



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULO EMILIO DOS SANTOS COSTA

Engenharia metabólica e evolução de *Saccharomyces cerevisiae* visando a fermentação de arabinose e xilose

CAMPINAS

2022

PAULO EMILIO DOS SANTOS COSTA

**Engenharia metabólica e evolução de *Saccharomyces cerevisiae*
visando a fermentação de arabinose e xilose**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Microrganismos.

Orientador: Dr. LEANDRO VIEIRA DOS SANTOS

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO PAULO EMÍLIO DOS SANTOS
COSTA E ORIENTADA PELO LEANDRO VIEIRA
DOS SANTOS.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823e Costa, Paulo Emilio dos Santos, 1994-
Engenharia metabólica e evolução de *Saccharomyces cerevisiae* visando a fermentação de arabinose e xilose / Paulo Emilio dos Santos Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Leandro Vieira dos Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Engenharia metabólica. 3. Evolução. 4. Fermentação de pentoses. I. Santos, Leandro Vieira dos, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Metabolic engineering and evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for arabinose and xylose fermentation

Palavras-chave em inglês:

Saccharomyces cerevisiae

Metabolic engineering

Evolution

Pentoses fermentation

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Leandro Vieira dos Santos [Orientador]

Thamy Livia Ribeiro Corrêa

Ana Paula Jacobus

Data de defesa: 20-04-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1873-1664>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9501797911207099>

Campinas, 20/04/2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leandro Vieira dos Santos

Prof^a. Dra. Thamy Livia Ribeiro Corrêa

Prof^a. Dra. Ana Paula Jacobus

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar presente na minha vida, me fortalecendo e iluminando todos os dias.

A toda minha família, em especial minha mãe Ana Mary dos Santos e minha bisavó Adalgisa Francisca Rosa, que sempre me guiaram para a virtude, fornecendo as bases da minha educação. Também sou grato aos meus irmãos, Carlos Henrique, José David e Maria Rebeca, por toda união e apoio.

Ao Dr. Leandro Vieira dos Santos, pela paciência e por estar sempre presente durante esta jornada, por sempre me incentivar a crescer, me apoiar e acreditar no meu potencial. Sou grato por aceitar a me orientar e por todas as conversas e ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas de grupo, Nat, João, Gisele, Davi, Ícaro, Lara, Beatriz, Ludimila e Thiago. A Bruno, Aline, Ellen e Thamy por todo companheirismo, pela força, pelos ensinamentos, piqueniques e madrugadas fermentando. Vocês são fonte de inspiração, como pessoas e profissionais. Ao Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), pela estrutura, congressos e eventos que contribuíram para meu crescimento profissional.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2019/06942-4, pelo bolsa e auxílio técnico que foram imprescindíveis para realização do presente trabalho.

*Algumas ilustrações desse trabalho utilizaram o software Biorender.

Resumo

O uso da biomassa vegetal para a produção sustentável de bioprodutos é uma alternativa promissora para reduzir o uso de fontes fósseis e mitigar os impactos ambientais decorrentes do seu consumo. Contudo, a limitação metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em consumir os açúcares de cinco carbonos (C5) da biomassa, como as pentoses xilose e arabinose, é um dos principais gargalos que inviabilizam economicamente a produção. O emprego de abordagens racionais associadas a estratégias de evolução adaptativa permite a identificação de novos metabolismos e alvos genéticos que podem potencializar o consumo dessas pentoses. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a construção de uma cepa industrial fermentadora de arabinose e xilose, bem como a identificação de bases genéticas fixadas durante procedimentos de evolução adaptativa e responsáveis por otimizar a conversão de C5. Inicialmente, cassetes de expressão gênica contendo a via metabólica de conversão de arabinose foram construídos utilizando abordagens de biologia sintética, e estavelmente integrados no genoma de uma cepa industrial fermentadora de xilose, dando origem a linhagem base PEY-AX5. Somente com o design racional, a linhagem construída não era capaz de crescer em arabinose como fonte única de carbono. Estratégias de evolução adaptativa foram aplicadas e após 65 e 190 gerações foi observado um rápido crescimento em meio contendo arabinose. A população foi capaz de fermentar a totalidade da arabinose, alcançando um rendimento de conversão de 0,42 g etanol/ g arabinose. Também foi observado o co-consumo de xilose e arabinose em fermentações contendo a mistura dos açúcares. O sequenciamento genômico será realizado nas populações evoluídas para a identificação de SNPs e CNVs fixados nas populações durante a evolução e associados com o aumento da capacidade fermentativa de arabinose.

Em um projeto paralelo, foram avaliados o efeito de duas mutações benéficas para a conversão de xilose. Os genes avaliados foram *ZWF1*, envolvido na fase oxidativa da via das pentoses fosfato, e o gene *CLN3*, importante ciclina do ciclo celular, além de interações epistáticas com o gene *ISU1*, envolvido na formação de clusters Fe-S. Mutantes *knockout* e com a inserção de SNPs foram introduzidos em uma cepa fermentadora de xilose usando o sistema CRISPR-Cas9. Os ensaios fermentativos demonstraram efeitos positivos na deleção dos genes, além de interação

positiva entre os genes *ZWF1* e *ISU1*, com o mutante duplo consumindo 50 g/L de xilose em menos de 32 horas e rendimento de 0,47 g de etanol/ g xilose.

Com os resultados gerados no presente trabalho, conseguimos desenvolver leveduras capazes de consumir de forma eficiente a L-arabinose, além de promover o co-consumo dos açúcares C5. Após sequenciamento genômico, seremos capazes de identificar novos alvos e metabolismos responsáveis pela eficiente conversão de pentoses. Por fim, validamos os genes *ZWF1* e *CLN3* como novos alvos com potencial biotecnológico para conversão de xilose. O conjunto das mutações identificadas pode ser utilizado em abordagens racionais de engenharia metabólica, desenvolvendo plataformas microbianas eficientes visando a conversão de resíduos agroindustriais em bioprodutos.

Abstract

The use of plant biomass for the sustainable production of bioproducts is a promising alternative to reduce the use of fossil sources and mitigate the environmental impacts resulting from their consumption. However, the metabolic limitation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in consuming the five-carbon (C5) sugars derived from plant biomass, such as the pentoses xylose and arabinose, is one of the main bottlenecks for an economically feasible production of lignocellulose-based products. The rational microbial design associated with adaptive evolution strategies allowed the identification of novel metabolisms and genetic targets that boost the consumption of these pentoses. In this context, the goal of the present work is the construction of an industrial yeast arabinose and xylose-fermenting strain, as well as the identification of genetic bases fixed during adaptive evolution strategies and responsible for optimizing the conversion of C5. Initially, gene expression cassettes containing the arabinose metabolic pathway were designed and constructed using synthetic biology approaches, and stably integrated into the genome of an industrial xylose-fermenting strain, resulting in the yeast cell PEY-AX5. The initial strain was not able to grow on arabinose as the sole source of carbon. Adaptive evolution strategies were applied and after 65 and 190 generations, rapid growth was observed in medium containing arabinose. The population was able to completely ferment the arabinose, reaching a conversion yield of 0.42 g ethanol/g arabinose. Co-consumption of xylose and arabinose was also observed in fermentations containing the mixture of sugars. Genomic sequencing will be performed on evolved populations to identify SNPs and CNVs fixed in populations during evolution and associated with the increased arabinose fermentative capacity.

In a parallel project, the effect of two beneficial mutations on xylose conversion was evaluated. The genes evaluated were *ZWF1*, involved in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway, and the *CLN3* gene, an important cyclin in the cell cycle, in addition to epistatic interactions with the *ISU1* gene, involved in the assembling of Fe-S clusters. Gene deletions and SNPs were introduced into a xylose-fermenting strain using the CRISPR-Cas9 system. Fermentation assays showed positive effects on gene deletion, in addition to a positive interaction between the *ZWF1* and *ISU1* genes, with the double mutant consuming 50 g/L of xylose in less than 32 hours and yielding 0.47 g of ethanol/g of xylose.

With the results produced in the present work, we were able to develop yeasts capable of efficiently consuming L-arabinose, in addition to promoting the co-consumption of C5 sugars. After genomic sequencing, we will be able to identify novel targets and metabolisms responsible for the efficient conversion of pentoses. Finally, we were able to validate the *ZWF1* and *CLN3* genes as new targets with biotechnological potential for xylose conversion. The set of mutations identified can be used in rational metabolic engineering approaches, designing efficient microbial platforms to convert agro-industrial residues into renewable bioproducts.

Sumário

1. Introdução Geral.....	11
1.1. Cenário global.....	11
1.2. Biomassa lignocelulósica.....	12
1.3. Engenharia metabólica de <i>S. cerevisiae</i> para o consumo de xilose e arabinose.....	14
Capítulo 1	
Engenharia metabólica e evolução de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fermentadoras de arabinose.....	20
Capítulo 2	
Interações epistáticas entre <i>ZWF1</i>, <i>CLN3</i> e clusteres de Fe-S otimizam taxas de fermentação de xilose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	45
Referências.....	66
Anexo I – Declaração de Bioética/Biossegurança.....	84

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Cenário global

O petróleo é uma matéria-prima muito versátil devido a infinidade de produtos que podem ser fabricados a partir dele, como: diferentes tipos de plásticos, lubrificantes, solventes, compostos usados na formulação de cosméticos e combustíveis como diesel, gasolina e querosene, também conhecidos como combustíveis fósseis. No entanto, a indústria petroquímica é baseada em uma fonte não renovável, não sustentável, que gera diversos prejuízos ao meio ambiente, que vão desde a poluição do ar devido a queima de combustíveis à poluição de mares e oceanos com plásticos que não são biodegradáveis (Jin et al., 2015; Turner et al., 2016).

Cerca de 80 a 95% do petróleo obtido pelas refinarias são destinados à produção de combustíveis líquidos e geração de energia (Jin et al., 2015; Sauer et al., 2008). A queima desses combustíveis lança na atmosfera gases causadores do efeito estufa (GHG), sendo o principal deles o dióxido de carbono (CO_2), associado ao aumento da temperatura do planeta nas últimas décadas (Suresh et al., 2011; Rosen, 2018) (Figura 1).

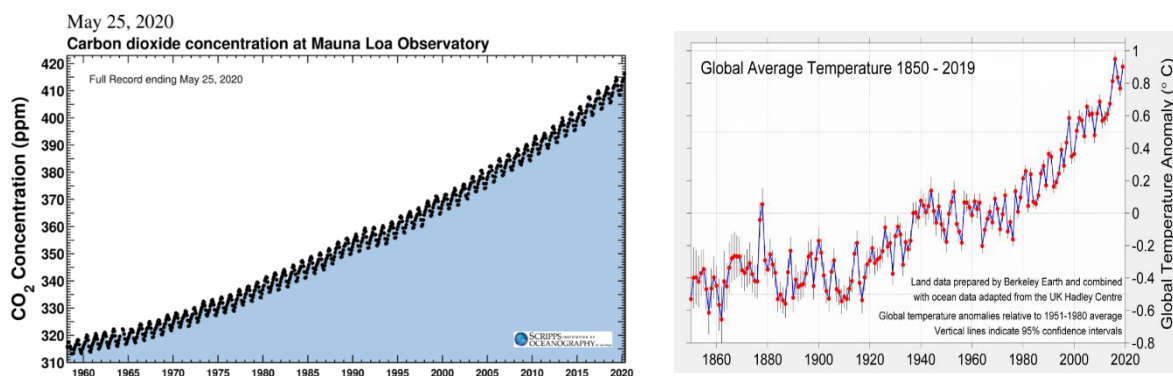


Figura 1: Gráficos da correlação entre aumento da concentração de CO_2 na atmosfera (A) e a o aumento da temperatura global (B) (Scripps Institution of Oceanography, 2020 e <http://www.berkeleyearth.org.html>).

As mudanças climáticas atingem todo o planeta, comprometendo a estabilidade dos ecossistemas e o bem-estar da humanidade. Contudo, a contribuição nas emissões de GHG não são equivalentes entre as nações (Althor et al., 2016), existindo uma relação superior entre os níveis de emissões de GHG e países com o PIB elevado (Kutlu, 2020). Países ricos em contínuo crescimento econômico e com

altos níveis de produção são os principais emissores de GHG, como os Estados Unidos e China, que são responsáveis por 14,1% e 21,1% das emissões globais, respectivamente. Nessas nações, uma significativa parcela do crescimento econômico é alcançado pela exploração de combustíveis fósseis (Althor et al., 2016). Os impactos ambientais, intensificados pelo crescimento econômico não sustentável, também afetam a economia global, o que pode ser observado nos custos relacionados a desastres climáticos durante os anos de 2000 e 2016 nos Estados Unidos, alcançando prejuízos superiores a US\$ 1,0 bilhão (Erickson, 2017). A poluição do ar também é responsável por um custo social global de aproximadamente US\$ 3 trilhões por ano (Kan et al., 2009; Mani et al., 2013). Estimativas sugerem que se a temperatura global continuar aumentando até 4 °C, haverá um custo anual de US\$ 340 bilhões a US\$ 690 bilhões (Obama, 2017).

Ao longo das décadas, diversos esforços globais foram adotados para estabilizar o aumento das emissões de GHG, como os tratados ambientais da Conferência das Nações Unidas sobre mudanças do clima (UNFCCC) em 1992 e o protocolo de Kyoto em 1995 (Kutlu, 2020). Contudo, mesmo com os acordos internacionais visando combater a emissão de GHG, houve um aumento das emissões de aproximadamente 41,1%, entre os anos de 1990-2016 (Kutlu, 2020). Mais recentemente em 2016, 110 países - equivalente a 75% das emissões globais (Obama, 2017), concordaram em adotar as metas do Acordo de Paris, realizado durante a Conferência das Partes (COP-21), promovida pela Organização das Nações Unidas (ONU). Entre os principais objetivos do Acordo de Paris, se destacam a redução das emissões de GHG para manter o aquecimento global abaixo de 2 °C (Erickson, 2017).

A estratégia para cumprir o acordo envolve a diminuição de CO₂ lançado na atmosfera por cada país anualmente, e muitas políticas já foram ou serão implementadas para assegurar essa condição. Nesse cenário, a produção de químicos e combustíveis por meio de fontes sustentáveis vem ganhando cada vez mais força.

1.2 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica, proveniente de resíduos agrícolas, vem sendo considerada como uma das principais fontes renováveis na produção de bioquímicos e biocombustíveis, representando até 35% da fonte energética nos países em

desenvolvimento (Greenwell et al., 2012; Ben-lwo et al., 2016; Kumar et al., 2018; Yadav et al. 2020). A biomassa lignocelulósica é um heteropolímero de carboidrato complexo naturalmente recalcitrante, composta por uma fração de 40-50% de celulose, 20-40% de hemicelulose e 10-25% de lignina (figura 2) (Monshizadeh, 2015; Budzinski & Nitzsche, 2016), sendo que estas proporções variam dependendo da biomassa vegetal (Ning et al., 2021).

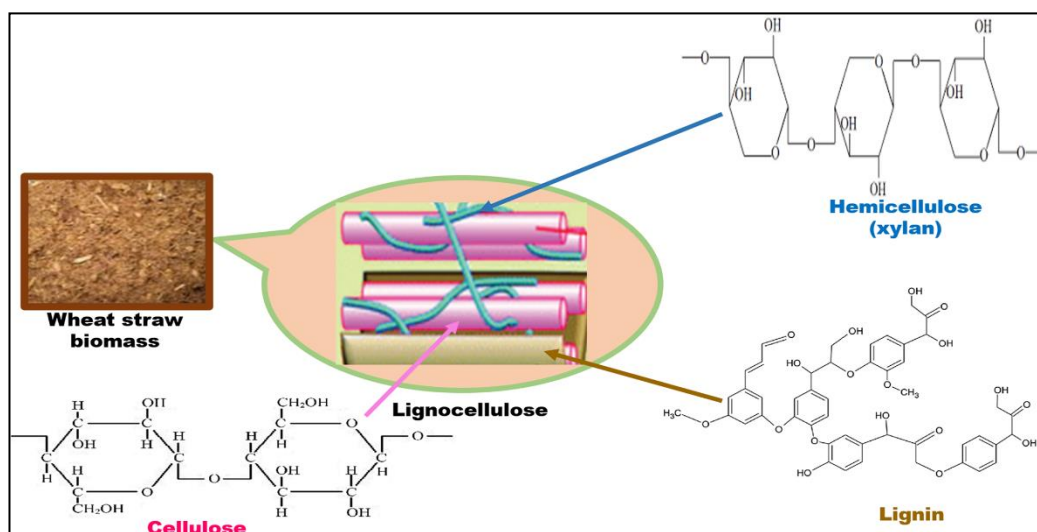


Figura 2. Estrutura da biomassa lignocelulósica (Adegboye et al., 2021).

A fração de celulose consiste em um polímero linear formado por cadeias glicolíticas com 500-14.000 monômeros unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (Robak & Balcerek, 2018; Hazwan et al., 2019), sendo que esta estrutura é normalmente encontrada na parede celular e suas cadeias são unidas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, formando as fibras de celulose (Liao et al., 2020). A hemicelulose é formada por heteropolímeros ramificados, amorfos e de cadeia curta, contendo principalmente monossacarídeos de pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), além de ácidos urônicos como ácidos D-glucurônico, D-galacturônico e metilgalacturônico (Zheng et al., 2014; Limayem & Ricke, 2012). Já a lignina consiste em um heteropolímero aromático formado majoritariamente por monômeros fenólicos, como p-cumaril, coniferil e sinapil (Limayem & Ricke, 2012), sendo que esta fração confere resistência e mantém a integridade estrutural das plantas (Ning et al., 2021). Além de ser usada como substrato para diversas aplicações comerciais, a lignina também pode ser usada, por

meio de combustão, para fornecer eletricidade e calor às biorrefinarias (Gamage et al., 2010; Ragauskas et al., 2014; Fang and Smith 2016).

1.3 Engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para o consumo de xilose e arabinose

No contexto de biorrefinarias, a levedura *S. cerevisiae* tem recebido papel de destaque devido a robustez e tolerância a condições e estresses de fermentações industriais, como resistência a baixo pH, altas concentrações de etanol, estresse oxidativo, entre outros (Kong et al., 2018; Cagnin et al., 2021). Linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não são capazes de consumir as pentoses xilose e arabinose, provenientes da hidrólise e liberação dos açúcares das cadeias de hemicelulose (Jeong et al., 2020). Assim sendo, a modificação genética de *S. cerevisiae* para a introdução das vias de assimilação desses açúcares constitui uma das áreas mais promissoras de engenharia metabólica de leveduras, viabilizando a utilização desse microrganismo como uma base eficiente na criação de biorrefinarias (Hong & Nielsen, 2012; Promdonkoy et al., 2019; Zha et al., 2021).

Duas vias de fermentação de D-xilose podem ser usadas para a expressão heteróloga em *S. cerevisiae*: uma envolvendo as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (OXR) e outra envolvendo apenas a xilose isomerase (XI) (Sun & Jin, 2021). Em ambas, o produto final é a xilulose, a qual é fosforilada a xilulose-5-fosfato e direcionada a fase não oxidativa da via das pentoses fosfato, gerando gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. A via segue pela glicólise até piruvato, que é descarboxilado e reduzido a etanol (Kwak; Jin, 2017). A via OXR causa desbalanço redox na célula e formação de subprodutos que diminuem o fluxo de carbono para etanol (Cunha et al., 2019). Assim sendo, a via que utiliza apenas a enzima xilose isomerase é mais interessante biotecnologicamente (Wei et al., 2013; Feng et al., 2018).

Nosso grupo desenvolveu previamente uma cepa industrial a partir da linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* com eficiente fermentação da pentose D-xilose em etanol lignocelulósico. Essa linhagem foi desenvolvida a partir da expressão heteróloga do gene que codifica a enzima xilose isomerase, deleção do gene *GRE3* e superexpressão dos quatro genes pertencentes a fase oxidativa da via das pentoses fosfato, associada a processo de evolução adaptativa que usou como fator de pressão seletiva a presença de D-xilose como única fonte de carbono no meio de cultivo.

Durante a evolução, a pressão evolutiva imposta na presença de xilose como fonte de carbono levou a seleção e fixação de mutações relacionadas ao metabolismo de xilose (Santos et al., comunicação pessoal). Mesmo sendo essenciais e responsáveis por conferir a capacidade de fermentar xilose adquirida pela linhagem evoluída, as mutações relacionadas ao metabolismo de xilose começaram a ser descobertas recentemente.

A próxima etapa para tornar leveduras C5 mais eficientes e robustas para a fermentação de açúcares lignocelulósicos é a expressão heteróloga dos genes do catabolismo de L-arabinose. Apesar da L-arabinose estar presente em menor concentração que a xilose na composição da parede celular de culturas vegetais, sua conversão traz uma grande vantagem competitiva e econômica (Narisetty et al., 2021). A co-fermentação de L-arabinose e D-xilose, provenientes da hidrólise da hemicelulose, aumentará a concentração de açúcares disponíveis para a levedura a ser desenvolvida, resultando no aumento de títulos da produção de bioprodutos. Esse processo é particularmente interessante em usinas que utilizam tecnologias de separação de correntes, gerando frações contendo açúcares com seis carbonos (C6) e cinco carbonos (C5). Nesse modelo, após etapa de pré-tratamento, a fração C6 é hidrolisada separadamente e fermentada em etanol pela levedura selvagem *S. cerevisiae*. A corrente C5 é comumente separada no processo e concentrada, elevando a concentração dos açúcares disponíveis no processo (Tabela 1). A fração C5 é comumente conhecida como “licor de pentoses” e possui alta concentração de xilose e arabinose, sendo necessária uma levedura modificada geneticamente para converter esses açúcares em etanol (Jansen et al., 2017; Park et al., 2020). Como exemplo de aplicação de processos, a empresa Raízen utiliza o processo de separação de correntes mencionado acima na produção do etanol 2G. Essa empresa inaugurou em novembro de 2014 uma planta industrial para a fabricação do etanol 2G em escala comercial (Dos Santos et al., 2016b). Localizada em Piracicaba (SP), a planta possui capacidade de produção de 40 milhões de litros de etanol por ano (Infopetro, 2016).

