., Cao, Y., Chen, G., Liu, W., 2017. Identification of the structural determinants for efficient glucose transport via segment swapping between two fungal glucose transporters. *RSC Advances* 7, 25109–25117. <https://doi.org/10.1039/c7ra01095h>



## APÊNDICE

**Tabela 1:** Código de acesso das sequências de proteínas transportadoras utilizadas na ferramenta BLASTp.

<b>Proteína</b>	<b>Função</b>	<b>Levedura</b>	<b>Código de Acesso</b>
SUT1	Hexose transporter	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	XP_001387898.1
SUT2	Sugar uptake (tentative)		XP_001384295.2
SUT3	Sugar uptake (tentative)		XP_001386019.2
SUT4	Sugar transporter protein		XP_001387246.2
XUT1	Putative high-affinity sugar transporter		XP_001385583.1
XUT2	Sugar transporter		XP_001387242.2
XUT3	Putative sugar transporter		XP_001387138.1
XUT4	Putative high-affinity xylose transporter ( <i>HGT3</i> )		XP_001386715.1
XUT5	Putative xylose transporter		XP_001385962.2
XUT6			XP_001386589.1
XUT7	High-affinity xylose transporter, similar to STL13		XP_001387067.1
AUT1	Arabinose-proton symporter (arabinose transporter)		XP_001382352.1
FUC1	l-Fucose permease (galactose transporter)		XP_001384633.1
HGT1	High-affinity glucose transporter		XP_001386897.2
HGT2	Putative high-affinity glucose transporter		XP_001382755.2
HXT2.1	Hexose transporter (tentative)		XP_001386873.2
HXT2.3	Possible hexose transporter		XP_001382754.1
HXT2.4	Possible hexose transporter		XP_001387757.1
HXT2.5	Possible hexose transporter		XP_001385684.1
HXT2.6	Hexose transporter		XP_001384653.2
HXT4	Fructose symporter		XP_001385662.1
Lac1	Lactose permease		XP_001383110.1
Lac2	Lactose permease		XP_001387231.2
Lac3	Putative lactose permease		XP_001383677.2
MAL1	Maltose permease		XP_001382383.1
MAL2	Maltose permease		XP_001385023.1
MAL3	Maltose permease		XP_001385693.1
MAL4	Maltose permease		XP_001385456.1
MAL5	Maltose permease		XP_001385340.2
MFS5	Hexose transporter		XP_001383911.2

QUP2	High-affinity hexose (glucose) transporter ( <i>HXT1</i> )		XP_001386086.1
RGT2	Glucose transporter/sensor		XP_001386588.1
SNF3	High-affinity glucose transporter		XP_001386416.2
STL1	Sugar transporter		XP_001383774.1
YBR1	General substrate transporter		XP_001383306.2
YBR2	Hexose transporter of the major facilitator superfamily		XP_001382859.2
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Hxt1	Hexose transporter HXT1		HXT1 / YHR094C
Hxt2			HXT2 / YMR011W
Hxt3			HXT3 / YDR345C
Hxt4			HXT4 / YHR092C
Hxt5			HXT5 / YHR096C
Hxt6			HXT6 / YDR343C
Hxt7			HXT7 / YDR342C
Hxt8			HXT8 / YJL214W
Hxt9			HXT9 / YJL219W
Hxt10			HXT10 / YFL011W
Hxt11			HXT11 / YOL156W
Hxt13			HXT13 / YEL069C
Hxt14			HXT14 / YNL318C
Hxt15			HXT15 / YDL245C
Hxt16			HXT16 / YJR158W
Hxt17			HXT17 / YNR072W
MAL11			MAL11 / YGR289C
MAL31			MAL31 / YBR298C
MPH2			MPH2 / YDL247W
MPH3			MPH3 / YJR160C
Gal2			GAL2 / YLR081W
Snf3			SNF3 / YDL194W
Rgt2			RGT2 / YDL138W

**Tabela 2:** Proteínas transportadoras de açúcar funcionalmente caracterizadas

Proteína	Código de Acesso NCBI	Microrganismo	Referência
Xyp29	ABN68560	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Du et al., 2010
An25	EAA35128	<i>Neurospora crassa</i>	Du et al., 2010

XUT1	XP_001385583.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Young et al., 2011
XUT3	XP_001387138.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Young, et al. 2011
SUT1	XP_001387898.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Weierstall et al., 1999
SUT2	XP_001384295.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Weierstall et al., 1999
SUT3	XP_001386019.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Weierstall et al., 1999
SUT4	XP_001387246.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Moon et al., 2013
RGT2	XP_001386588.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Moon et al., 2013
GXF1	CAI77652.1	<i>Candida intermedia</i>	Leandro et al., 2006
GXS1	CAI44932.1	<i>Candida intermedia</i>	Leandro et al., 2006
HXT1	YHR094C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sedlak e Ho, 2004
HXT2	YMR011W	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sedlak e Ho, 2004
HXT4	YHR092C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sedlak e Ho, 2004
HXT5	YHR096C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sedlak e Ho, 2004
HXT7	YDR342C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sedlak e Ho, 2004
GAL2	YLR081W	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sedlak e Ho, 2004
AN1797 (HXTB)	EAA63973.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	Dos Reis et al., 2013
AN10891 (HXTC)	CBF79090.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	Dos Reis et al, 2013
AN8737 (HXTD)	EAA60286.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	Dos Reis et al., 2013
AN6669 (HXTE)	EAA58198.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	Dos Reis et al., 2013
AN0250(xtrD)	EAA66123.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	Colabardini et al., 2014
LAT1	AY923868	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	Verho et al., 2011
LAT2	AY923869	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	Verho et al, 2011
AraT	XP_001382755.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Subtil and Boles, 2011
HGT1	XP_958069.2	<i>Neurospora crassa</i>	Xie et al., 2004
XAT-1	XP_961039.2	<i>Neurospora crassa</i>	Li et al., 2014
XYT-1	XP_960171.3	<i>Neurospora crassa</i>	Li et al, 2014

STL1	YDR536W	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ferreira et al., 2005
XylH	AY347871.2	<i>Debaryomyces fabryi</i>	Ferreira et al., 2013
XItA		<i>Aspergillus niger</i>	Sloothaak et al., 2016
XItB		<i>Aspergillus niger</i>	Sloothaak et al., 2016
XItC		<i>Aspergillus niger</i>	Sloothaak et al., 2016
Fsy1	CAC08232.1	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Anjos et al., 2013
HGT1		<i>Kluyveromyces lactis</i>	Baruffini et al., 2006
MAL	MAL31 / YBR298C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
LAC12	UniProtKB - P07921 (LACP_KLULA)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	