Tabela 1. Exemplo de composição de hidrolisado contendo a fração C5, após evaporação e concentração do material. As amostras foram medidas em triplicata. A quantificação dos compostos foi fornecida pela equipe do setor de pré-tratamento do LNBR.

Analitos	Licor concentrado (g/L)
Arabinose	19,77 ± 0,3
Glicose	17,07 ± 0,1
Xilose	178,56 ± 0,3
Celobiose	5,05 ± 0,0
Ácido fórmico	0,30 ± 0,0
Ácido acético	12,03 ± 0,1
HMF	0,23 ± 0,0
Furfural	0,050 ± 0,0

No exemplo de composição do licor de pentoses presente na tabela acima, a concentração de arabinose é de aproximadamente 20 g/L. Esse açúcar potencial hoje não é utilizado e acaba sendo descartado juntamente com a vinhaça (Narisetty et al., 2021). Considerando o rendimento teórico máximo de produção de 0,51 gramas de etanol por grama de arabinose consumida, em escala industrial, o aproveitamento desse recurso tem valor considerável. Um aproveitamento mais eficiente de todos os açúcares presentes na biomassa tem um papel fundamental no sentido de aumentar a viabilidade econômica e minimizar os impactos ambientais na produção de biocompostos derivados de resíduos agroindustriais (Verhoeven et al., 2018).

As vias do metabolismo de L-arabinose presentes em bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*) e fungos (*Candida spp*, *Pichia spp*, *Scheffersomyces stipitis*), podem ser usadas para expressão heteróloga em *S. cerevisiae* (Karhumaa et al., 2006; Caballero & Ramos 2017). A figura 3 resume as vias metabólicas possíveis de conversão de xilose e arabinose em etanol. Assim como para D-xilose, o catabolismo de L-arabinose resulta no intermediário D-xilulose-5-fosfato que será metabolizado a etanol de modo idêntico ao descrito anteriormente. Análogo ao observado para o metabolismo de xilose, a via utilizada por fungos para consumir L-arabinose (ara-OXR) requer o uso de cofatores (Ye et al., 2019). A via OXR-ara requer duas moléculas de NADPH e uma molécula de NAD⁺ para a conversão de L-arabinose em xilitol, gerando um desequilíbrio nas frações NADP⁺/NADPH e NAD⁺/NADH (via da isomerase – figura 3) (Gao et al., 2019). A introdução dessa via foi feita previamente em *S. cerevisiae*, combinando enzimas de *Scheffersomyces stipitis* e do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. As enzimas foram ativamente expressas, porém não foi observado crescimento ou fermentação

A primeira tentativa para introduzir a via de utilização de L-arabinose *araABD* (*ara*-iso) em *S. cerevisiae* por expressão heteróloga de genes de *E. coli* não resultou em uma eficiente utilização de arabinose, provavelmente devido à ausência da expressão funcional da L-arabinose isomerase (Becker & Boles, 2003). Somente quando o gene *araA* de *E. coli* foi substituído pelo correspondente de *B. subtilis*, a via de conversão de arabinose tornou-se funcional e estável em *S. cerevisiae* (Becker & Boles, 2003; Wang et al., 2013). O crescimento das leveduras e a fermentação de arabinose foi alcançada com um alto nível de expressão de *araA* de *B. subtilis*, *araB* e *araD* de *E. coli*, juntamente com a permease de membrana *GAL2* (KARHUMAA, 2006). Wiedemann et al., 2008 descreve a limitação em usar o gene *araA* que expressa a enzima L-arabinose isomerase de *B. subtilis*. A substituição pelo correspondente de *B. licheniformis*, resultou em uma considerável diminuição da fase lag e um aumento do rendimento de etanol de 0,24 para 0,39 g etanol / g L-arabinose (sendo 0,51 g/g o máximo teórico possível de ser obtido). Em 2011, Subtil et al. clonaram e caracterizaram dois transportadores de açúcares: o *AraT* da levedura *S. stipitis* e o *Stp2* de *Arabidopsis thaliana*. Em células de *S. cerevisiae* expressando o sistema *araABD*, ambos aumentam a captação de L-arabinose, mas não de D-glicose. No mesmo trabalho, os autores demonstram que os transportadores *GAL2*, *HXT9* e *HXT10* são capazes de assimilar L-arabinose. O transportador endógeno *GAL2* é descrito como o principal gene envolvido no transporte de arabinose em células de *S. cerevisiae* (Wang et al., 2015). Contudo, a repressão metabólica que ocorre na presença da glicose inativa a expressão de *GAL2*, o que dificulta o consumo de arabinose em meio com adição de glicose (Subtil & Boles, 2012; Young et al., 2014).

A busca por novos transportadores heterólogos com menor inibição por glicose se tornou uma alternativa para contornar a repressão catabólica e possibilitar o co-consumo de pentoses e glicose (Hara et al., 2017). Li e colaboradores (2015) conseguiram caracterizar dois transportadores heterólogos, LAT-1 de *Neurospora crassa* e MtLAT-1 de *Myceliophthora thermophila*, para a assimilação de arabinose em *S. cerevisiae*. Os autores relataram que a cepa recombinante com os transportadores LAT-1 e MtLAT-1 apresentou taxas de consumo de arabinose superiores a cepa parental, além de apresentar menor sensibilidade à glicose. Knoshaug e colaboradores (2015) relatou a descoberta de mais dois novos transportadores para pentoses não inibidos por glicose, os transportadores KmAXT1 e PgAXT1, presentes em *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia guilliermondii*,

respectivamente. Mais recentemente, por meio de uma análise transcriptômica, Bracher e colaboradores (2018) identificaram novos genes em *Penicillium chrysogenum* que são possíveis candidatos para o transporte de arabinose. Entre os genes identificados, a expressão do transportador *Pc AraT* em *S. cerevisiae* resultou em especificidade para o consumo de arabinose, maior velocidade no transporte e menor sensibilidade à repressão pela glicose, em contraste com a cepa parental expressando *GAL2*, a qual teve o consumo de arabinose totalmente inibido na presença de glicose.

O surgimento de mutações benéficas em transportadores, selecionadas por evolução adaptativa, também vem se mostrando uma abordagem eficaz para a identificação de novos alvos para o transporte de pentoses (Wang et al., 2017). O sequenciamento de cepas laboratoriais evoluídas em meio misto com arabinose, xilose e glicose, possibilitou a identificação de SNPs no transportador *GAL2*, que resultavam na substituição de uma asparagina na posição 376 para uma isoleucina ou treonina (Verhoeven et al., 2018). O autor relata que os resíduos mutados após a evolução estavam relacionados com a perda na capacidade de transportar glicose, criando um transportador específico para arabinose.

O presente trabalho contempla o desenvolvimento de uma eficiente plataforma microbiana para a conversão das pentoses arabinose e xilose, açúcares derivados de resíduos agroindustriais, bem como a elucidação de novas bases genéticas e metabolismos responsáveis por otimizar a conversão de C5 em leveduras. Os dados produzidos nesse trabalho podem ser utilizados no desenho racional de microrganismos como plataformas em biorrefinarias.

Capítulo 1

**Engenharia metabólica e evolução de linhagens de
Saccharomyces cerevisiae fermentadoras de arabinose**

INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão) são uma fonte esgotável e não sustentável de produção de energia, e seu uso resulta na emissão de gases promotores do efeito estufa que estão diretamente relacionados com as mudanças climáticas (Fernando et al., 2006; Liu et al., 2020). Diante deste cenário, a última Conferência das Nações Unidas sobre Mudança do Clima de 2021 (COP26), realizada em novembro de 2021 em Glasgow, Escócia, enfatiza a necessidade em neutralizar as emissões globais até 2050. É necessário o desenvolvimento de estratégias de descarbonização, geração de energia e produção de bioquímicos/biocombustíveis por fontes de energia renováveis.

A biomassa lignocelulósica, proveniente de resíduos agrícolas vegetais, é considerada uma fonte renovável promissora (Zoghلامي & Paës, 2019), e consiste em uma matriz de heteropolímeros de carboidratos complexos composta por celulose (40-50%), hemicelulose (20-40%) e lignina (18-25%) (Adegboye et al., 2021; Vassilev et al., 2012). A fração de celulose é composta por moléculas de glicose, enquanto que a hemicelulose é formada por uma variedade maior de açúcares, entre eles os açúcares de cinco carbonos, D-xilose e L-arabinose (Zheng et al., 2014). Em uma biorrefinaria industrial, a biomassa é submetida a um processo de pré-tratamento seguido pela sacarificação enzimática, com consequente liberação de açúcares de cinco e seis carbonos. A separação e concentração de frações em processos industriais gera o chamado “licor de pentoses”, enriquecido em xilose e arabinose, sendo necessário um microrganismo capaz de fermentar essas fontes de carbono (Xu et al., 2020).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* atende bem a requisitos de robustez, sendo capaz de suportar as condições estressantes de um processo industrial (Hong & Nielsen, 2012). Contudo, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de metabolizar as pentoses D-xilose e L-arabinose, sendo necessário utilizar estratégias de engenharia metabólica e evolução adaptativa para contornar essa limitação.

Durante a assimilação da xilose na via oxidorredutiva, o açúcar é reduzido a xilitol pela xilose redutase (XR) *XYL1* utilizando NAD(P)H. Em seguida, o xilitol é oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase dependente de NAD⁺ (XDH) *XYL2* (Moysés et al., 2016). Na via oxidorredutiva para assimilação da L-arabinose, a aldose redutase (*GRE3* ou XR) converte L-arabinose em L-arabitol que em seguida é convertida em L-xilulose, pela atividade da L-arabitol desidrogenase (LAD). Em

seguida, a L-xilulose redutase reduz L-xilulose em xilitol, e dessa forma, a via oxidorreductiva das duas pentoses se conectam (Bettiga et al., 2009). Embora a via oxidorreductiva seja utilizada há mais tempo na construção de leveduras modificadas, a diferença na preferência de cofatores resulta em desequilíbrio redox pela baixa formação de NAD^+ em condições anaeróbicas, o que aumenta o acúmulo dos subprodutos xilitol e L-arabitol, e consequentemente diminui o rendimento de etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2007). Uma forma de contornar esse problema é a utilização da via de isomerização que não utiliza cofatores, sendo que conversão de xilose é realizada pela xilose isomerase - gene *xylA*, enquanto a via de arabinose utiliza três genes - *araA*, *araB*, *araD*. Durante a assimilação da xilose, *xylA* converte D-xilose em D-xilulose. Em seguida, é fosforilada em D-xilulose-5-P, a qual é integrada à via das pentoses fosfato (PPP) (Harhangi et al., 2003). A primeira via de isomerização expressa com sucesso em *S. cerevisiae* foi obtida pela *xylA* do fungo *Piromyces* sp (Kuyper et al., 2003). Na isomerização da arabinose, *araA* codifica L-arabinose isomerase (AI), a qual isomeriza arabinose em L-ribulose, sendo fosforilada em L-ribulose-5-P pela L-arabinose quinase (RK), codificada por *araB*. Em sequência, L-ribulose-5-P é convertida em D-xilulose-5-P pela ação da ribulose 5-fosfato epimerase, codificada por *araD* (Wisselink et al. 2007). Os primeiros avanços em utilizar a via de isomerização da arabinose em *S. cerevisiae* foram alcançados por meio da expressão dos genes *araA* de *B. subtilis*, *araB* e *araD* de *E. coli* (Becker & Boles, 2003) com uma melhora de performance pela substituição do gene *araA* de *B. subtilis* pelo de *B. licheniformis* (Wiedemann & Boles, 2008). Wisselink e colaboradores também obtiveram sucesso através da expressão da via de isomerização de *Lactobacillus plantarum* (Wisselink et al., 2007). Além da construção da via de isomerização, o sucesso da fermentação das pentoses também está vinculado com a deleção da aldose redutase *GRE3* em *S. cerevisiae*, superexpressão de *XKS1* e dos genes envolvidos na fase não oxidativa de PPP (*RPE1*, *RKI1*, *TAL1*, *TKL1*). Estratégias de engenharia evolutiva se mostraram eficazes na construção de cepas de *S. cerevisiae* robustas para o consumo das pentoses (Sonderegger et al., 2004; Kuyper et al., 2005). Ao submeter o microrganismo ao meio com pressão seletiva, que pode ser um açúcar não fermentativo, altas concentrações de inibidores ou temperatura, as mutações espontâneas que vão surgir na população microbiana e que conferem alguma vantagem serão fixadas ao longo das gerações. As mutações que surgem durante os eventos de evolução podem ser usadas para entender os

mecanismos moleculares e metabolismos alternativos que tornam o microrganismo mais apto às condições desejadas. O uso da evolução adaptativa para o consumo de pentoses já foi aplicado com sucesso em cepas de *S. cerevisiae*. A evolução adaptativa já foi empregada com sucesso na descoberta de alvos moleculares não óbvios, que não estão diretamente relacionados ao consumo de açúcares, como a xilose (Sato et al., 2016; Dos Santos et al., 2016). A descoberta desses alvos também possibilitou a investigação das possíveis interações epistáticas de diferentes mutações na otimização de cepas engenheiradas.

Nesse contexto, o objetivo desse capítulo foi o desenvolvimento de uma linhagem modificada de *S. cerevisiae* capaz de fermentar eficientemente as pentoses L-arabinose e D-xilose, visando a conversão de resíduos agroindustriais em bioprodutos. Posteriormente, o genoma das populações evoluídas será sequenciado para a identificação do conjunto de mutações responsáveis pelo fenótipo superior adquirido.

Metodologia

Meios e linhagens utilizadas

Os meios utilizados foram preparados conforme descrito em Ausubel et al. 2003. Foi utilizado o meio LB (1% Triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl) para o cultivo de *E. coli* DH5 α . A levedura *S. cerevisiae* foi cultivada em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% Peptona e 2% Glicose), YPX (1% extrato de levedura, 2% Peptona e 2% Xilose) ou YPA (1% extrato de levedura, 2% Peptona e 2% arabinose). A linhagem *S. cerevisiae* LVY-X5 foi utilizada como base inicial para o estudo. A cepa LVY-X5 apresenta superexpressão do gene *XKS1* e dos quatro genes da PPP, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1*, bem como a deleção do gene *GRE3*. Para os experimentos de transformação, as linhagens foram cultivadas em YNB (0,67% Difco yeast nitrogen base, 1% drop-out completo para leveduras, 0,5% sulfato de amônio, 2% glicose). Os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 minutos, com exceção do YNB, que foi filtrado em membrana 0,2 μ m. O meio mínimo teve a uracila removida da composição do drop-out para a seleção dos transformantes.

Construção dos cassetes de expressão gênica

Para a construção dos cassetes foi utilizada a técnica descrita por Gibson et al. (2009), que consiste na fusão de fragmentos de DNA com um mix das enzimas T5 exonuclease, Taq ligase e DNA polimerase em uma única reação. Foram utilizados os genes *araA* de *B. licheniformis*, *araB* e *araD* de *E. coli*, *SsAraT* de *S. stipitis* e *AtStp2* de *A. thaliana*. Os fragmentos que correspondem as sequências promotoras e terminadoras dos genes *TDH1*, *PGK1*, *ADH1*, *ENO1* e *FBA1* de *S. cerevisiae* foram amplificados, respectivamente, com a introdução de sequências de homologia de 42 pb na extremidade dos amplicons, que correspondem aos genes a serem clonados e o vetor pRS304, onde o fragmento foi construído. A ligação foi utilizada na transformação da bactéria *E. coli* através do método de eletroporação (Ausubel et al., 2003). No processo de eletroporação, foi adicionado a reação de Gibson juntamente a uma alíquota de *E. coli* eletrocompetente previamente induzida. Essa solução foi transferida em uma cubeta de eletroporação e submetida a uma corrente de 2,5kV. Os transformantes foram selecionados em meio LB com ampicilina.

Transformação de levedura

A transformação da levedura para a integração dos cassetes foi feita utilizando o método de acetato de lítio descrito por Gietz e Schiestl (2007). Após o crescimento overnight, um pré-inóculo foi transferido para 50 mL de YPD e cultivado a 200 rpm/30°C por 4 horas, tempo necessário para ~ duas duplicações acontecerem. A cultura foi centrifugada a 2500 rpm e o pellet foi lavado 3x. As células foram ressuspensas com 1 mL de 1x TELiAc e incubadas em 30° C por 45 minutos. O DNA para a transformação foi concentrado no speedvac e o DNA de salmão desnaturado no termociclador. Em 200 µL de células competentes de levedura foram adicionados 10 µL de DNA concentrado, 12 µL do DNA desnaturado e 600 µL de solução PEG 40%. No controle, o DNA concentrado foi substituído por água. As células foram incubadas por 45 minutos sob agitação 200 rpm e 30° C. Foram adicionados na solução 70 µL de DMSO, seguida de choque térmico a 42° C por 25 minutos. Por fim, as células foram centrifugadas, ressuspensas com água e plaqueadas em meio seletivo.

Construção da linhagem fermentadora de arabinose

Os cassetes foram amplificados utilizando a enzima Phusion DNA polymerase (NEB) e confirmados por eletroforese. A linhagem fermentadora de xilose LVY-X5, derivada de *S. cerevisiae* PE-2, foi utilizada para o desenvolvimento das linhagens. A deleção do gene *URA3* da linhagem, foi feita por recombinação homóloga com o cassette Kan_delURA3, que confere resistência ao antibiótico geneticina. O cassette foi amplificado do plasmídeo pFA6_KanMx4 usando primers que adicionam fragmentos com homologia as regiões upstream e downstream da sequência da ORF do gene *URA3*, o que possibilita a sua deleção. Após a transformação, os transformantes foram cultivados em YPD com geneticina. Após a seleção com antibiótico, as células foram estriadas em meio seletivo auxotrófico, YNB suplementado com 440 mg/L de uracila e 1 g/L de 5-FOA para confirmação. As colônias selecionadas tiveram o gDNA extraído para os testes de confirmação por PCR. Posteriormente, os cassetes pC5araA e pC6araBD foram amplificados por PCR e os *amplicons* foram utilizados como *template* para transformar a cepa mutante *ura3Δ::KanMX4*. Os cassetes pC5araA e pC6araBD contêm sequências homólogas que possibilitam a recombinação entre ambos (região HM3) e regiões *upstream* (pC5araA) e *downstream* (pC6araBD) com homologia a região adjacente ao centrômero 14, possibilitando a estável integração no genoma da cepa base. As colônias foram selecionadas em meio auxotrófico ura- e confirmadas por PCR.

Extração do DNA genômico (gDNA) de levedura

A extração do gDNA foi realizada conforme está escrito em Ausubel et al. (2003). Após crescimento overnight em 5 mL de YPD sob agitação 30 °C/200 rpm, as células foram transferidas e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 200 µl de tampão de lise, 0,3 g de beads (~200 µl volume) e 200 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura foi submetida a rigorosa agitação e centrifugação. O sobrenadante foi transferido e o DNA foi precipitado com NaOAc (3M pH 5,2) e 2x o volume de álcool 100% gelado. Após centrifugação, o pellet foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em água.

Evolução adaptativa para fermentação de arabinose

A evolução adaptativa foi feita com bateladas fermentativas sucessivas conduzidas pela transferência de 2% do conteúdo da batelada anterior para um novo

frasco com 20 mL de meio YPA em condições semi-anaeróbicas. O experimento foi realizado com duas populações em paralelo. Ao final da etapa de evolução, foram isoladas linhagens da população evoluída em placas contendo meio YNBA, suplementado com 20 g/L de arabinose. Colônias contendo o maior tamanho foram isoladas para posterior comparação da cinética de fermentação de arabinose e xilose. Uma triagem *high-throughput* foi realizada em microplacas de 96 poços com o auxílio de um incubador/leitor de placas para mensurar crescimento celular. As cepas que apresentaram melhor taxa de crescimento foram validadas posteriormente em fermentação em maior escala.

Ensaio fermentativos

Para os ensaios fermentativos, foi usado meio YP suplementado com 20 g/L de arabinose (YPA), ou mistura de 20 g/L de xilose e 20 g/L de arabinose (YPAX) ou mistura de 20 g/L de xilose, 20 g/L de arabinose e 30 g/L de glicose (YPAXD) em condições semi-anaeróbicas, iniciando a cultura com OD de ~1. As fermentações foram conduzidas em garrafas seladas com 80 mL de volume de trabalho, com temperatura e agitação de 30° C e 200 rpm, respectivamente. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e 1 mL da amostra era coletado para medir OD e para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Procedimentos analíticos

A quantificação de glicose, arabinose, xilose, xilitol, glicerol e etanol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando o cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414) e arranjo de diodos (Waters 2998). As amostras foram analisadas utilizando coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm, BioRad®), aquecida em forno a 35 °C, H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Uma curva padrão com as concentrações conhecidas com compostos de interesse foi analisada pelo mesmo procedimento. As concentrações dos compostos nas amostras foram determinadas por comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos com as curvas de calibração.

Resultados

Otimização dos genes heterólogos e construção dos cassetes de expressão

Como já foi relatado anteriormente por Wiedemann e Boles (2008), a otimização dos códons de genes bacterianos da via de isomerização da arabinose (*araABD*) é um dos passos decisivos para aumento da taxa de conversão da L-arabinose em etanol. Os genes que codificam L-arabinose isomerase (*araA*), L-ribuloquinase (*araB*), L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase (*araD*) e os genes que codificam os transportadores de açúcares *STP2* e *araT* tiveram seus códons otimizados nas proporções mais utilizadas pela levedura *S. cerevisiae*. A otimização e síntese foi realizada pela empresa GenScript. Com os genes otimizados, foi usado a técnica de Gibson assembly para a construção dos cassetes de expressão. Foram construídos três cassetes, pC5araA (com o gene *araA*), pC6araBD (com os genes *araB* e *araD*) e pC7StpAraT (com os transportadores de arabinose *STP2* e *araT*).

Todos os genes utilizados nesse estudo foram clonados sob a ação de promotores constitutivos de *S. cerevisiae*, altamente expressos sob condições de fermentação em xilose (Palermo et al., 2021). O gene *URA3* foi utilizado como marcador auxotrófico para seleção das linhagens positivas. As principais características dos cassetes de expressão contendo os genes da via de conversão da pentose arabinose estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2. Cassetes de expressão desenvolvidos nesse projeto para a conversão do açúcar C5 arabinose.

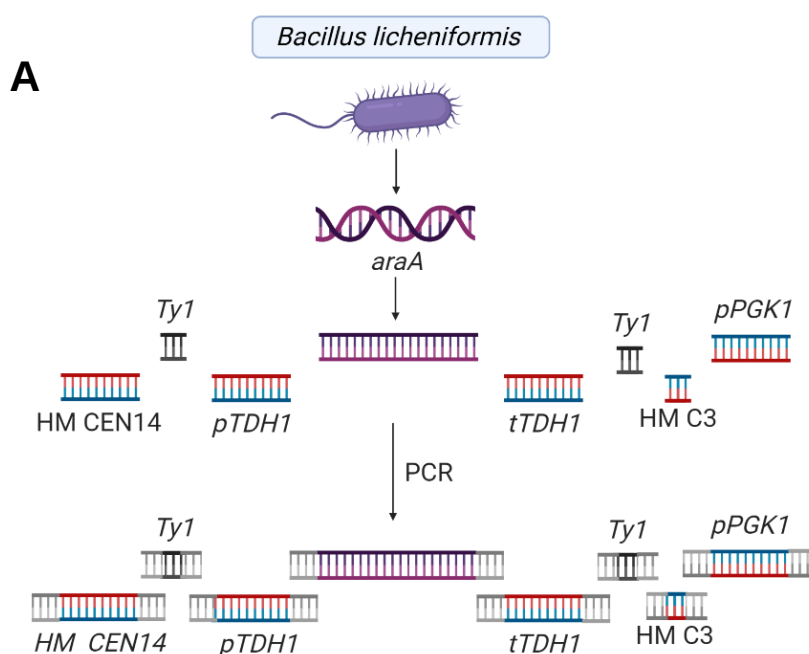
Plasmídeo	Características relevantes
pC5araA	L-arabinose isomerase clonada sob a ação do promotor <i>TDH1</i> flanqueado pela região LTR do retrotransposon Ty1
pC6araBD	L-ribuloquinase e L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase clonados sob a ação dos promotores <i>PGK1</i> e <i>ADH1</i> flanqueados pela região LTR do retrotransposon Ty1
pC7StpAraT	Transportadores <i>AraT</i> e <i>STP2</i> clonados sob a ação dos promotores <i>ENO1</i> e <i>FBA1</i> flanqueados pela região LTR do retrotransposon Ty1

Outra estratégia empregada na construção dos cassetes foi a inserção de sequências repetitivas longas terminais (LTR) do retrotransposon Ty1. O Ty1 consiste em um elemento móvel amplamente presente no genoma da *S. cerevisiae* (Curcio et al., 2015). A presença das sequências LTR flanqueando os genes possibilita uma

maior distribuição dos mesmos na levedura durante a evolução, acelerando os eventos de evolução adaptativa (Demeke et al., 2015; Dos Santos et al., 2016). A utilização do Gibson assembly para a construção dos cassetes de expressão gênica é uma maneira simples e eficiente de unir múltiplos fragmentos de DNA em uma única molécula. Em comparação com os métodos convencionais, a montagem de Gibson requer menos etapas e menos reagentes. Os cassetes foram desenhados para ter como alvo final sua inserção próxima ao centrômero 14 da levedura (Yin & Petes, 2013).

Na construção do cassete pC5araA (com a região codificante do *araA*), foram usados os seguintes fragmentos: sequência upstream homóloga a região adjacente do CEN14, sequências LTR do Ty1 (flanqueando o gene), promotor *TDH1*, sequência codificante otimizada do *araA*, terminador *TDH1*, uma sequência linker e parte do promotor *PGK1* (figura 4A). Para o cassete pC6araBD (com regiões codificantes de *araB* e *araD*), foram usados os fragmentos na construção: sequência linker, promotor *PGK1*, sequência codificante otimizada do gene *araB*, terminador *PGK1*, sequência LTR do Ty1, promotor *ADH1*, sequência codificante e otimizada do *araD*, terminador *ADH1*, sequência LTR do Ty1, gene marcador *URA3* e uma sequência downstream homóloga ao CEN14 (figura 4B).

Da mesma maneira, os fragmentos do último cassete pC7StpAraT foram: sequência de homologia a região de inserção, promotor *ENO1*, sequência codificante otimizada do transportador *araT*, terminador *ENO1*, sequências LTR do Ty1; promotor *FBA1*, sequência codificante otimizada do transportador *STP2*, terminador *FBA1* e sequência homóloga CEN14 (figura 4C).



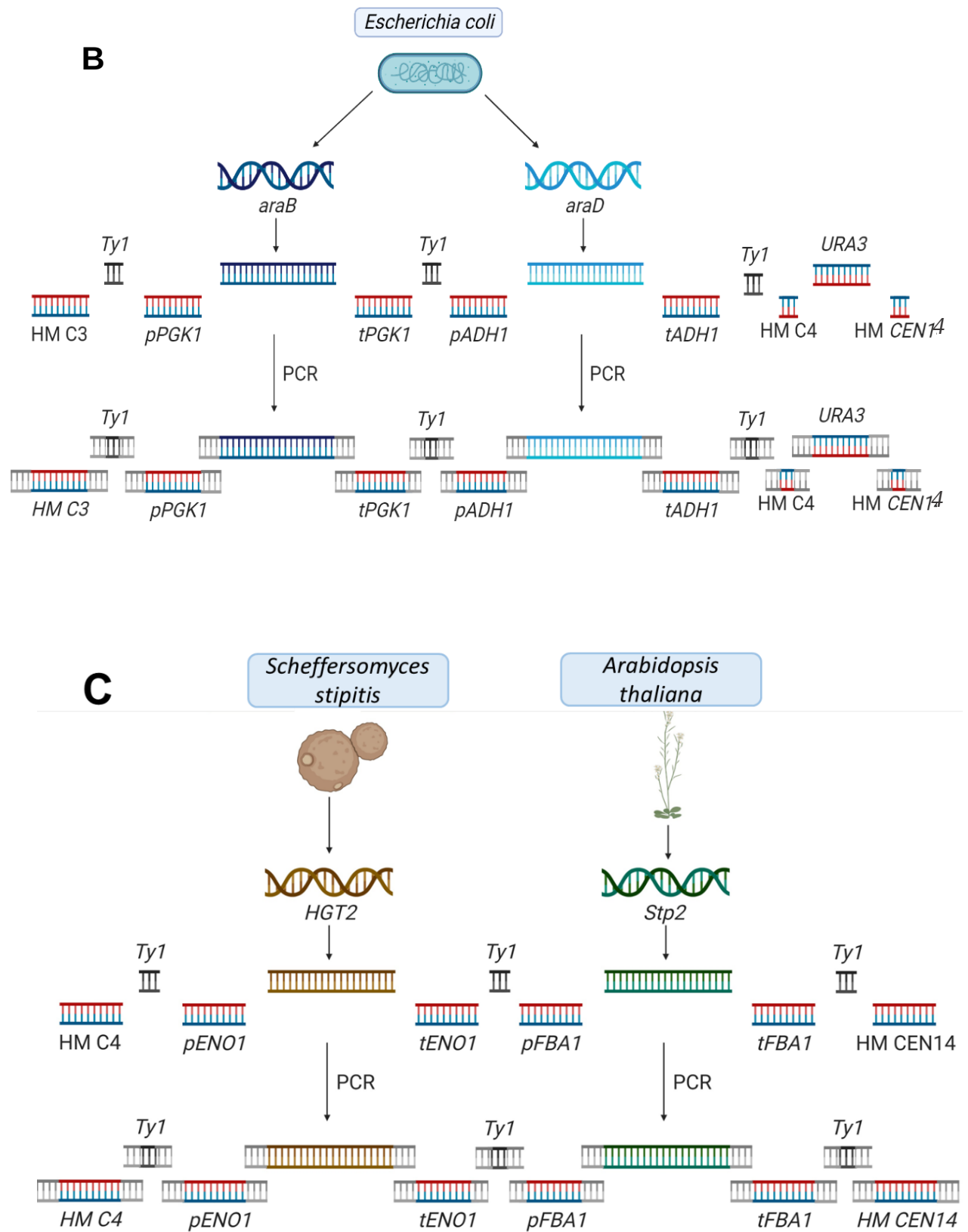


Figura 4: Fragmentos usados na construção dos cassetes pC5araA (A), pC6araBD (B) e pC7StpAraT (C).

O vetor de clonagem pRS304, linearizado com a endonuclease *Bam*HI, foi usado como *backbone* na construção. Para a união dos fragmentos, se faz necessário que os mesmos possuam sequências homólogas de sobreposição durante a etapa de montagem. Assim, os fragmentos a serem usados na construção dos cassetes foram amplificados por PCR utilizando uma polimerase de alta fidelidade e primers que adicionaram uma cauda de homologia de 42 pb. Os fragmentos com sequências homólogas de sobreposição, junto com o mix de exonuclease T5, DNA polimerase e Taq ligase, foram incubados a 50° C por 60 minutos. A exonuclease T5 degrada as extremidades 5' contendo as sequências homólogas, formando fragmentos de fita simples livres para o anelamento dos fragmentos adjacentes que possuem sequências complementares, possibilitando a sobreposição dos mesmos. Na sequência, a DNA polimerase complementa as lacunas feitas pela exonuclease T5 e a Taq ligase unifica os fragmentos em um único cassette. Os cassetes unidos ao vetor foram denominados de pC5araA, pC6araBD e pC7StpAraT.

4.1. Transformação bacteriana e amplificação dos cassetes

Com a finalidade de aumentar a concentração dos cassetes para seu uso nos experimentos de construção da levedura fermentadora de arabinose, os plasmídeos pC5araAC5 e pC6araBDC6 e pC7StpAraTC7 foram transformados utilizando uma linhagem eletrocompetente de *E. coli* DH5 α . O processo de internalização foi feito por eletroporação e as células transformadas foram plaqueadas em meio LB suplementado com ampicilina, e incubadas a 37 °C. Para a extração dos plasmídeos foi usado o kit de extração (QIAprep Spin Kit) e a confirmação molecular foi realizada por PCR para certificar a presença dos genes *araA* (pC5araA), *araB* e *araD* (pC6araBDC6) e dos transportadores *STP2* e *araT* (pC7StpAraTC7). O gel de eletroforese revelado mostrou bandas correspondentes aos genes, confirmando a extração dos plasmídeos (figura 5). Com a finalidade de conservar os clones, os mesmos foram armazenados no -80 °C.

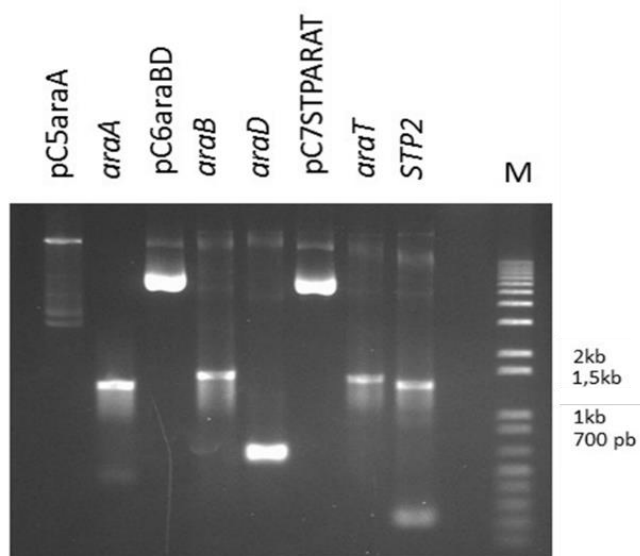


Figura 5: Gel de eletroforese confirmando a presença dos amplicons referentes aos genes heterólogos usados na construção dos cassetes. Gene *araA* (1482 pb), *araB* (1701 pb), *araD* (696 pb), *araT* (1629 pb) e *STP2* (1497 pb).

4.2. Plataforma fermentadora de xilose LVY-X5

O projeto regular Fapesp 2017/08519-6 envolveu procedimentos de engenharia metabólica visando a fermentação de xilose presente em resíduos agroindustriais. As linhagens desenvolvidas foram submetidas a processos independentes de evolução adaptativa e o sequenciamento genômico das populações evoluídas gerou o primeiro capítulo do atlas genômico com a identificação de novas bases moleculares responsáveis pela fermentação de xilose (manuscrito em preparação). A partir das populações desenvolvidas nesse trabalho, foi isolada a cepa LVY-X5, capaz de converter a xilose com alto rendimento de até ~92% do teórico máximo.

Sendo uma eficiente linhagem fermentadora de xilose, a levedura industrial LVY-X5 foi usada como plataforma para construção da linhagem do presente trabalho. Para as próximas etapas de seleção, o gene marcador *URA3* foi deletado do genoma da linhagem LVY-X5. *URA3* faz parte da via de síntese de novo de ribonucleotídeos de pirimidina e sua deleção frequentemente é usada para a seleção auxotrófica de leveduras modificadas (Jack, 2002). Foram realizadas reações de PCR para amplificar o marcador de resistência a geneticina flanqueado pelas regiões upstream e downstream do gene *URA3* (Kan_del*URA3*). Os amplicons foram confirmados por eletroforese.

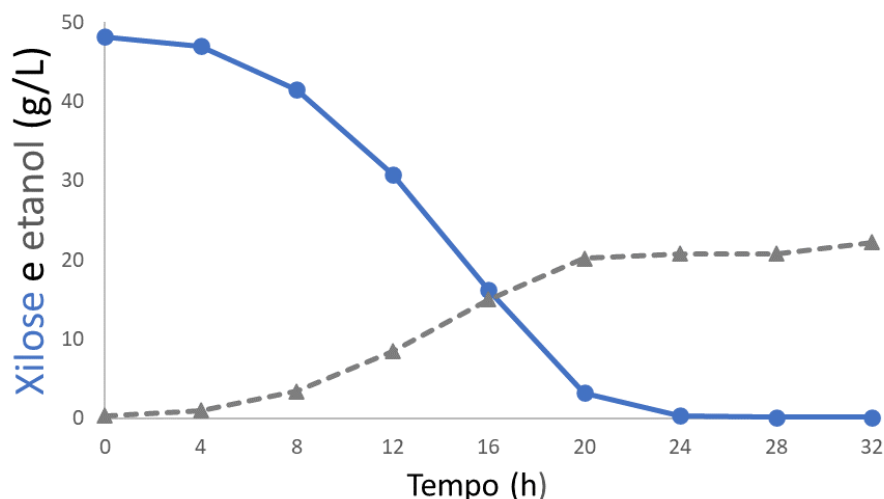


Figura 6. Etanol lignocelulósico produzido a partir de xilose. A linhagem desenvolvida no projeto Fapesp regular 2017/08519-6 produz etanol lignocelulósico com rendimento de 0,47 g/g, o que corresponde a aproximadamente 92% do teórico máximo.

O próximo passo foi a transformação da levedura LVY-X5 com o cassete Kan_~~URA3~~. A transformação foi realizada através do método de acetato de lítio descrito por Gietz et al. (2007). Os transformantes foram plaqueados em YPD suplementado com geneticina. Para confirmação fenotípica da deleção do gene *URA3*, algumas colônias transformantes e a cepa parental (controle) foram estriadas em YNB sem uracila e YNB com uracila e 5-FOA, o qual causa a morte de células selvagens contendo o gene *URA3* (Ko et al., 2008). Como esperado, no meio YNB sem a adição da uracila, foi observado o crescimento apenas da cepa parental (figura 7A), e no meio YNB suplementado com uracila e 5-FOA houve somente o crescimento dos transformantes (figura 7B), confirmando fenotipicamente a deleção de *URA3*. Por fim, foram feitas permanentes da cepa mutante, armazenadas no -80 °C.

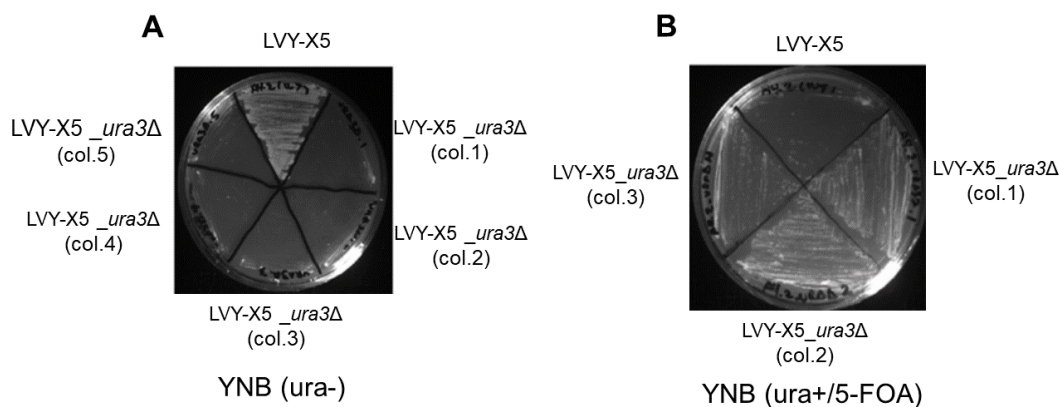


Figura 7: Teste fenotípico dos transformantes LVY-X5_ura3Δ. Seleção em YNB ura- (**A**). Seleção em YNB_ura+/5-FOA (**B**).

Construção da cepa fermentadora de arabinose

A estratégia de construção da linhagem LVY-X5 com os cassetes de expressão consiste na recombinação entre as regiões homólogas presentes nos cassetes e posterior integração no genoma (figura 8). Os cassetes pC5araA e pC6araBD possuem duas regiões de homologia: uma sequência linker e parte do promotor *PGK1*, possibilitando a recombinação entre os mesmos. Além dessas regiões, os cassetes possuem extremidades homólogas a uma região adjacente ao centrômero 14 (*CEN14*), possibilitando a integração genômica da via heteróloga de conversão de arabinose na linhagem LVY-X5_ura3Δ. Foram feitas PCRs para amplificar os cassetes utilizando a combinação de primers HM CEN14 C5 F + *PGK* Hm C5 R para amplificar pC5araA (3926 pb) e os primers HM3 C6 F + HM CEN14 C6 para amplificar pC6araBD (6642 pb). A cepa LVY-X5_ura3Δ foi transformada com os amplicons.

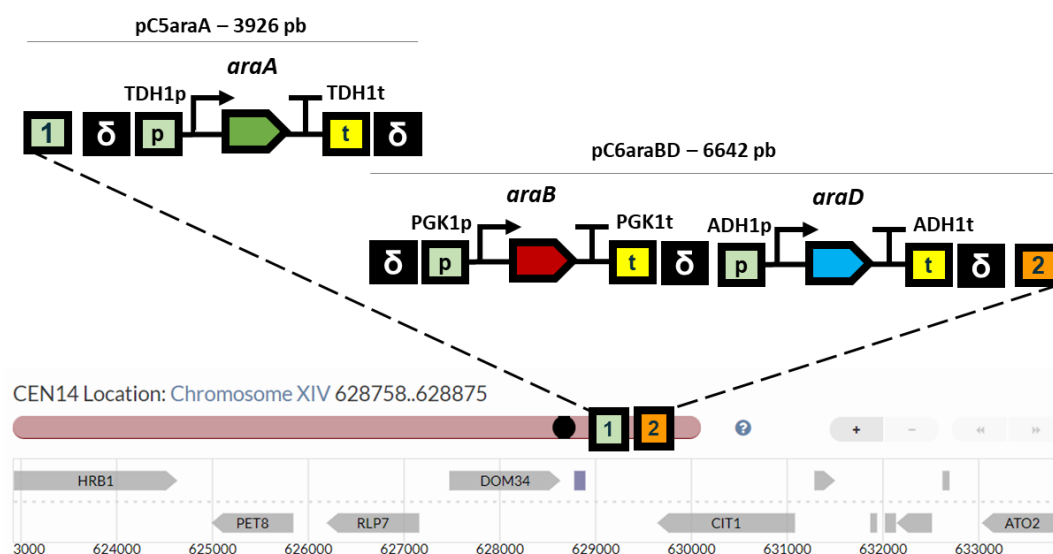


Figura 8. Representação da sequência dos genes inseridos no genoma da cepa LVY-X5 contendo a via de conversão de arabinose. Os genes, representados pelas setas, estão flanqueados por regiões promotora e terminadora respectivas. A espessura da seta acima da região promotora representa a força do promotor, previamente selecionado com base em experimentos de expressão gênica. *araA* - L-arabinose isomerase, *araB* - L-ribulokinase, *araD* - L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase.

Como o amplicon obtido do plasmídeo pC6araBD possui o gene *URA3* como marcador, a cepa mutante LVY-X5_ura3Δ transformada com os cassetes é capaz de crescer em meio sem uracila. Dessa maneira, os transformantes foram

plaqueados em meio YNB sem uracila e incubados por três dias. Após o período de incubação, foi observado o crescimento de colônias, sugerindo a correta inserção dos cassetes no genoma da levedura.

Nesse trabalho não foi utilizado o cassete pC7StpAraTC7 contendo os transportadores *sAraT* de *S. stipitis* e *STP2* de *A. thaliana* na construção da cepa final. Esse cassete será utilizado em etapas posteriores visando a otimização das taxas de assimilação de arabinose pela cepa construída.

Confirmação molecular da cepa fermentadora de arabinose

Após a construção da linhagem com a via de isomerização da L-arabinose, a correta inserção dos cassetes de expressão pC5araA (gene *araA*) e pC6araBD (genes *araB* e *araD*) no genoma da cepa foi confirmada por PCR. A primeira PCR teve como finalidade checar a presença dos cassetes no genoma. Primers com sequências de anelamento nas regiões promotoras e terminadoras dos cassetes integrados, em combinação com primers que anelam nas ORFs, foram utilizados na amplificação (figura 9).

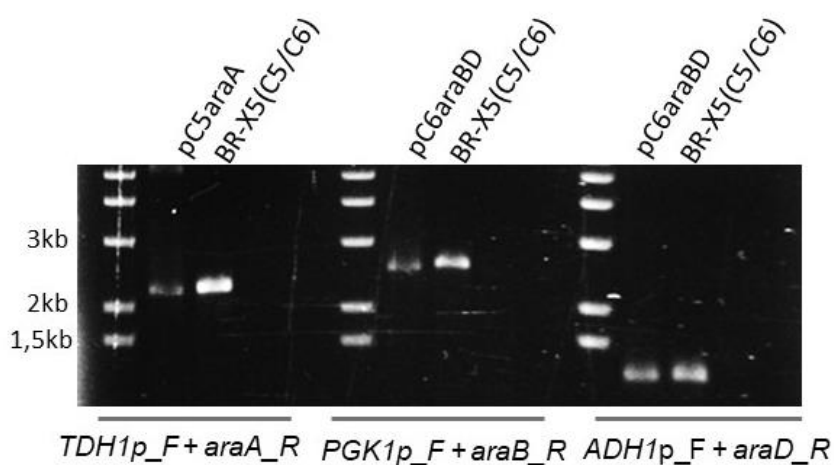


Figura 9: Confirmação molecular da integração genômica do cassete de expressão da via de isomerização de assimilação de L-arabinose. **(1)** amplificação do promotor *TDH1* e gene *araA* (2224 pb). **(2)** amplificação do promotor *PGK1* e do gene *araB* (2574pb). **(3)** amplificação do promotor *ADH1* e gene *araD* (1398 pb).

A correta integração dos cassetes em região adjacente ao *CEN14* foi feita com combinações de primers que anelam em regiões externas ao local de integração, combinados com primers que anelam nos fragmentos amplificados dos plasmídeos pC5araA e pC6araBD. Foram usadas as combinações de primers: CheckCEN14 F + *TDH1pR* e *ADH1t F* + Check CEN14 R. Adicionalmente, foi utilizada a combinação

TDH1t F + *araB R*, que confirma a recombinação entre os dois cassetes. O gel de eletroforese revelado da PCR usando a combinação dos primers apresentou, apenas nos transformantes, bandas com tamanho esperado para as regiões amplificadas (figura 10), sugerindo a correta inserção dos cassetes em região adjacente ao centrômero 14. Os transformantes contendo a via de isomerização da arabinose foram armazenados como culturas permanentes em ultrafreezer. A linhagem construída foi denominada PEY-AX5 (figura 11) e foi utilizada como plataforma para as etapas de evolução adaptativa.

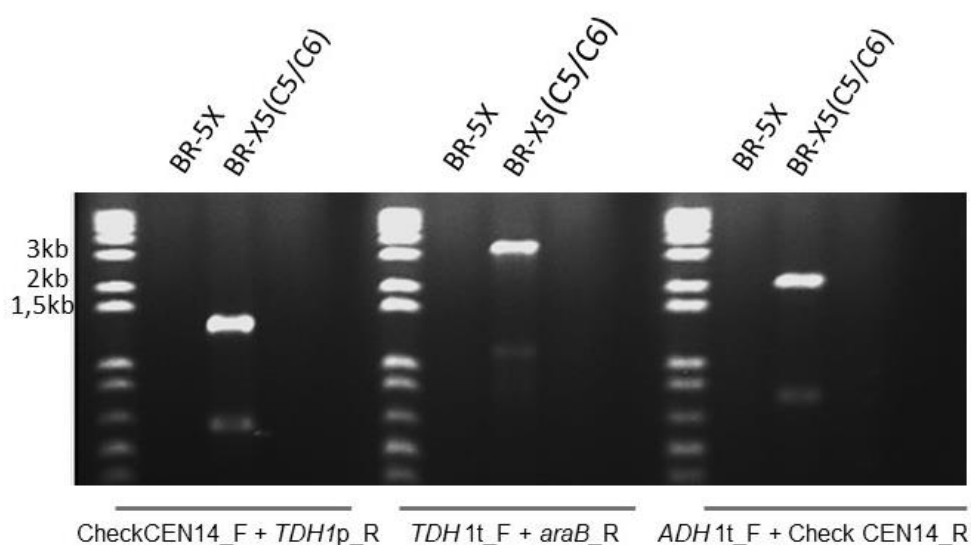


Figura 10: Gel de agarose confirmando a correta integração dos cassetes contendo os genes *araA*, *araB* e *araD* e sua integração adjacente ao centrômero 14. PCR com os primers CheckCEN14 F + *TDH1p R*: 1380 pb (1); primers *TDH 1t F* + *araB R*: 3266 pb (2); primers *ADH 1t F* + Check CEN14 R: 1801 pb (3).

Tabela 3. Linhagens de levedura utilizadas neste estudo.

Linagem	Genótipo relevante	Referência
LVY-X5	PE-2 MAT α ; <i>gre3Δ::pTDH1-TAL1-tTDH1-pPGK1-RKI1-tPGK1-pTDH1-TKL1-tTDH1-pPGK1-RPE1-tPGK1-pADH1-XKS1-tADH1-multiple Ty1-pTDH1-xylA-tTDH1-Ty1</i> + evolução adaptativa em xilose	Santos et al., manuscrito em elaboração
LVY-X5_ura3Δ	LVY-X5; <i>ura3Δ::Kan</i>	Este estudo
PEY-AX5	LVY-X5_ura3Δ; <i>CEN14::pTDH1-araA-tTDH1; pPGK1-araB-tPGK1; pADH1-araD-tADH1; URA3</i> .	Este estudo
PEY-AX5-Evo1 e 2	PEY-AX5; evolução adaptativa em arabinose.	Este estudo

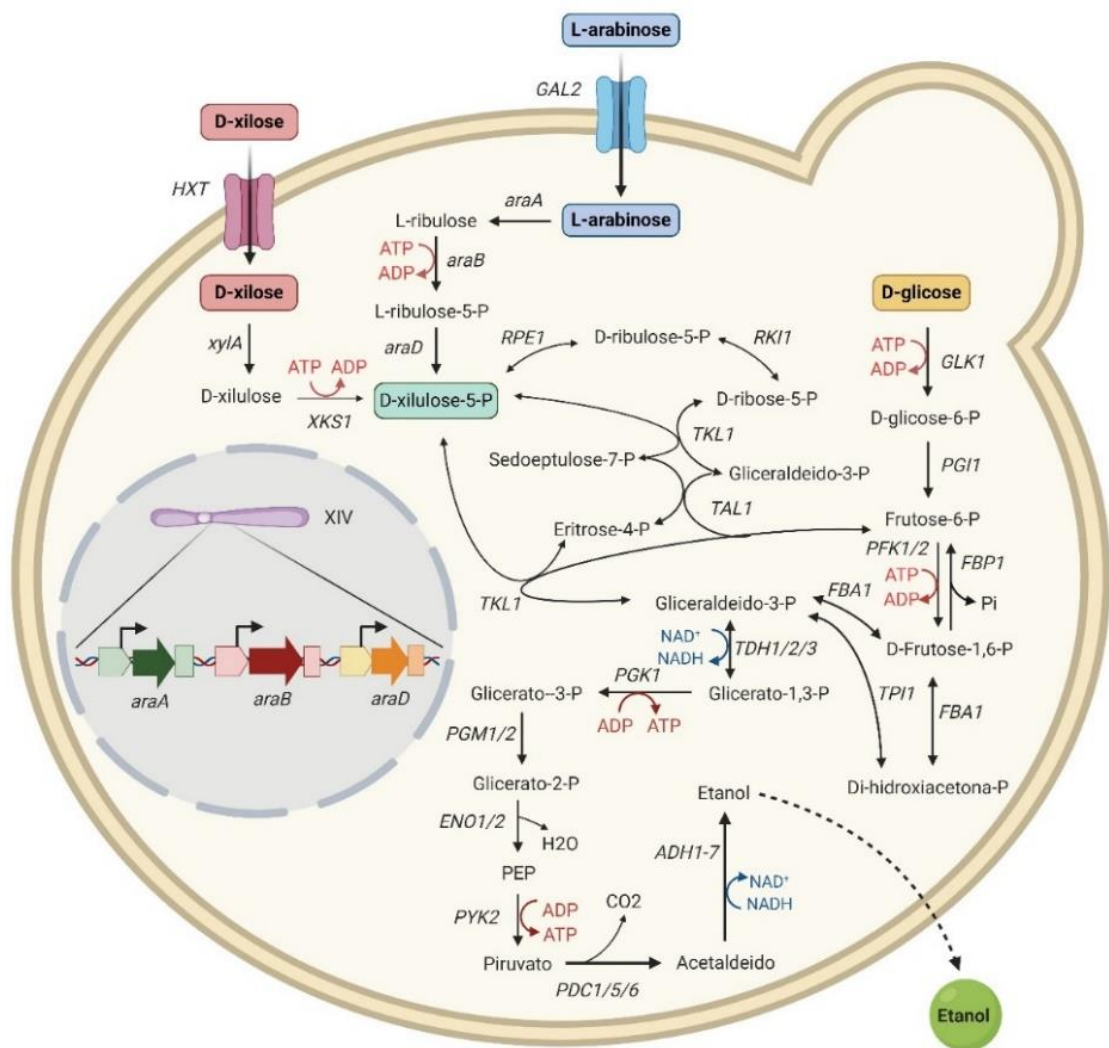
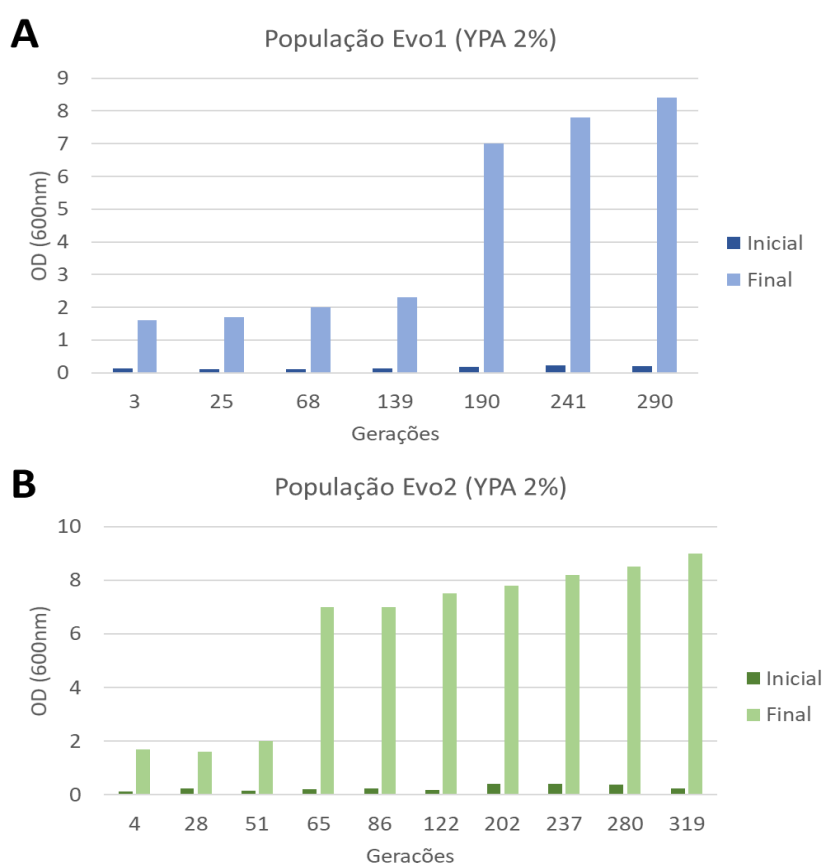


Figura 11: Ilustração da cepa PEY-AX5 contendo a via de isomerização da arabinose e da xilose. Em destaque os genes heterólogos dos cassetes pC5araA e pC6araBD integrados adjacentes ao centrômero 14. Abreviações: GAL2 (galactose permease); araA (L-arabinose isomerase); araB (L-ribulose quinase); araD (L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase); HXT (transportador de hexose); xylA (xilose isomerase); XKS1 (xiluloquinase); RPE1 (D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase); RKI1 (ribose-5-fosfato cetol-isomerase); TKL1 (transcetolase); TAL1 (transaldolase); GLK1 (glicoquinase); PGI1 (fosfoglicoisomerase); PFK1/2 (fosfofrutoquinase); FBP1 (frutose-1,6-bisfosfato); FBA1 (frutose-1,6-bisfosfato aldolase); TPI1 (triose fosfato desidrogenase); TDH1/2/3 (triose-fosfato desidrogenase); PGK1 (3-fosfoglicerato quinase); PGM1/2 (fosfoglicomutase); ENO1/2 (enolase); PYK2 (piruvato quinase); PDC1/5/6 (piruvato descarboxilase); ADH1-7 (álcool desidrogenase).

Evolução adaptativa e análise das populações

Os procedimentos utilizando evolução adaptativa tiveram uma duração total de 8 meses, utilizando arabinose como única fonte de carbono. Durante os eventos de evolução, a cepa PEY-AX5 foi inoculada em YPA (contendo 20 g/L de arabinose), sendo que o experimento foi dividido em duas populações, PEY-AX5-Evo1 e Evo2, cultivadas sob condições de semi-anaerobiose. As bateladas foram conduzidas semanalmente com transferências de 2 % do inóculo para um novo meio YPA. Após 65 gerações, foi possível observar um expressivo aumento do crescimento celular na população Evo2, a qual apresentou uma evolução mais rápida do que a população Evo1, onde foi observado aumento do crescimento somente após 190 gerações (figura 12 A e B).

Figura 12: Gráfico de evolução das populações Evo1 **(A)** e Evo2 **(B)** ao longo das gerações em meio contendo arabinose como única fonte de carbono.



Ensaio fermentativos

A cinética fermentativa do consumo de arabinose e produção de etanol pelas populações foi avaliada em YPA (20 g/L de arabinose), usando a linhagem

parental não evoluída como controle. Os resultados revelaram uma boa performance de crescimento das populações nas condições testadas, alcançando o platô próximo a 30 horas (figura 13). As concentrações de L-arabinose e etanol foram analisadas por HPLC, onde foi observado um consumo total do açúcar e produções de etanol com rendimento acima de 0,4 g de etanol por g de arabinose (tabela 4) (rendimento teórico máximo de 0,51 g/g).

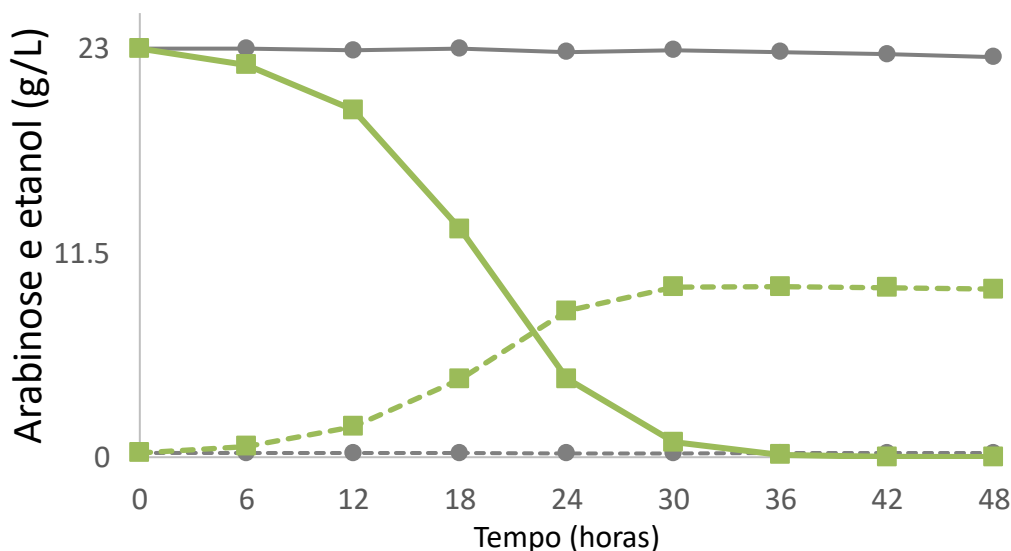


Figura 13: Conversão de arabinose em etanol pela população evoluída (verde) a partir da cepa modificada PEY-AX5 (cinza) em meio YPA 2%. A linha contínua representa a arabinose enquanto a linha pontilhada indica o etanol produzido. Fermentação realizada em triplicata, sob condições semi-anaeróbicas.

Para avaliar a repressão catabólica comumente observada em *S. cerevisiae* durante a utilização de outras fontes de carbono, bem como validar a manutenção da capacidade de fermentar xilose pela cepa escolhida, foram realizadas fermentações utilizando a mistura dos açúcares em meio YPAX (20 g/L de arabinose e 20 g/L de xilose) (figura 14A) e YPADX (20 g/L de arabinose, 20 g/L de xilose e 30 g/L de glicose) (figura 14B) (tabela 4). Os resultados demonstram que na fermentação em YPAX, a população evoluída foi capaz de co-consumir xilose e arabinose simultaneamente (figura 14A). E embora foi observado um consumo preferencial pela glicose, resultante da competição dos açúcares pelos transportadores, os açúcares foram consumidos após a depleção da fonte de C6. Esses dados indicam também que a população conseguiu consumir a xilose com taxa específica de consumo superior ao parental PEY-AX5 não evoluído, sugerindo a fixação de mutações benéficas associadas ao fenótipo superior para ambas as pentoses.

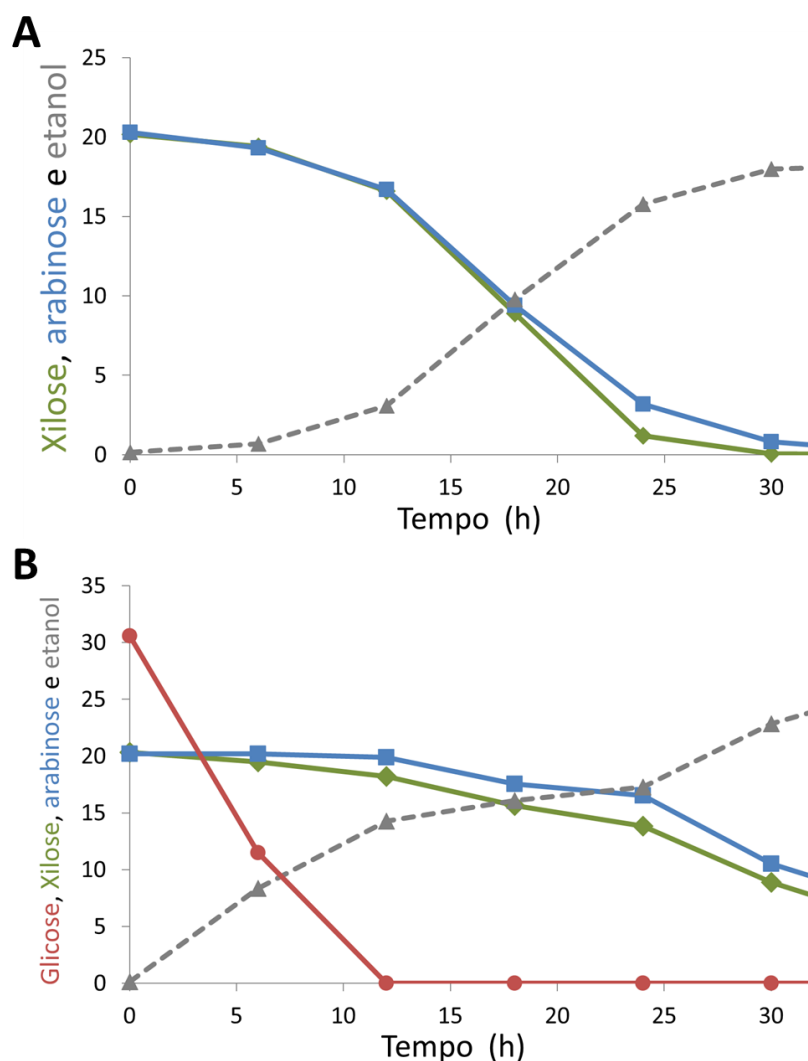


Figura 14: Efeito da conversão de arabinose na presença de outras fontes de carbono. **(A)** A população evoluída foi capaz co-fermentar as pentoses xilose e arabinose simultaneamente. **(B)** A glicose foi consumida preferencialmente, sendo observado o início do consumo das pentoses somente após a depleção do C6. Fermentação realizada em triplicata, sob condições semi-anaeróbicas.

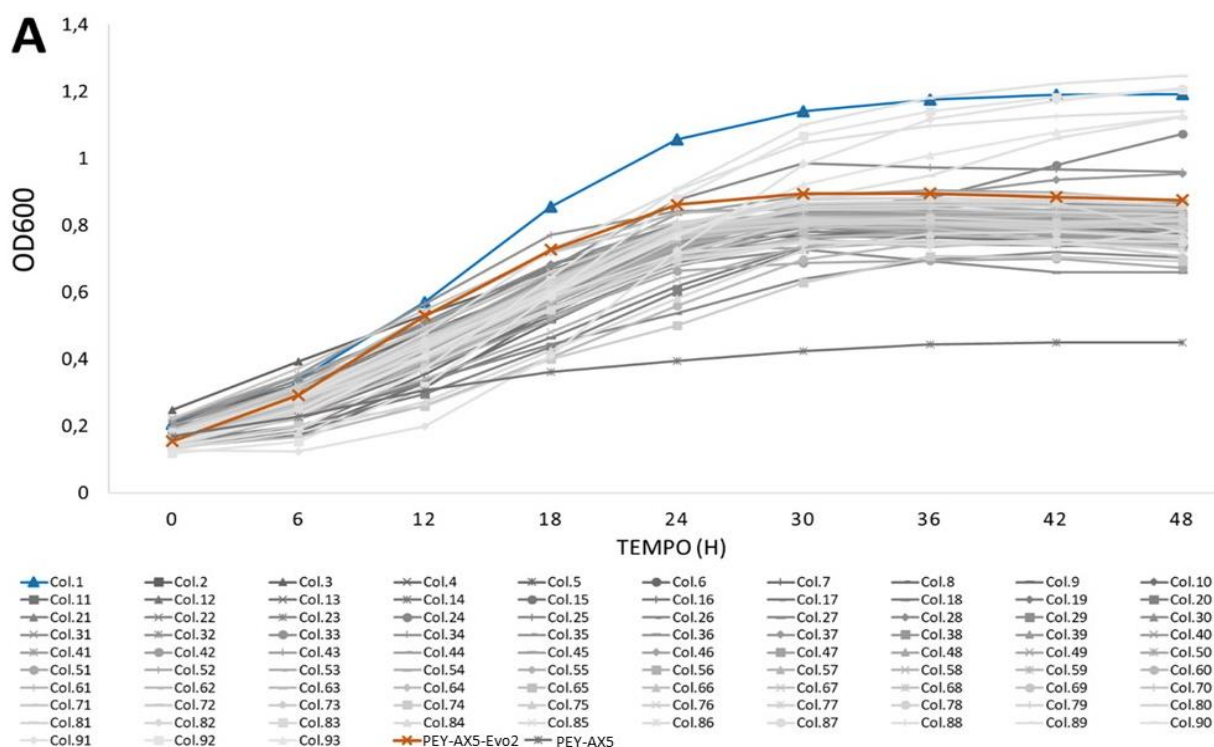
Tabela 4. Desempenho de fermentação da população evoluída em YPA (20g/L de arabinose), YPAX (20 g/L de arabinose e 20 g/L de xilose) e YPAXD (20g/L de arabinose, 20g/L de xilose e 30g/L de glicose). Os valores representam as médias de três repetições biológicas $\pm$ desvio padrão entre 0 e 30 h.

Parâmetros fermentativos da Evo2 em glicose, xilose e arabinose				
	Taxa máxima de crescimento específico (h^{-1})*	Produtividade de etanol (g/L.h^{-1})	Rendimento de etanol por substrato (g/g)	Taxa máxima de consumo específico de arabinose (g.g/CDW.h^{-1})
YPA	$0,127 \pm 0,003$	$0,311 \pm 0,006$	$0,422 \pm 0,010$	$0,925 \pm 0,015$
YPAX	$0,134 \pm 0,030$	$0,595 \pm 0,006$	$0,451 \pm 0,002$	-
YPAXD	$0,030 \pm 0,003$	$0,756 \pm 0,062$	$0,440 \pm 0,003$	-

*cálculo baseado em arabinose.

Isolamento das melhores colônias

Ao final do procedimento de evolução, um *screening* de isolados em cada população foi realizado para triagem *high-throughput* das linhagens com fitness superior. Aproximadamente 200 colônias de cada população foram isoladas por plaqueamento em meio YNBA 2%. As colônias que apresentaram maior tamanho em meio contendo somente arabinose como fonte de carbono foram selecionadas para etapa posterior. O screening foi realizado em microplaca de 96 poços, comparando o crescimento das linhagens isoladas com a cepa parental PEY-AX5 e as populações evoluídas (figura 15A). Curiosamente, a maior parte das colônias isoladas tiveram fitness inferior ao representado pela população na condição testada. A explicação para essa observação ainda está sendo investigada. Durante o screening foi possível identificar algumas colônias com cinética de crescimento similar ao da média populacional. A linhagem com melhor fitness teve sua performance confirmada em fermentação conduzida em maior escala e será sequenciada para a identificação do conjunto de SNPs e CNVs responsáveis pelo fenótipo superior (figura 15B).



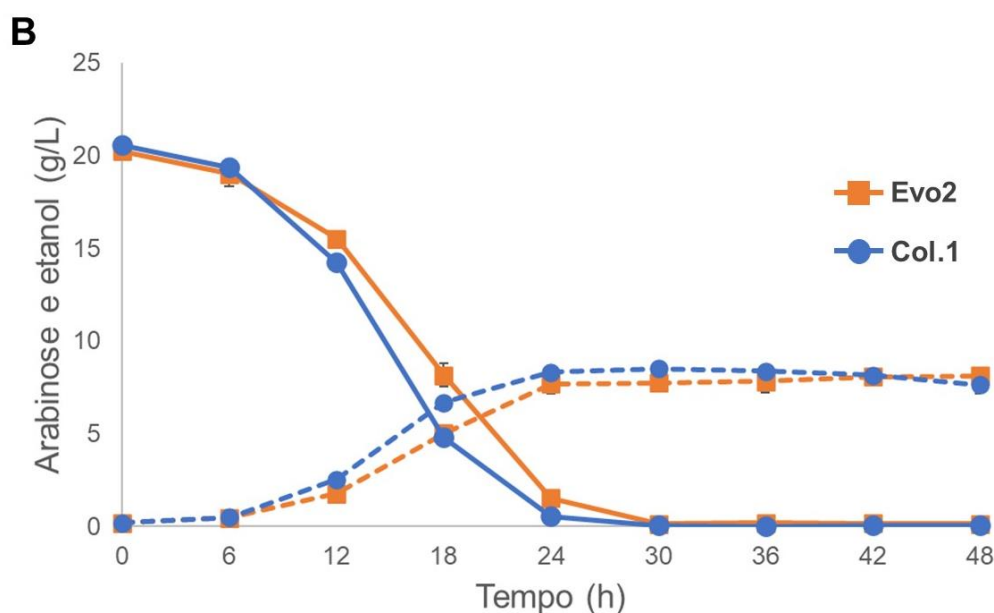


Figura 15: Curva de crescimento das colônias isoladas da população evoluída – PEY-AX5-evo2. (A) Screening em microplacas de 96 poços em meio YPA 2%. (B) Batelada fermentativa em maior escala de uma colônia isolada e a população evoluída PEY-AX5 – evo2. O gráfico confirma a cinética da melhor colônia isolada em comparação com a população evoluída.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de cepas de *S. cerevisiae* capazes de aproveitar os açúcares C5 se faz cada vez mais indispensável para viabilizar economicamente a conversão da biomassa em diversos bioprodutos. No presente trabalho, a integração da via de isomerização da arabinose aliada à eventos de evolução adaptativa se mostraram eficazes para promover a conversão da arabinose em bioproduto.

A interferência humana na domesticação de leveduras através da seleção artificial contribuiu ao longo dos séculos no remodelamento e aumento da complexidade do genoma das leveduras (Fay e Benavides, 2005). Estudos envolvendo a caracterização genômica de cepas industriais de *S. cerevisiae* observaram um alto grau de heterozigosidade, o que poderia estar conferindo uma maior robustez no ambiente industrial (Argueso et al., 2009; Borneman et al., 2011). Assim como em cepas industriais, linhagens submetidas a eventos de evolução adaptativa laboratorial (ALE) também podem apresentar alterações cromossômicas e variação no número de cópias de genes específicos, além de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) e InDels (Insertion–deletion mutations) benéficos fixados ao longo das gerações (Gorter et al., 2017).

No presente trabalho, os testes de fermentação demonstraram que apenas etapas racionais na construção da cepa não foram suficientes para desenvolver um microrganismo capaz de consumir a arabinose, sendo necessário a adição de estratégias de evolução adaptativa. Os primeiros relatos na literatura visando a construção de cepas fermentadoras de arabinose também observaram o crescimento somente após as etapas de evolução adaptativa (Sedlak e Ho, 2001; Becker e Boles, 2003; Wisselink et al., 2007). Após bateladas sucessivas em YPA, Becker e Boles (2003) identificaram uma mutação em *araB*, a qual resulta na substituição do aspartato por uma asparagina na posição 121, o que estaria reduzindo a atividade da enzima ribulosequinase. Tal mutação sugere que o ajuste ótimo nos níveis de expressão dos componentes da via de isomerização de arabinose em *S. cerevisiae* depende da redução do gasto energético para suportar a carga metabólica.

Uma abordagem similar foi utilizada por Wisselink e colaboradores (2007) visando a construção de uma cepa fermentadora de arabinose, onde após a etapa de evolução adaptativa, observaram um aumento de 52 e 90 vezes nos níveis de expressão de *araB* e *araD*, respectivamente. Tais achados indicam baixos níveis de atividade das enzimas originais durante a expressão funcional em *S. cerevisiae*. Já foi observado o aumento do número de cópias do gene que codifica a enzima xilose isomerase *xylA* em cepas evoluídas de *S. cerevisiae*. Esse aumento foi justificado devido à baixa atividade inicial da enzima e a necessidade do aumento do número de cópias visando uma melhor performance no consumo do açúcar (Demeke et al., 2015; Santos et al., 2016). Recentemente, Wang e colaboradores (2018), relataram uma correlação positiva entre o número de cópias dos genes *ara* com o consumo de arabinose, onde a alta expressão do cassete *araABD* era suficiente para possibilitar a utilização da arabinose, independente de evolução adaptativa.

As populações fermentadoras obtidas no presente trabalho serão sequenciadas para a identificação de alterações no genoma. Espera-se observar alterações do tipo CNV nos genes *araABD*, visto que as construções gênicas utilizaram o elemento repetitivo Ty1 visando a ampliação do fragmento da via durante a evolução adaptativa. Outras mutações responsáveis pela preferência de utilização de outras fontes de carbono podem ser identificadas durante as análises e serão validadas por experimentos de engenharia reversa.

Além de promover a fermentação da arabinose, a população evoluída também foi capaz de fermentar as duas principais pentoses, arabinose e xilose,

consumindo simultaneamente os açúcares. Tentativas de co-consumo de pentoses em cepas engenheiradas já foram observadas em trabalhos anteriores (Karhumaa et al., 2006; Bettiga et al., 2009; Garcia et al., 2010). Karhumaa e colaboradores (2006) construíram cepas contendo a via de isomerização da arabinose e a via oxidorrredutiva da xilose. Contudo, durante a fermentação anaeróbica, a cepa desenvolvida só foi capaz de consumir 20 % da arabinose, a qual foi quase completamente convertida em arabitol pela atividade L-arabinose redutase da XR, presente na via da xilose. A utilização das vias de isomerização possibilitou a redução do acúmulo dos subprodutos arabitol e xilitol durante a fermentação. Interessante notar que mesmo após uma extensa etapa de evolução adaptativa, a população não perdeu a capacidade de consumir a xilose. Tal fato já foi observado em outros trabalhos com cepas fermentadoras de xilose evoluídas para o consumo de arabinose (Wisselink et al., 2007). A construção de linhagens co-fermentadoras de diferentes açúcares presentes na biomassa vegetal ainda é um desafio. A seleção de mutações que favoreçam diferentes rotas metabólicas durante a evolução pode ser um evento complexo, necessitando múltiplos e diferentes tipos de pressão seletiva (Sauer, 2001). Para a co-fermentação de xilose e arabinose, é possível que durante a evolução possam surgir mutações benéficas que favoreçam a utilização de ambas as pentoses, visto que após a conversão em xilulose-5-P, o metabólito segue para a via das pentoses fosfato, independentemente do tipo de pentose. Outra vantagem para a co-fermentação está no transportador Gal2p, que além de ser considerado o principal transportador endógeno de L-arabinose em *S. cerevisiae*, também possui afinidade por D-xilose (Hamacher et al., 2002; Subtil e Boles, 2011). Apesar de diversos trabalhos induzirem a expressão de *GAL2* por meio de galactose (Becker e Boles, 2003; Wisselink et al., 2007), Oehling e colaboradores (2018) conseguiram observar a indução da expressão de *GAL2* por meio da arabinose. A pressão seletiva imposta no presente trabalho pode ter favorecido a seleção de populações com alterações em níveis de expressão de *GAL2* através da presença de arabinose no meio, assim como mutações específicas no transportador, resultando em maior afinidade pela L-arabinose.

O sequenciamento do genoma das linhagens evoluídas e selecionadas será realizado utilizando o Illumina MiSeq da “facility” de sequenciamento disponível no LNBR. A equipe de bioinformática do LNBR será responsável pela análise dos dados. O software FastQC será utilizado para avaliação da qualidade e o software

PEAR (ZHANG et al., 2014) será utilizado para unir as regiões de sobreposição em sequências únicas. As regiões de sobreposição da linhagem parental serão unidas em longos scaffolds utilizando o programa Velvet (ZERBINO & BIRNEY, 2008).

Com o posterior sequenciamento será possível observar o conjunto de mutações responsáveis por otimizar a fermentação da arabinose pelas cepas desenvolvidas, elucidando novas bases genéticas envolvidas na fermentação C5. Tais alvos possuem relevância biotecnológica e poderão ser utilizados no design racional de novas plataformas microbianas visando a conversão de resíduos agroindustriais em bioprodutos.

Capítulo 2

Interações epistáticas entre *ZWF1*, *CLN3* e clusteres de Fe-S otimizam taxas de fermentação de xilose em *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUÇÃO

O consumo maciço de fontes fósseis para a produção de químicos e combustíveis tornou-se um agravante para as mudanças climáticas, podendo comprometer a vida na Terra nas próximas décadas (Bridgwater, 2003; Lee & Lavoie, 2013). Além de intensificar o efeito estufa com a emissão de gases poluentes, como o CO₂ (Bridgwater, 2003), a dependência energética das reservas fósseis pode levar a uma crise energética global, sendo que estas fontes de energia são esgotáveis. Para minimizar os impactos provenientes do uso excessivo de fontes fósseis, esforços globais como a COP-21, organizada pela ONU, buscam incentivar o uso crescente de fontes renováveis na matriz energética global, em uma política de carbono neutro (Williams, et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica é uma alternativa promissora na substituição do uso de fontes petrolíferas, podendo ser usada como matéria-prima na produção de biocombustíveis e bioquímicos de base renovável (Dusselier et al., 2014). Por se tratar de uma fonte renovável obtida por resíduos agrícolas, a biomassa lignocelulósica não interfere na cadeia de produção alimentar, além de ser abundante, com produção anual de cerca de 2×10^{11} t (Paul & Dutta, 2018; Narisetty et al., 2021). A biomassa lignocelulósica é uma estrutura complexa, composta por frações de celulose (40-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-20%). A ligação da lignina com a celulose e hemicelulose confere recalcitrância à biomassa, sendo necessária uma série de processos para possibilitar a desconstrução e liberação dos açúcares usados para conversão em bioprodutos (Hazeena et al., 2020; Narisetty et al., 2021; Ning et al., 2021). Com o objetivo de obter o melhor custo-benefício, diversas etapas de desconstrução da biomassa já foram desenvolvidas na indústria, sendo o pré-tratamento uma das etapas com maiores gargalos tecnológicos a serem superados (Ning et al., 2021). Entre os tipos de pré-tratamento, a explosão a vapor é considerada um dos mais eficazes e econômicos (Ma et al., 2021). Neste processo a biomassa é exposta a alta temperatura e pressão, seguida por uma descompressão repentina, o que resulta na solubilização e hidrólise da biomassa (Ning et al., 2021). Esse processo pode ser acompanhado pela adição de ácidos que contribuem na hidrólise da biomassa (Smichi et al., 2020).

Após as etapas de tratamento da biomassa, a fração de celulose libera moléculas de glicose, enquanto a hemicelulose disponibiliza uma maior variedade de

açúcares, como D-xilose, L-arabinose, D-glicose, entre outros (Narisetty et al., 2021). A xilose representa aproximadamente 90% dos açúcares liberados da fração hemicelulósica (Vivek et al., 2018). Nesse contexto, para que a conversão da biomassa seja economicamente viável, é imprescindível o desenvolvimento de microrganismos robustos capazes de fermentar essa pentose.

Algumas leveduras como *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum* são naturalmente capazes de fermentar a xilose (Jeffries & Van, 2009; Nguyen et al., 2006; Cadete et al., 2012), embora tais microrganismos não sejam aptos a tolerar as condições estressantes da indústria (Kwak & Jin, 2017). Cepas industriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* possuem fenótipos desejáveis, capazes de tolerar estresses do processo industrial, como baixo pH, alta pressão osmótica, altas temperaturas e contaminações (Auesukaree et al., 2009; Kong et al., 2018). Apesar de ser mais robusta que outras leveduras, a *S. cerevisiae* não é naturalmente capaz de fermentar a xilose, sendo necessário estratégias de engenharia metabólica para contornar este gargalo (Kim et al., 2013).

Diversos avanços em procedimentos de engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para produção de bioquímicos e biocombustíveis a partir de xilose foram alcançados ao longo dos últimos anos (Ho et al., 1998; Karhumaa et al., 2007; Brat et al., 2009; Dos Santos, et al., 2016; Zhanget al., 2019; Jang et al., 2021). O cerne da engenharia metabólica em *S. cerevisiae* se concentra na otimização da expressão de genes endógenos e na integração de vias heterólogas, buscando melhorar o título, taxa de produção e rendimento (TRY) na obtenção de bioprodutos (Kwak & Jin, 2017; Hu et al., 2019). Em geral, os trabalhos de modificações genéticas focam na introdução da via oxi-redutiva (XR/XDH) ou de isomerização (XI), presentes em fungos e bactérias (Gao et al., 2019). A conversão oxi-redutiva da xilose se baseia em uma via de dois passos dependente de cofatores, onde a D-xilose é reduzida à D-xilitol pela enzima xilose redutase (XR), usando NADPH/NADH. Posteriormente, o D-xilitol é oxidado à D-xilulose pela enzima NAD⁺ dependente xilitol desidrogenase (XDH), e fosforilado pela enzima endógena xiluloquinase *XKS1*, convertendo D-xilulose em D-xilulose-5-P, a qual entra na fase não-oxidativa da via PPP (Hahn-Hägerdal et al., 2007). Contudo, as diferenças na preferência de cofatores entre XR e XDH resultam em um desbalanço redox, acúmulo de xilitol e menores rendimentos de etanol (Karhumaa et al., 2007). Uma estratégia mais simples é a introdução da via de isomerização, com a atividade de uma única enzima, a xilose isomerase (XI), a qual

converte D-xilose em D-xilulose (Kuyper et al., 2003). Essa via não depende de cofatores, apresentando baixo acúmulo de subprodutos e taxas de rendimento superiores a via oxi-redutiva (Li et al., 2016). Os primeiros avanços na construção de cepas de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose com a via de isomerização foram obtidos pela expressão heteróloga do gene *xylA* do fungo anaeróbico *Piromyces* sp. (Kuyper et al., 2004).

Outras modificações, como a otimização dos códons preferenciais e aumento no número de cópias, resultaram na melhoria da fermentação da xilose em *S. cerevisiae* expressando a via XI (Zhou et al., 2012). A superexpressão dos genes endógenos da fase não oxidativa da PPP (*RKI1*, *RPE1*, *TKL1* e *TAL1*) e o aumento da expressão de *XKS1* também melhoraram as taxas de assimilação da xilose (Kuyper et al., 2005; Zhou et al., 2012). Também já foram relatados que transportadores heterólogos, como *GXF1* (*Candida intermedia*) e *Cs4130* (*Candida sojae*), melhoram a captação de xilose em cepas de *S. cerevisiae* (Runquist et al., 2009; Bueno et al., 2020). A aplicação de evolução adaptativa laboratorial, também contribui para o desenvolvimento de cepas com alta performance no consumo de xilose (Klimacek et al., 2014).

Durante os eventos de evolução adaptativa, mutações benéficas podem surgir ao longo das gerações e a sua identificação pode contribuir para compreender as bases genéticas que influenciam o metabolismo, predizendo alvos que não seriam identificados racionalmente. Por meio da evolução adaptativa aliada às tecnologias ômicas, trabalhos anteriores conseguiram identificar mutações em vias metabólicas distintas que estariam influenciando o metabolismo da xilose (Kwak & Jin, 2017). Santos e colaboradores (2016) relataram que mutações de perda de função no gene *ISU1*, um gene mitocondrial envolvido na formação de clusters de ferro-enxofre (Fe-S), e *SSK2*, componente da via MAPKKK, resultam na melhora do consumo da xilose em cepas evoluídas expressando a via XI. Em outro trabalho, Sato e colaboradores (2016), observaram efeitos epistáticos entre *HOG1*, que está envolvido na osmorregulação, *ISU1* e *IRA2*, no consumo de xilose em cepas evoluídas. Mais recentemente, Palermo e colaboradores (2021) relataram que além do *ISU1*, deleções nos genes *CCC1*, envolvido no transporte vacuolar Fe^{2+} / Mn^{2+} , e *BSD2*, envolvido na homeostase de metais pesados, resultam no aumento de taxas de consumo de xilose.

A descoberta de novos alvos genéticos em metabolismos não óbvios visando otimizar a fermentação de açúcares vem se mostrando relevante para

entender a complexa rede regulatória envolvida no consumo de xilose em *S. cerevisiae*. No presente trabalho, buscamos explorar a relação entre três metabolismos distintos envolvendo *ZWF1* (componente da fase oxidativa da via PPP), *CLN3* (ciclina responsável pela transição da fase G1-S no ciclo celular) (Shi et al., 2023; Liu et al., 2019) e genes envolvidos na formação de clusters de Fe-S. Tais genes foram identificados em trabalhos anteriores do grupo de trabalho, onde mutações identificadas durante eventos de evolução adaptativa em xilose foram descritas. Até o presente momento, não há trabalhos que relatem o envolvimento de variantes mutantes desses dois genes no metabolismo de xilose em *S. cerevisiae* expressando a via XI.

Metodologia

Meios de cultivo e linhagens utilizadas

A linhagem C5TY de *S. cerevisiae* foi utilizada como base em todos os experimentos (Palermo et al., 2021). A cepa possui múltiplas cópias do gene *xyIA* de *Orpinomyces* sp, deleção do gene *GRE3* e superexpressão dos genes da fase não oxidativa da via das pentoses fosfato *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1*. Para o cultivo, foi usado o meio YP (1% extrato de levedura, 2% peptona) suplementado com xilose ou glicose. Os antibióticos higromicina (200 mg/L), geneticina (200 mg/L), nourseotricina (100mg/L) foram adicionados quando necessário para a seleção das linhagens mutantes.

Transformação de leveduras

Para a inserção dos cassetes de deleção e os plasmídeos do sistema CRISPR/Cas, foi utilizado o método de acetato de lítio descrito por Gietz e Schiestl (2007). Após o crescimento overnight, um pré-inóculo foi transferido para 50 mL de YPD e cultivado sob 200 rpm/ 30°C por 4 horas, tempo estimado para duas duplicações. A cultura foi centrifugada a 2500 rpm e o pellet foi lavado 3x. As células foram ressuspensas com 1mL de 1x TELiAc e incubadas em 30° C por 45 minutos. O DNA para a transformação foi concentrado à vácuo (speed vacuum) e o DNA de esperma de salmão foi desnaturado a 100° C por 10 minutos. Para a reação de transformação, 200 ul de células competentes de levedura foram adicionados a 10 uL

do DNA concentrado, 12 uL do DNA carreador desnaturado e 600 uL de solução PEG 40%. Na reação controle, o DNA concentrado foi substituído por água. As células foram incubadas por 45 minutos sob agitação de 200 rpm e 30° C. Foram adicionados na solução 70 uL de DMSO, seguida de choque-térmico a 42° C por 25 minutos. Por fim, as células foram centrifugadas, ressuspensas com água e plaqueadas em meio seletivo.

Extração do DNA genômico (gDNA) de levedura

A extração do gDNA foi realizada conforme descrito em Ausubel et al. (2003). Após crescimento overnight em 5 mL de YPD sob agitação 30 °C/ 200 rpm, as células foram transferidas e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 200 ul de tampão de lise, 0,3 g de beads (~200 µl volume) e 200 ul de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura foi submetida a rigorosa agitação e centrifugação. O sobrenadante foi transferido e o DNA foi precipitado com NaOAc (3 M pH 5,2) e 2x o volume de álcool 100% a 4 °C. Após centrifugação, o pellet foi lavado com etanol 70% e ressuspensado em água.

Construção das cepas *knockout*

Mutantes individuais para a deleção dos genes *ZWF1* e *CLN3* foram construídos por meio de recombinação homóloga com cassetes de deleção *hphMX6* (Goldstein & McCusker, 1999; Chen et al., 2015), amplificados com primers contendo regiões de homologia para os genes alvo. Os cassetes foram amplificados usando o plasmídeo pAG32 como *template* e os *amplicons* foram usados na transformação. As colônias mutantes de *zwf1Δ::hph* e *cln3Δ::hph* foram selecionadas em YPD, suplementado com 200 mg/L de higromicina e confirmados por PCR. Também foram construídos mutantes duplos *ZWF1/ISU1* e *CLN3/ISU1* com o objetivo de avaliar uma possível epistasia entre os alvos. Para essa segunda etapa de deleção, os mutantes *zwf1Δ::hph* e *cln3Δ::hph* foram usados como cepas base para a deleção do *ISU1*. Esta deleção foi realizada por recombinação homóloga com o cassete *KanMX4* (Wach et al., 1994; Kim et al., 2017), amplificado no plasmídeo pFA6KanMX4, e usando primers com sequências de homologia para as regiões *upstream* e *downstream* de *ISU1*. Os mutantes duplos foram selecionados em YPD (200 mg/L de geneticina) e confirmados por PCR.

Inserção e confirmação dos SNPs

Para avaliar o efeito das mutações pontuais em *ZWF1* e *CLN3*, utilizamos o sistema CRISPR/Cas9 (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012; Meng et al., 2020) para a inserção dos SNPs nas cepas *knockouts* derivadas de C5TY. Foram usados como cepas base os mutantes *zwf1Δ::hph* e *cln3Δ::hph*, gerados no presente estudo. Para a estratégia aplicada, foram utilizados dois plasmídeos, pJACas-K, que expressa a Cas9 e confere resistência a geneticina, e o plasmídeo multicópia pJASPR6, que transcreve dois sgRNA que direcionam à clivagem dupla do gene de resistência à higromicina (comunicação pessoal - os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelos pesquisadores Prof^a. Dra. Ana Paula Jacobus e Prof. Dr. Jeferson Gross da Unesp). Inicialmente os plasmídeos foram eletroporados em *E. coli* DH5α e extraídos pelo kit QIAprep Spin. Utilizamos como DNA donor as sequências dos genes alvos amplificados da cepa parental evoluída, usando primers que anelam em regiões *upstream* e *downstream*.

Na primeira etapa, os mutantes *zwf1Δ::hph* e *cln3Δ::hph* foram transformados com pJACas-K e selecionados em YPD (200 mg/L de geneticina). Em seguida, as colônias resistentes foram transformadas com pJASPR6 e o DNA donor. Por fim, os transformantes foram selecionados em meio YPD suplementado com geneticina (200 mg/L) e nourseotricina (100 mg/L). Para identificar falsos positivos, as colônias selecionadas foram amplificadas com um par de primers que anela na região *upstream* do gene alvo e na região promotora do gene de resistência, usando como controles a cepa parental e as cepas *knockouts*. As colônias que não amplificaram foram identificadas como positivas para a inserção do donor e sequenciadas por Sanger na facility de sequenciamento do LNBR. As sequências foram visualizadas no software Unipro Ugene (Protsyuk et al., 2015) e comparadas com a sequência selvagem.

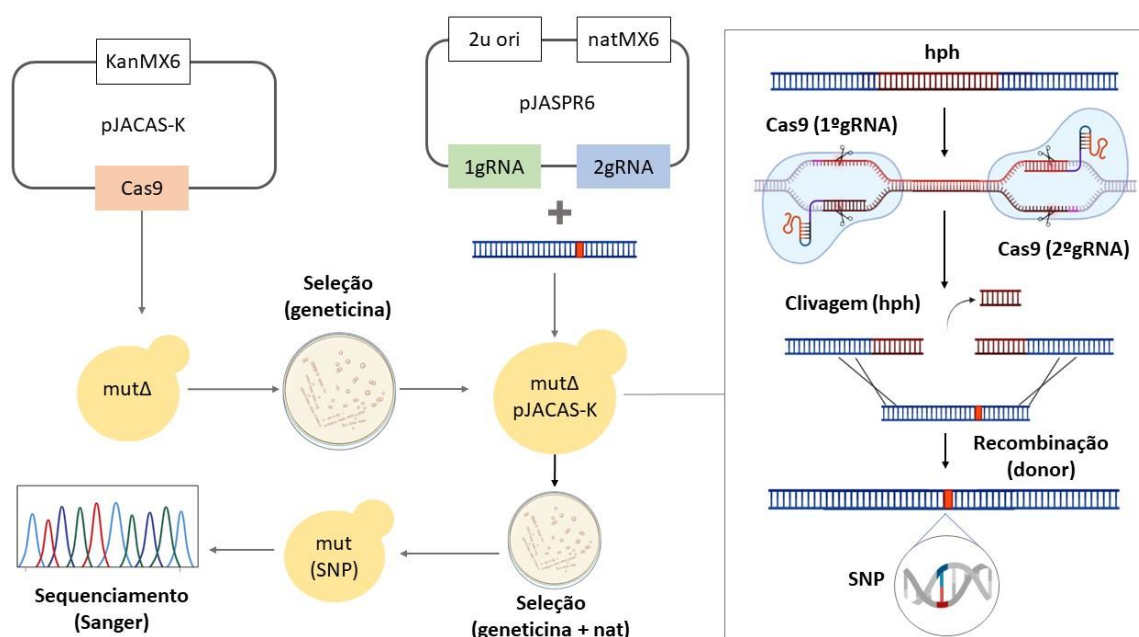


Figura 16: Design experimental da estratégia de inserção e confirmação dos SNPs. Através do sistema CRISPR/Cas9, o *locus* alvo é substituído pela sequência *donor* contendo o SNP de interesse.

Ensaio fermentativos

Para os ensaios fermentativos, foi usado meio YP suplementado com 50 g/L de xilose, em condições semi-anaeróbicas, iniciando a cultura com OD de ~1. As fermentações foram conduzidas em garrafas seladas de 100ml com 70 mL de volume de trabalho, com temperatura e agitação de 30° C e 200 rpm, respectivamente. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e 1 mL do fermento foi coletado para medir OD e para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Procedimentos analíticos

A quantificação de glicose, xilose, xilitol, glicerol e etanol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando o cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414) e arranjo de diodos (Waters 2998). As amostras foram analisadas utilizando coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm, BioRad®), aquecida em forno a 35 °C, H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Uma curva padrão com as concentrações conhecidas com compostos de interesse foi analisada pelo mesmo procedimento. As concentrações dos compostos nas amostras foram determinadas

por comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos com as curvas de calibração.

RESULTADOS

Em trabalho anterior do grupo de trabalho, uma cepa evoluída para o consumo de xilose teve o seu genoma sequenciado e mutações pontuais (SNPs) foram identificadas nos genes *ZWF1* (*glu192asp*), componente da fase oxidativa da via das pentoses fosfato, e *CLN3* (*frameshift variant*), principal ciclina envolvida na transição da fase G1/S durante o ciclo celular. Com a hipótese de que as mutações identificadas nesses genes podem estar relacionadas com o aumento das taxas observadas no consumo de xilose, esse capítulo teve como objetivo a validação molecular com cepas *knockouts* para *ZWF1* e *CLN3* e com a introdução pontual dos SNPs identificados.

Deleção dos genes *ZWF1* e *CLN3*

Para a construção dos mutantes, foi utilizada a plataforma C5TY (C5 – Trial Yeast) (Palermo et al., 2021). A linhagem C5TY possui múltiplas cópias do gene que codifica a xilose isomerase *xylA* de *Orpinomyces sp*, deleção do gene *GRE3* e superexpressão dos genes da fase não oxidativa da via das pentoses fosfato. A cepa não possui nenhuma mutação adicional, sendo uma plataforma ideal para testes de SNPs e outros tipos de mutações relacionadas ao metabolismo de xilose.

As deleções dos genes alvo foram realizadas usando estratégias de recombinação homóloga, onde as ORFs dos genes foram substituídas pelo cassete *hphMX6* que contém o gene marcador *hph*, o qual confere resistência a higromicina (Goldstein & McCusker, 1999). Os cassetes foram amplificados usando o plasmídeo pAG32 como *template* e primers contendo 42 pb de homologia para regiões *upstream* e *downstream* dos genes alvos. As amplificações foram confirmadas por eletroforese, sendo posteriormente utilizadas na transformação.

As células transformadas foram plaqueadas em meio YPD (200 mg/L de higromicina) e as colônias selecionadas tiveram o gDNA extraído para a confirmação molecular por PCR. A confirmação utilizou uma combinação das reações: (1) primers com sequência de anelamento externo ao gene alvo e (2) primers de anelamento para

o gene marcador. A eletroforese revelou a presença de bandas (figura 17) de tamanhos esperados para os mutantes *zwf1Δ::hph* (2160 pb) e *cln3Δ::hph* (2118 pb).

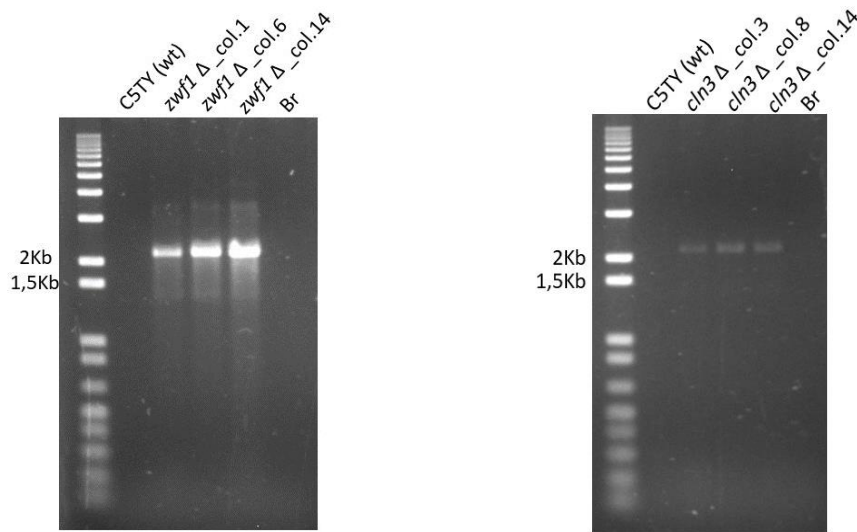


Figura 17: Gel de agarose com a confirmação dos mutantes knockouts de *ZWF1* (esquerda) e *CLN3* (direita). PCR com os primers Check_ZWF1_F + KanR: 2238 pb (a); primers CLN3 F + Kan R: 2118 (b). Ao todo foram testadas três colônias isoladas de cada transformação.

Foi observado que os mutantes *knockout* para *CLN3* apresentavam alteração de fenótipo com aumento do tamanho celular sob observação microscópica (figura 18). Estudos anteriores (Di Talia et al., 2007; Sonifer & Barkai, 2014), demonstraram que as ciclinas *CLN* estão envolvidas na regulação do tamanho celular da levedura *S. cerevisiae*, sendo que deleções no gene *CLN3* estão vinculadas ao aumento do tamanho celular, como consequência do alongamento da fase de transição G1/S (Teufel et al., 2019).

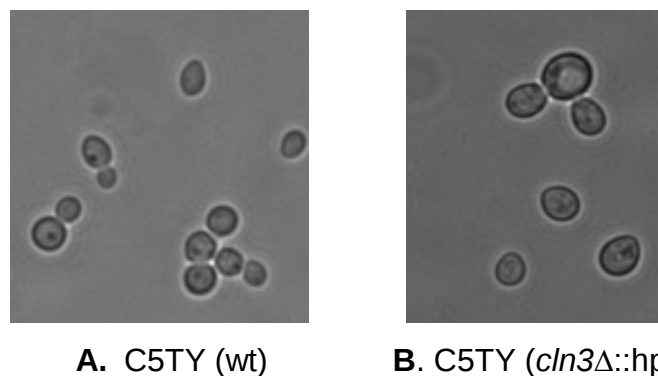


Figura 18: Microscopia óptica comparando o diâmetro celular entre a cepa selvagem (A) e o mutante *cln3Δ* (B).

Tabela 5. Linhagens de levedura utilizadas neste estudo.

Linhagem	Genótipo relevante	Referência
C5TY	LVY-X5; mutações WT restituídas	Palermo et al. 2021
C5TY_ <i>zwf1</i> Δ	C5TY; <i>zwf1</i> Δ:: <i>hph</i>	Este estudo
C5TY_ <i>cln3</i> Δ	C5TY; <i>cln3</i> Δ:: <i>hph</i>	Este estudo
C5TY_ <i>zwf1</i> Δ/ <i>isu1</i> Δ	C5TY; <i>zwf1</i> Δ:: <i>hph</i> / <i>isu1</i> Δ:: <i>Kan</i>	Este estudo
C5TY_ <i>cln3</i> Δ/ <i>isu1</i> Δ	C5TY; <i>cln3</i> Δ:: <i>hph</i> / <i>isu1</i> Δ:: <i>Kan</i>	Este estudo
C5TY_ <i>ZWF1</i> (SNP)	C5TY; <i>ZWF1</i> - <i>glu192asp</i>	Este estudo
C5TY_ <i>CLN3</i> (SNP)	C5TY; <i>CLN3</i> - frameshift variant	Este estudo

Construção do duplo mutante – interações epistáticas

Além dos SNPs presentes em *ZWF1* e *CLN3*, a cepa evoluída originalmente apresentou também uma mutação pontual que gerou a perda de função do gene *ISU1*, o qual está envolvido na formação de clusters de ferro-enxofre mitocondriais (Palermo et al., 2021). Efeitos benéficos na deleção do gene *ISU1* para a fermentação de xilose já foram reportados em cepas de *S. cerevisiae* expressando a via de isomerização da xilose (Sato et al., 2016; Santos et al., 2016; Palermo et al., 2021). Com o objetivo de investigar possíveis eventos de epistasia entre a perda de função do gene *ISU1* com as deleções de *ZWF1* e *CLN3*, foram geradas linhagens duplo mutantes *zwf1*Δ/*isu1*Δ e *cln3*Δ/*isu1*Δ. Para construção dos duplo mutantes, foi utilizado como cepa base as linhagens *knockout* C5TY_*zwf1*Δ::*hph* e C5TY_*cln3*Δ::*hph*, e o gene *ISU1* foi deletado através da recombinação homóloga com o cassete *KanMX4*, o qual confere resistência à geneticina. O cassete *KanMX4* foi amplificado com o par de primers Del_Kan_ISU1 F/R (figura 19A), que adicionam uma cauda de homologia de ~40 pb com as regiões *upstream* e *downtream* do gene *ISU1*.

Os transformantes foram plaqueados em meio YPD (200 mg de geneticina), onde foi observado o crescimento de colônias transformantes que posteriormente foram confirmadas por PCR. Para a confirmação molecular dos duplos mutantes, foram utilizados uma combinação de primers Check_ISU1_F e Kan para os mutantes *cln3*Δ/*isu1*Δ (figura 19B) e o par de primers Check_ISU1_F/R para os mutantes *zwf1*Δ/*isu1*Δ (figura 19C).

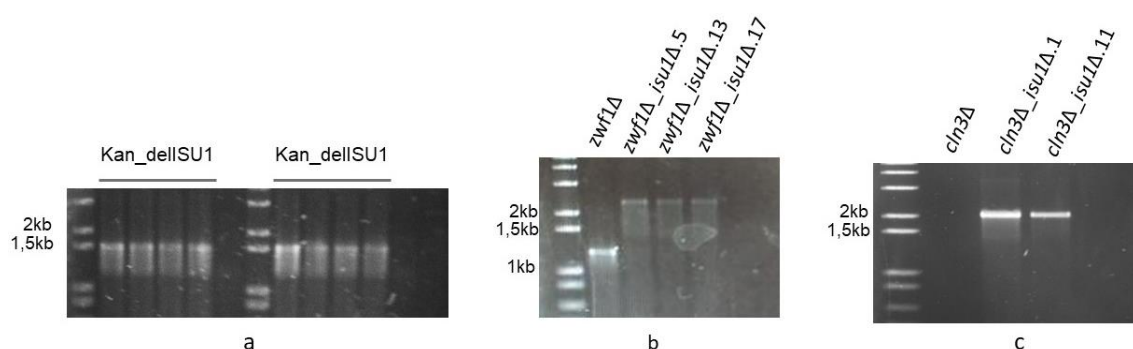


Figura 19: Confirmação molecular dos duplos mutantes. (a) Gel de agarose confirmando a amplificação do cassete de deleção Del_Kan_ISU1 (~1,5 kb); (b) confirmação do mutante duplo *zwf1Δ/isu1Δ* (2339 pb), WT (1264 pb); (c) confirmação do mutante duplo *cln3Δ/isu1Δ* (2036pb).

Inserção dos SNPs

Em trabalho anterior, foi desenvolvido uma linhagem modificada de *S. cerevisiae* com alta taxa específica de consumo de xilose. Após sequenciamento genômico, foram identificadas mutações no gene *ZWF1*, com a troca de uma guanina (G) para uma adenina (A) (*glu192asp*), além da adição de uma citosina (C) no gene *CLN3*, resultando numa alteração no quadro de leitura do gene (*frameshift variant*). Para validar os efeitos destas mutações no metabolismo microbiano e a específica relação com o consumo de xilose, variações dos genes alvos contendo os SNPs identificados na linhagem parental foram inseridos nos mutantes derivados de C5TY - *zwf1Δ::hph* e *cln3Δ::hph*. Para a inserção dos SNPs, foi usada uma estratégia tendo como base o sistema CRISPR/Cas (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012).

O sistema adotado utiliza um set de plasmídeos construídos para facilitar etapas de modificação genética em *S. cerevisiae*, com um vetor contendo a Cas9, o pJACas-K, e o plasmídeo multicópias pJASPR6, contendo sítios para dois gRNAs que direcionam a clivagem do gene de resistência *hph* em dois pontos diferentes (comunicação pessoal). Estratégias de CRISPR/Cas mediadas por 2 gRNAs já foram relatadas como sendo eficientes na clivagem de sequências alvo. Utilizando 2 gRNAs, Tang e colaboradores (2018) conseguiram uma eficiência de 100 % em *knockouts* de fragmentos de DNA com tamanho de até 3500 bp.

As variantes dos genes *ZWF1* e *CLN3*, com seus respectivos SNPs, foram amplificados do gDNA da linhagem evoluída e os *amplicons* foram utilizados como *donors* para a edição do genoma da C5TY com base no sistema CRISPR/Cas9. Expressando o sistema CRISPR/Cas9, mediado pelos 2 gRNAs, ocorre a clivagem na

ORF do gene *hph* e sua substituição pelo o *donor* (gene de interesse com SNP) pelo mecanismo de recombinação homóloga.

Na primeira etapa, as linhagens mutantes C5TY_*zwf1Δ::hph* C5TY_*cln3Δ::hph* foram transformadas com o plasmídeo pJACas-K. O plasmídeo pJACas-K possui um marcador que confere resistência à geneticina, o que possibilitou a seleção dos transformantes em meio YPD suplementado com geneticina (200 mg /L). Na segunda etapa, as linhagens contendo o plasmídeo com a Cas foram transformadas com os amplicons dos genes mutantes *ZWF1*(SNP) e *CLN3*(SNP) e o plasmídeo pJASPR6, que além dos gRNAs, possui o marcador que confere resistência ao antibiótico nourseotricina (Goldstein & McCusker, 1999). Os transformantes foram plaqueados em meio YPD suplementado com nourseotricina e as colônias resistentes foram selecionadas para posterior confirmação fenotípica e molecular da perda do gene *hph* e inserção dos genes *ZWF1* e *CLN3* contendo os SNPs.

Confirmação da inserção dos SNPs

Partindo da premissa que as linhagens transformadas com o sistema CRISPR/Cas9 perdem a resistência à higromicina, as colônias de transformantes foram estriadas em meio YPD com higromicina (200 mg/L). Nenhuma das colônias testadas conseguiu crescer no meio com antibiótico. Para confirmar molecularmente a presença de falso positivo (transformantes com a ORF *hph* clivada mas sem inserção do *donor*), foi realizada uma PCR. O gDNA de cinco colônias de cada linhagem de transformantes foi extraído e posteriormente amplificado com primers *forward* que anelam na região *upstream* dos genes de interesse e um primer reverse que anela na região terminadora do gene de resistência. Das linhagens testadas, duas de cada foram amplificadas, o que sugere a não inserção do donor. Entre as linhagens onde não foi observada amplificação, foi realizado o sequenciamento por Sanger com o suporte da *facility* do LNBR. O sequenciamento confirmou a presença do SNP correto nos transformantes (figura 20).



Figura 20: Sequenciamento das linhagens e confirmação da inserção do SNP. Exemplo com a identificação do SNP em *ZWF1* e comparação com a sequência da cepa parental evoluída.

Fermentação

Para avaliar a influência das variantes mutantes dos genes *ZWF1* e *CLN3* em relação ao consumo de xilose, os mutantes construídos por deleção, e com a integração contendo as mutações do tipo SNP, foram usados na fermentação em YPX (50 g/L de xilose). Foram utilizados como controles as linhagens i. parental e ii. a cepa C5TY com a deleção do gene *ISU1*, visando avaliar possíveis eventos epistáticos. Os resultados revelaram que o duplo mutante *zwf1Δ/isu1Δ* cresceu mais rapidamente em relação aos demais mutantes, alcançando o platô em ~24 horas (figura 21). Os mutantes *CLN3* tiveram um crescimento mais lento em comparação a cepa parental, resultado este esperado devido ao atraso no ciclo celular durante a transição das fases G1/S. A linhagem com a deleção do *ZWF1* cresceu de maneira mais eficiente que o parental C5TY, enquanto a linhagem com o SNP no mesmo gene teve o crescimento semelhante ao controle parental.

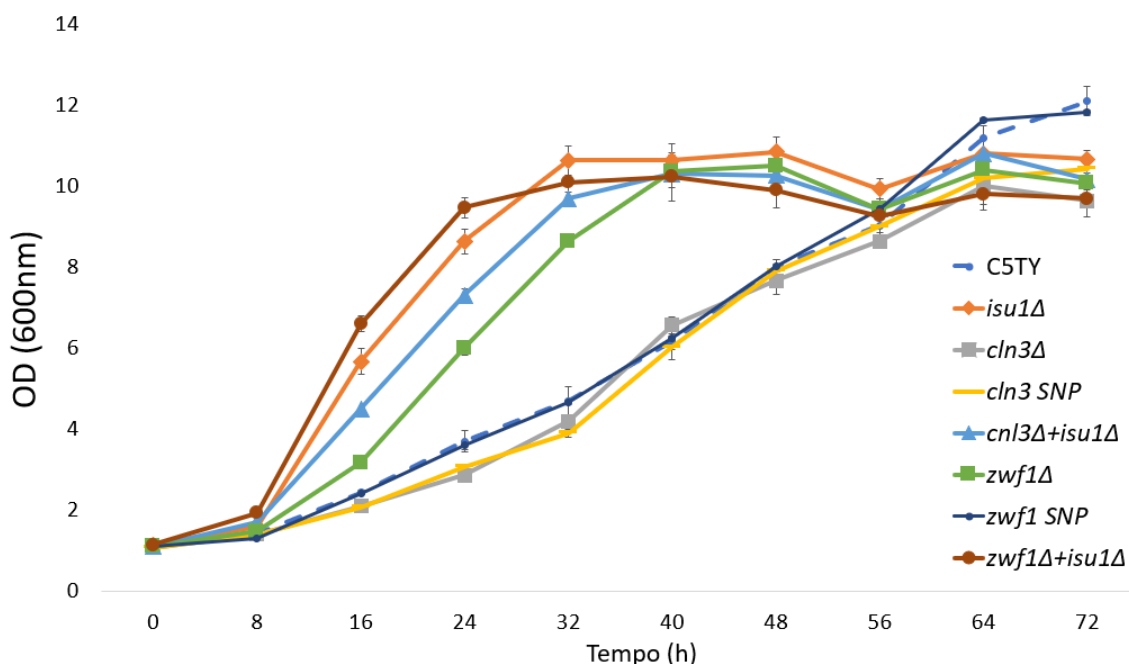


Figura 21: Crescimento celular dos mutantes *ZWF1* e *CLN3* em comparação a cepa parental (C5TY) e o mutante *ISU1*. O crescimento da linhagem controle C5TY está representado pela linha pontilhada.

A partir dos dados de consumo de xilose e produção de etanol, observou-se que todos os mutantes *knockout* do alvo *ZWF1* tiveram aumento do consumo em comparação com a cepa parental (figura 22), sugerindo que a perda de função para esse gene foi benéfica para o consumo de xilose. Curiosamente, o SNP identificado em *ZWF1* não apresentou diferença significativa durante a maior parte da curva de

consumo, sendo observado diferenças apenas na fase final da fermentação. Possivelmente, a mutação identificada nesse gene não afetou drasticamente a atividade da proteína.

A combinação de modificações introduzidas no mutante *zwf1Δ/isu1Δ* demonstrou ter o melhor fitness, consumindo 50 g/L de xilose em menos de 32 horas. Tal performance fermentativa foi superior ao identificado pelas duas mutações *zwf1Δ* e *isu1Δ* isoladas, o que representa um significativo avanço na construção de leveduras visando a utilização de xilose. Tal resultado sugere um sinergismo entre as duas mutações no consumo de xilose.

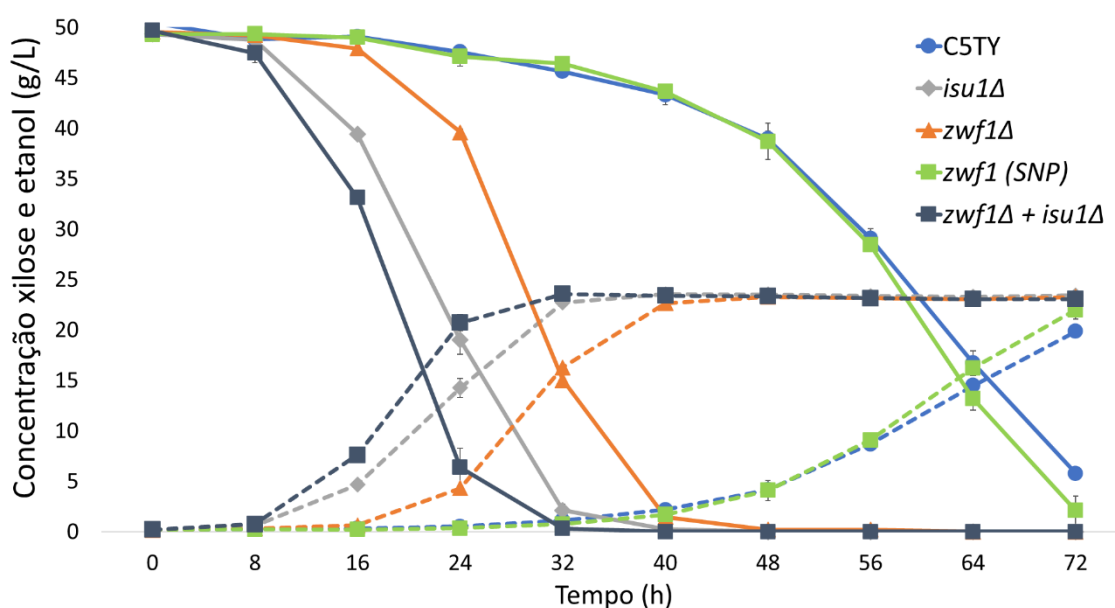


Figura 22: Consumo de xilose e produção de etanol nos mutantes *ZWF1* em comparação com a cepa parental (C5TY) e o mutante *isu1Δ*. A sinergia das mutações *zwf1Δ/isu1Δ* resultou na linhagem com maior taxa específica de consumo de xilose e produção de etanol.

Em relação ao alvo *CLN3*, todos os mutantes *knockouts* e com SNP apresentaram taxas de consumo e produção superiores a cepa parental (figura 23) (tabela 6). Surpreendentemente, o mutante com a deleção do gene *CLN3* consumiu a xilose e produziu etanol mais rapidamente do que a cepa contendo o SNP. Esse resultado sugere que o SNP identificado não resulta em uma total perda de função da ciclina *CLN3*. Contudo, não foi observado uma diferença relevante entre o duplo mutante *cln3Δ/isu1Δ* em relação a cepa mutante *isu1Δ*.

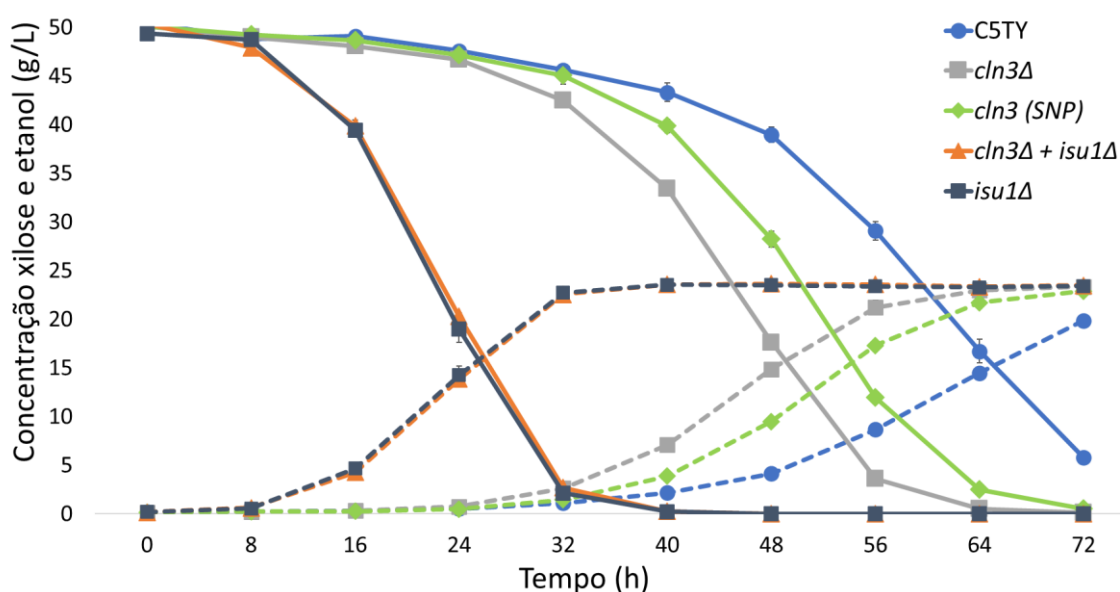


Figura 23: Consumo de xilose e produção de etanol nos mutantes *CLN3* em comparação com a cepa parental (C5TY) e o mutante *isu1Δ*. Mutantes *CLN3* apresentaram melhores taxas de conversão de xilose. A interação com *ISU1* não resultou em aumento na velocidade de consumo de xilose.

Tabela 6. Desempenho de fermentação das cepas mutantes em YPX (50 g/L de xilose). Os valores representam as médias de três repetições biológicas $\pm$ desvio padrão entre 0 e 32 h.

Cepa	Taxa máxima de crescimento específico (h ⁻¹)	Produtividade de etanol (g/L.h ⁻¹)	Rendimento de etanol por substrato (g/g ⁻¹)
C5TY	0,0592 $\pm$ 0,0016	0,046 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,03
<i>zwf1Δ</i>	0,088 $\pm$ 0,0018	0,805 $\pm$ 0,01	0,466 $\pm$ 0,00
<i>zwf1</i> (SNP)	0,0636 $\pm$ 0,0014	0,029 $\pm$ 0,00	0,197 $\pm$ 0,01
<i>cln3Δ</i>	0,0433 $\pm$ 0	0,123 $\pm$ 0,00	0,326 $\pm$ 0,03
<i>cln3Δ</i> (SNP)	0,049 $\pm$ 0,001	0,064 $\pm$ 0,00	0,257 $\pm$ 0,04
<i>isu1Δ</i>	0,105 $\pm$ 0,0018	1,12 $\pm$ 0,01	0,478 $\pm$ 0,00
<i>zwf1Δ</i> + <i>isu1Δ</i>	0,1101 $\pm$ 0,004	1,17 $\pm$ 0,00	0,474 $\pm$ 0,00
<i>cln3Δ</i> + <i>isu1Δ</i>	0,091 $\pm$ 0,0012	1,12 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,00

Discussão

A identificação de bases genéticas e novos alvos moleculares visando redesenhar o metabolismo microbiano apresenta grande potencial biotecnológico e tal informação pode ser diretamente aplicada na construção de plataformas microbianas eficientes, além de ajudar na compreensão dos mecanismos que regulam o metabolismo de interesse. Estratégias de evolução adaptativa associadas com avanços em tecnologias ômicas possibilitaram a descoberta de novas mutações que podem auxiliar no design racional de novas cepas (Sato et al., 2016, Santos et al., 2016, Palermo et al., 2021). O presente trabalho explorou os efeitos de mutações em novos alvos inéditos visando otimizar o consumo de xilose pela via de isomerização.

A via das pentoses fosfato (PPP) compreende uma importante rede metabólica dividida em dois ramos, uma fase oxidativa, envolvida na geração de NADPH, e outra fase não oxidativa, importante na síntese de ribose-5-P e eritrose-5-P, precursores de nucleotídeos e aminoácidos aromáticos, respectivamente (Stincone et al., 2014). O catabolismo da xilose se relaciona com a via PPP através do intermediário xilulose-5-fosfato que entra na fase não oxidativa, direcionando o fluxo para a glicólise e posterior produção de etanol (Bertels et al., 2021). No presente trabalho, demonstramos que a deleção no primeiro gene da fase oxidativa, o gene *ZWF1*, está relacionada com a melhora no consumo de xilose, alcançando um rendimento de 0,466 g de etanol por g de xilose, um aumento de 2,45 vezes maior que o parental teste C5TY. O gene *ZWF1* é o primeiro gene da fase oxidativa, responsável por codificar a desidrogenase G6PD, que redireciona o fluxo da glicólise para a PPP por meio da conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconolactona, o que resulta na regeneração do NADPH citoplasmático (Kwak et al., 2020).

Trabalhos anteriores demonstraram que os níveis de expressão dos genes da fase não oxidativa da via PPP estão envolvidos na otimização das taxas de consumo de xilose, sendo limitantes para a fermentação em cepas modificadas (Hasunuma et al., 2014; Kobayashi et al., 2017). Vilela e colaboradores (2015) relataram que as maiores taxas de consumo de xilose, em cepas evoluídas expressando a via XI, eram relacionadas, em parte, ao aumento da expressão do gene *TAL1*. Avaliando os efeitos da superexpressão dos genes PPP, Kobayashi e colaboradores (2018) observaram que linhagens com a superexpressão de *TKL1* apresentavam perfil superior no consumo de xilose, com aumento de até 1,66 vezes em comparação ao parental. Os pesquisadores também descreveram que uma cepa

S. cerevisiae com superexpressão nos genes *TKL1*, e superexpressão dos genes heterólogos *TAL1* e *RKI1* de *K. marxianus*, obteve aumento de 1,83 vezes no consumo de xilose.

Diferente do presente trabalho, a superexpressão do gene *ZWF1* já foi relatada em cepas contendo a via oxi-redutiva XR-XDH como uma estratégia para otimizar o consumo de xilose por meio do aumento dos níveis de NADPH para a enzima xilose redutase (Jo et al. 2015; Zha et al. 2014). Liu e colaboradores (2017) conseguiram aumentar o consumo de xilose por meio da superexpressão do *ZWF1*. Contudo, o aumento da expressão também levou ao acúmulo de xilitol, o que consequentemente reduziu o rendimento final de etanol. Jeppsson e colaboradores (2003) relataram que a redução da atividade do gene *ZWF1* reduziu o rendimento de xilitol e aumentou até 5,1 vezes o consumo específico de xilose em comparação com o gene deletado. Contudo, as cepas com menor atividade de *ZWF1* também cresceram mais lentamente em hidrolisado lignocelulósico e foram mais sensíveis ao H_2O_2 em comparação ao selvagem. A influência do gene *ZWF1* no consumo de xilose é relatado por ser a principal via metabólica de produção de NADPH para a xilose redutase. Contudo, não existem muitas informações sobre a influência do *ZWF1* em cepas contendo a via de isomerização, a qual independe do uso de cofatores. Dados de transcriptômica em cepas fermentadoras de xilose com a via XI já revelaram uma diminuição na atividade do gene *ZWF1* durante o consumo de xilose (Palermo et al., 2021), o que pode indicar um possível ajuste metabólico visando otimizar a conversão.

Análises transcricionais realizadas por Qi e colaboradores (2015), obtidas em cepas evoluídas expressando a via XI, também observaram uma redução na atividade do gene *ZWF1*, o que pode indicar uma regulação negativa na parte oxidativa durante o catabolismo da xilose. A redução nos níveis de expressão na fase oxidativa pode ser uma resposta a fonte de carbono disponível no meio. Diferentemente da glicose que é direcionada para via PPP através da fase oxidativa, pentoses como xilose e arabinose entram no fluxo PPP por meio da fase não oxidativa, sem a formação de NADPH (Masi et al., 2021), indicando uma preferência na regulação positiva a fase não oxidativa. Contudo, a produção de NADPH é vital para outras reações bioquímicas, como na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Nguyen et al., 2014). Mutantes *zwf1* Δ não tiveram seu *fitness* afetado durante o crescimento em meio rico YPX. Curiosamente, em ensaios avaliando a sensibilidade de mutantes nulos PPP em resposta ao estresse oxidativo, Krüger e

colaboradores (2011) observaram que cepas *S. cerevisiae* duplos mutantes nulos para *ZWF1* e *TAL1* apresentaram maior sensibilidade a H₂O₂ em comparação a mutantes únicos *ZWF1*. No mesmo trabalho, os autores relataram que mutantes *TKL1* ou *RPE1* também apresentaram sensibilidade a H₂O₂, e que cepas com aumento no fluxo na fase não oxidativa apresentaram maior resistência a ROS. Estes estudos podem indicar que os mecanismos de regulação ao estresse podem ser mais complexos, incluindo vias além da fase não oxidativa da PPP.

Blank e colaboradores (2005) analisaram o fluxo metabólico em cepas mutantes *ZWF1* não fermentadoras de xilose e relataram a ocorrência de uma alteração no fluxo da via PPP não oxidativa para a produção de eritrose-4-fosfato e ribulose-5-fosfato. A via fornece precursores para diversos metabolismos, além do aumento do fluxo da enzima málica, o que compensaria os baixos níveis de NADPH (Blank et al., 2005). O aumento das taxas de eritrose-4-fosfato e ribulose-5-fosfato podem indicar uma atividade positiva na fase não oxidativa. É possível que a inativação de *ZWF1*, ou mesmo a redução da sua expressão, induzam indiretamente a regulação positiva dos genes da fase não oxidativa. Esses dados podem sugerir que o aumento do consumo de xilose observado nos mutantes *ZWF1*, construídos no presente trabalho, pode ser consequência da adaptação da via PPP não oxidativa, em resposta a inativação da fase oxidativa, aumentando o fluxo para o metabolismo de xilulose-5-P e consequentemente beneficiando o consumo de xilose. Observamos que a cepa com o SNP em *ZWF1* teve uma performance de fermentação semelhante ao parental, o que indica que a mutação não configura mudança relevante para o consumo de xilose nas condições testadas. Esse resultado pode ser atribuído ao tipo de aminoácido alterado, sendo que o SNP investigado resulta na troca de glutamina por ácido aspártico. Ambos os aminoácidos possuem cadeia lateral de carga negativa. Dessa maneira, a mudança do aminoácido pode não estar afetando de forma significativa a estrutura final da proteína. O nosso grupo relatou anteriormente que mutações de perda de função no gene *ISU1* melhoram o catabolismo de xilose em *S. cerevisiae*. Uma hipótese possível do efeito benéfico na deleção do *ISU1* pode estar relacionada ao aumento da disponibilidade de ferro intracelular em cepas *isu1Δ*, o que poderia otimizar a atividade da metaloenzima XI, contribuindo para o consumo de xilose. Embora outras hipóteses tenham sido abordadas pelos autores (Santos et al., 2016). Observamos que o duplo mutante *zwf1Δ/ isu1Δ* consumiu de forma mais eficiente a xilose em comparação aos mutantes únicos. Propomos que a interação

epistática encontrada neste duplo mutante pode ser uma relação entre o efeito positivo causado pela deleção do *ISU1* e o fluxo ampliado na fase não oxidativa da PPP, por consequência de um remodelamento metabólico em resposta a inativação da fase oxidativa. Posteriormente serão realizados mais experimentos para avaliar a sensibilidade das cepas mutantes, além da quantificação de intermediários metabólicos da via em resposta a perda do gene *ZWF1* durante o consumo de xilose.

Outros ensaios serão necessários para identificar a causa do aumento na velocidade de conversão de xilose em mutantes *CLN3*. O gene *CLN3* está envolvido em uma complexa rede regulatória responsável por coordenar os eventos de divisão em *S. cerevisiae* (Johnson & Skotheim, 2013). Esse gene codifica uma ciclina G1 do ciclo celular, responsável por ativar a quinase Cdc28p, a qual promove a transição da fase G1 para S (Cross & Blake, 1993; Sommer et al., 2021). O acúmulo da ciclina Cln3p no núcleo ativa Cdc28p, formando o complexo Cln3p/Cdc28p. Esse complexo fosforila o repressor Whi5p, promovendo a ativação do fator transcricional SBF (Swi4, Swi6), o qual ativa a transcrição das ciclinas *CLN1* e *CLN2*. As ciclinas atuam na fosforilação de Whi5p, contribuindo para a retroalimentação positiva da transição G1-S (Skotheim et al., 2008; Haase & Wittenberg et al., 2014).

A interrupção na transição da fase G1-S limita a divisão celular e produção de biomassa em relação a célula parental. Já foi relatado anteriormente na literatura que a perda de função em *CLN3* resulta no atraso da expressão das ciclinas *CLN1* e *CLN2*, aumentando o tempo da célula na fase G1 e resultando em um aumento do tamanho celular (Zhang et al., 2002; Shi & Tu, 2013). Apesar de *CLN3* ser a principal ciclina responsável pela progressão da fase G1-S, cepas mutantes *cln3Δ* conseguem viabilizar o ciclo celular pela expressão de *BCK2*, o qual atua como um mecanismo alternativo através da ativação de genes do ciclo celular, independentemente da Cdc28p e da interação com a subunidade Swi6 do complexo SBF (Ferrezuelo et al., 2009; Barber et al., 2020). Trabalhos avaliando o papel de *BCK2* na divisão celular demonstraram que o duplo mutante *cln3Δ/bck2Δ* era letal para as células e a superexpressão de *BCK2* suprimia a letalidade em mutantes *cln1Δ/cln2Δ/cln3Δ* (Bastajian et al., 2013). Desta forma, os mutantes *CLN3* foram capazes de viabilizar a proliferação celular, mas com um atraso na progressão da fase G1-S.

A repressão na fase G1-S ocorre pelo fator transcricional MBF (Mbp1, Swi6), o qual é ativado tardiamente pelo complexo Cln3/Cdc28p (Wittenberg & Reed, 2005). Por sua vez, MBF ativa o gene *NRM1*, o qual codifica uma proteína repressora

responsável por fosforilar Swi6 (Travesa et al., 2013). Wei e colaboradores (2018) observaram que a superexpressão de *NRM1* aumentou o consumo de xilose em cepas de *S.cerevisiae*, além de possibilitar o aumento de 35,4% na taxa de consumo de xilose em meio misto (20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose). Os autores também relataram que a deleção de *NRM1* reduziu a taxa de consumo específico da xilose em 79,6% em meio com a mistura dos açúcares.

A via RAS/cAMP/pKA, envolvida na regulação pós-traducional de uma grande variedade de proteínas, já foi previamente associada ao metabolismo de xilose. Sato et al. (2016) identificou uma interação epistática entre os genes *ISU1*, *GRE3*, *HOG1* e *IRA2* que potencializou a fermentação de xilose em *S. cerevisiae*. O regulador negativo *IRA2* já foi descrito como sendo necessário para a progressão da fase G1 para S do ciclo celular, modulando o tamanho da célula (Tamanoi, 2011; Belotti et al., 2012).

Mesmo apresentando menor crescimento, os mutantes *CLN3* exibiram maiores taxas de consumo e maior rendimento de etanol por xilose. Futuras investigações serão feitas visando elucidar o papel dessas mutações no metabolismo de xilose.

REFERÊNCIAS

ADEGBOYE MF, OJUEDERIE OB, TALIA PM, BABALOLA OO. Bioprospecting of microbial strains for biofuel production: metabolic engineering, applications, and challenges. *Biotechnol Biofuels*. (2021).

ALTHOR G, WATSON JE, FULLER RA. Global mismatch between greenhouse gas emissions and the burden of climate change. *Sci Rep*. (2016).

ARGUESO, J. L. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res*. 19, 2258–2270 (2009).

AUESUKAREE C, DAMNERNSAWAD A, KRUATRACHUE M, POKETHITIYOOK P, BOONCHIRD C, KANEKO Y, HARASHIMA S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet.*, 301–310 (2009).

AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K, WILEY CJ, ALLISON RD, BITTNER M, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, (2003).

BARBER F, AMIR A, MURRAY AW. Cell-size regulation in budding yeast does not depend on linear accumulation of Whi5. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 14243-14250 (2020).

BASTAJIAN N, FRIESEN H, ANDREWS BJ. Bck2 acts through the MADS box protein Mcm1 to activate cell-cycle-regulated genes in budding yeast. *PLoS Genet*. (2013).

BECKER J, BOLES E. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 4144-4150 (2003).

BEN-IWO J, MANOVIC V, LONGHURST P. Biomass resources and biofuels potential for the production of transportation fuels in Nigeria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 172-192 (2016).

BERTELS LK, MURILLO FL, HEINISCH JJ. The pentose phosphate pathway in yeasts-more than a poor cousin of glycolysis. *Biomolecules*. (2021).

BETTIGA M, BENGTSSON O, HAHN-HÄGERDAL B, GORWA-GRAUSLUND M.F. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. *Microb Cell Fact*. (2009).

BLANK LM, KUEPFER L, SAUER U. Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biol*. (2005).

BORNEMAN AR, DESANY BA, RICHES D, AFFOURTIT JP, FORGAN AH, PRETORIUS IS, EGHOLM M, CHAMBERS PJ. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. (2011).

BRACHER JM, VERHOEVEN MD, WISSELINK HW, CRIMI B, NIJLAND JG, DRIESSEN AJM, KLAASSEN P, VAN MARIS AJA, DARAN JG, PRONK JT. The *Penicillium chrysogenum* transporter *PcAraT* enables high-affinity, glucose-insensitive l-arabinose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. (2018).

BUENO JGR, BORELLI G, CORRÊA TLR, FIAMENGHI MB, JOSÉ J, DE CARVALHO M, DE OLIVEIRA LC, PEREIRA GAG, DOS SANTOS LV. Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations. *Biotechnol Biofuels*. (2020).

BUDZINSKI M, NITZSCHE R. Comparative economic and environmental assessment of four beech wood based biorefinery concepts. *Bioresour Technol*. (2016).

CABALLERO A, RAMOS JL. Enhancing ethanol yields through d-xylose and l-arabinose co-fermentation after construction of a novel high efficient l-arabinose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Microbiology.*, 442-452 (2017).

CAGNIN L, GRONCHI N, BASAGLIA M, FAVARO L, CASELLA S. Selection of Superior Yeast Strains for the Fermentation of Lignocellulosic Steam-Exploded Residues. *Front Microbiol.*, (2021).

CUNHA JT, SOARES PO, ROMANÍ A, THEVELEIN JM, DOMINGUES L. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnol Biofuels.* (2019).

CURCIO MJ, LUTZ S, LESAGE P. The Ty1 LTR-retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr*, 1-35 (2015).

DEMEKE, M. M., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., DUMORTIER, F. & THEVELEIN, J. M. Rapid evolution of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation through formation of extra-chromosomal circular DNA. *PLoS Genet.* 11, 1–21 (2015).

DEPRISTO MA, BANKS E, POPLIN R, GARIMELLA KV, MAGUIRE JR, HARTL C, PHILIPPAKIS AA, DEL ANGEL G, RIVAS MA, HANNA M, MCKENNA A, FENNELL TJ, KERNYTSKY AM, SIVACHENKO AY, CIBULSKIS K, GABRIEL SB, ALTSHULER D, DALY MJ. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 491–498 (2011).

DI TALIA S, SKOTHEIM JM, BEAN JM, SIGGIA ED, CROSS FR. The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature*, 947-51 (2007).

DOS SANTOS LV, CARAZZOLLE MF, NAGAMATSU ST, SAMPAIO NM, ALMEIDA LD, PIROLLA RA, BORELLI G, CORRÊA TL, ARGUESO JL, PEREIRA GA. Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Sci Rep.* (2016a).

DOS SANTOS LV, GRASSI MCB, GALLARDO JCM, PIROLA RAS, Calderón LL, CARVALHO-NETTO OV, PARREIRAS LS, CAMARGO ELO, DREZZA AL, MISSAWA SK, TEIXEIRA GS, LUNARDI I, BRESSIANI J, PEREIRA GAG. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. *Industrial Biotechnology.*, 40-57 (2016b).

DUSSELIER M, MASCAL M, SELS BF. Top chemical opportunities from carbohydrate biomass: a chemist's view of the Biorefinery. *Top Curr Chem.*, 1-40 (2014).

ENGEL SR, DIETRICH, FS, FISK DG, BINKLEY G, BALAKRISHNAN R, COSTANZO MC, DWIGHT SS, HITZ BC, KARRA K, NASH RS, WENG S, WONG ED, LLOYD P, SKRZYPEK MS, MIYASATO SR, SIMISON M, CHERRY JM. The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *G3*, 389–398 (2014).

ERICKSON LE. Reducing greenhouse gas emissions and improving air quality: Two global challenges. *Environ Prog Sustain Energy*, 982-988 (2017).

FANG Z, RICHARD L, SMITH, Jr. Production of biofuels and chemicals from lignin. Springer (2016).

FAY JC, BENAVIDES JA. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 66-71 (2005).

FENG Q, LIU ZL, WEBER SA, LI S. Signature pathway expression of xylose utilization in the genetically engineered industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* (2018).

FERNANDO S, ADHIKARI S, CHANDRAPAL C, MURALI N. Biorefineries: Current status, challenges and future direction. *Energy Fuels.*, 1727–1737 (2006).

FERREZUELO F, ALDEA M, FUTCHER B. Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle.*, 239-52 (2009).

GAO M, PLOESSL D, SHAO Z. Enhancing the Co-utilization of Biomass-Derived Mixed Sugars by Yeasts. *Front Microbiol.* (2019).

GIETZ RD, SCHIESTL RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc.*, 31-34 (2007).

GOLDSTEIN AL, MCCUSKER JH. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1541-53 (1999).

GORTER ARV, PRONK JT, DARAN J.G. Industrial Relevance of Chromosomal Copy Number Variation in *Saccharomyces* Yeasts. *Appl Environ Microbiol* (2017).

GREENWELL HC, LAURENS LML, SHIELDS RJ, LOVITT RW, FLYNN KJ. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interf.* 703–726 (2016).

HAASE SB, WITTENBERG C. Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. *Genetics.*, 65-90 (2014).

HAHN-HÄGERDAL B, KARHUMAA K, JEPSSON M, GORWA-GRAUSLUND MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*, 147–177 (2007).

HARA KY, KOBAYASHI J, YAMADA R, SASAKI D, KURIYA Y, HIRONO-HARA Y, ISHII J, ARAKI M, KONDO A. Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast Res.* (2017).

HASUNUMA T, ISMAIL KSK, NAMBU Y, KONDO A. Co-expression of *TAL1* and *ADH1* in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. *J Biosci Bioeng.*, 165-169 (2014).

HAZEENA SH, SINDHU R, PANDEY A, BINOD P. Lignocellulosic bio-refinery approach for microbial 2,3-Butanediol production. *Bioresour Technol.* (2020).

HO NW, CHEN Z, BRAINARD AP. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol.*, 1852-9 (1998).

HONG KK, NIELSEN J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. *Cell Mol Life Sci.*, 2671-90 (2012).

HU Y, ZHU Z, NIELSEN J, SIEWERS V. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Open Biol.* (2019).

Infopetro, 2016. Disponível em <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracaocelulose/opiniao-primeiras-plantas-comerciais-etanol-2g-quase-experimentais-081116/>. Acesso em julho de 2020.

JANG BK, JU Y, JEONG D, JUNG SK, KIM CK, CHUNG YS, KIM SR. L-Lactic Acid Production Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with Improved Organic Acid Tolerance. *J Fungi* (Basel) (2021).

JANSEN MLA, BRACHER JM, PAPAPETRIDIS I, VERHOEVEN MD, DE BRUIJN H, DE WAAL PP, VAN MARIS AJA, KLAASSEN P, PRONK JT. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res.* (2017).

JEFFRIES TW, VAN VLEET JRH. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.*, 793–807 (2009).

JEONG D, OH EJ, KO JK, NAM JO, PARK HS, JIN YS, LEE EJ, KIM SR. Metabolic engineering considerations for the heterologous expression of xylose-catabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* (2020).

JEPPSSON M, JOHANSSON B, JENSEN PR, HAHN-HÄGERDAL B, GORWA-GRAUSLUND MF. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast*, 1263-72 (2003).

JIN M, SLININGER PJ, DIEN BS, WAGHMODE S, MOSER BR, ORJUELA A, SOUSA LDA C, BALAN V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*, 43–54 (2015).

JO JH, OH SY, LEE HS, Park YC, SEO JH. Dual utilization of NADPH and NADH cofactors enhances xylitol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J.*, 1935-43 (2015).

JOHNSON A, SKOTHEIM JM. Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol.*, 717-23 (2013).

KAN H, CHEN B, HONG C. Health impact of air pollution in China: Current knowledge and future research needs, *Environmental Health Perspectives*. (2009).

KARHUMAA K, FROMANGER R, HAHN-HÄGERDAL B, GORWA-GRAUSLUND MF. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1039-46 (2007).

KARHUMAA K, WIEDEMANN, B, HAHN-HÄGERDAL B, BOLES E. GORWAGRAUSLUND, M.F. Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microbial Cell Factories*, 1–11 (2006).

KIM SR, PARK YC, JIN YS, SEO JH. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol Adv.*, 851-61 (2013).

KLAMBAUER G, SCHWARZBAUER K, MAYR A, CLEVERT DA, MITTERECKER A, BODENHOFER U, HOCHREITER S. Cn.MOPS: Mixture of poissons for discovering copy number variations in next-generation sequencing data with a low false discovery rate. *Nucleic Acids Research*, 1–14 (2012).

KLIMACEK M, KIRL E, KRAHULEC S, LONGUS K, NOVY V, NIDETZKY B. Stepwise metabolic adaption from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Microb Cell Fact. (2014).

KNOSHAUG EP, VIDGREN V, MAGALHÃES F, JARVIS EE, FRANDEN MA, ZHANG M, SINGH A. Novel transporters from *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia guilliermondii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* enable growth on L-arabinose and D-xylose. Yeast, 615-28 (2015).

KO N, NISHIHAMA R, PRINGL EJR. Control of 5-FOA and 5-FU resistance by *Saccharomyces cerevisiae* YJL055W. Yeast, 155-160 (2008).

KOBAYASHI Y, SAHARA T, SUZUKI T, KAMACHI S, MATSUSHIKA A, HOSHINO T, OHGIYA S, KAMAGATA Y, FUJIMORI KE. Genetic improvement of xylose metabolism by enhancing the expression of pentose phosphate pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 for high-temperature ethanol production. J Ind Microbiol Biotechnol. (2017).

KOBAYASHI Y, SAHARA T, OHGIYA S, KAMAGATA Y, FUJIMORI KE. Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. AMB Express. (2018).

KONG II, TURNER TL, KIM H, KIM SR, JIN YS. Phenotypic evaluation and characterization of 21 industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. FEMS Yeast Res. (2018).

KONG II, TURNER TL, KIM H, KIM SR, JIN YS. Phenotypic evaluation and characterization of 21 industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. FEMS Yeast Res. (2018).

KRÜGER A, GRÜNING NM, WAMELINK MMC, KERICK M, KIRPY A, PARKHOMCHUK D, BLUEMLEIN K, SCHWEIGER MR, SOLDATOV A, LEHRACH H, JAKOBS C, RALSER M. The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor

and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxidants & Redox Signaling.*, 311–324 (2011).

KUMAR, A, SINGH, J, CHINNAPPAN, B. Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Through Microbes: Strategies to Improve Process Efficiency. *Prospects of Renewable Bioprocessing in Future Energy Systems.* 357-386 (2019).

KUTLU L. Greenhouse Gas Emission Efficiencies of World Countries. *Int J Environ Res Public Health.* (2020).

KUYPER M, HARHANGI HR, STAVE AK, WINKLER AA, JETTEN MS, de LAAT WT, DEN RIDDER JJ, OP DEN CAMP HJ, VAN DIJKEN JP, PRONK JT. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.* 69-78 (2003).

KUYPER M, HARTOG MMP, TOIRKENS MJ, ALMERING MJH, WINKLER AA, VAN DIJKEN JP, PRONK JT. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Res.*, 399–409 (2005).

KWAK S, JIN YS. Production of fuels and chemicals from xylose by *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Fact of microbe cells.* (2017).

KWAK S, YUN EJ, LANE S, OH EJ, KIM KH, JIN YS. Redirection of the Glycolytic Flux Enhances Isoprenoid Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J.* (2020).

LANGMEAD B, SALZBERG SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods.* 357–359 (2012).

LI H, HANDSAKER b, WYSOKER A, FENNELL T, RUAN J, HOMER N, MARTH G, ABECASIS G, DURBIN R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2078-2079 (2009).

Li J, XU J, CAI P, WANG B, MA Y, BENZ JP, TIAN C. Functional analysis of two L-arabinose transporters from filamentous fungi reveals promising characteristics for improved pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 4062–70 (2015).

Li X, PARK A, ESTRELA R, KIM SR, JIN YS, CATE JH. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Rep (Amst)*, 53-56 (2016).

LIMAYEM A, RICKE S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 449–467 (2012).

LIU L, QU J, MARASENI TN, NIU Y, ZENG J, ZHANG L, XU L. Household CO₂ Emissions: Current Status and Future Perspectives. *Int J Environ Res Public Health* (2020).

LIU ZL, HUANG X, ZHOU Q, XU J. Protein expression analysis revealed a fine-tuned mechanism of in situ detoxification pathway for the tolerant industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 5781-5796 (2019).

LIU G, Li, B, Li, C et al. Enhancement of Simultaneous Xylose and Glucose Utilization by Regulating *ZWF1* and *PGI1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Tianjin Univ.*, 201–210 (2017).

LIU ZL, HUANG X, ZHOU Q, XU J. Protein expression analysis revealed a fine-tuned mechanism of in situ detoxification pathway for the tolerant industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 5781-5796 (2019).

MA Q, GAO X, BI X, XIA M, HAN Q, PENG M, TU L, YANG Y, SHEN Y, WANG M. Combination of steam explosion and ionic liquid pretreatments for efficient utilization of fungal chitin from citric acid fermentation residue. *Biomass Bioenerg.* (2021).

MANI MS, SANDHU SC, JOSHI G, VARMA B. India: Diagnostic Assessment of Select Environmental Challenges. Report No. 70004-IN, World Bank, South Asia Region, (2013).

MARTINS LC, MONTEIRO CC, SEMEDO PM, SÁ-CORREIA I. Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: potential and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 6527-6547 (2020).

MASI A, MACH RL, MACH-AIGNER AR. The pentose phosphate pathway in industrially relevant fungi: crucial insights for bioprocessing. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 4017-4031 (2021).

MONSHIZADEH, A. Influence of the molecular weight of cellulose on the solubility in ionic liquid-water mixtures. (2015).

MOYSÉS DN, REIS VC, de ALMEIDA JR, DE MORAES L.M., TORRES F.A. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *Int J Mol Sci.* (2016).

NARISSETTY V, MEERA C, KIRAN K, EULOGIO C, PARAMESWARAN B, ASHOK P. Pentose rich acid pretreated liquor as co-substrate for 1,3-propanediol production. *Renewable Energy.*, 794-799 (2018).

NARISSETTY V, COX R, BOMMAREDDY R, AGRAWAL D, AHMAD E, PANT KK, CHANDEL AK, BHATIA SK, KUMAR D, BINOD P, GUPTA VK, KUMAR V. Valorization of xylose to renewable fuels and chemicals, an essential step in augmenting the commercial viability of lignocellulosic biorefineries. *Sustain Energy Fuels*, 29-65 (2021).

NGUYEN NH, SUH SO, MARSHALL CJ, BLACKWELL M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol Res.*, 1232–1241 (2006).

NGUYEN TT, KITAJIMA S, IZAWA S. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng., 263-9 (2014).

NING P, YANG G, HU L, SUN J, SHI L, ZHOU Y, WANG Z, YANG J. Recent advances in the valorization of plant biomass. Biotechnol Biofuels. (2021).

OBAMA, B. The irreversible momentum of clean energy, *Science*, 126–129 (2017).

OEHLING, V., KLAASSEN, P., FRICK, O. et al. L-Arabinose triggers its own uptake via induction of the arabinose-specific Gal2p transporter in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. Biotechnol Biofuels 11, 231 (2018).

PALERMO GCL, COUTOUNÉ N, BUENO JGR, MACIEL LF, DOS SANTOS LV. Exploring metal ion metabolisms to improve xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. Microb Biotechnol., 2101-2115 (2021).

PARK H, JEONG D, SHIN M, KWAK S, OH EJ, Ko JK, KIM SR. Xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae* during conversion of hydrothermally pretreated lignocellulosic biomass to ethanol. Appl Microbiol Biotechnol., 3245-3252 (2020).

Promdonkoy P, Siripong W, Downes JJ, Tanapongpipat S, Runguphan W. Systematic improvement of isobutanol production from D-xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. AMB Express., (2019).

PAUL S, DUTTA B. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. Resour Conserv Recycl. (2018).

PRONK JT. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. Appl Environ Microbiol., 2095-2100 (2002).

QI X, ZHA J, LIU GG, ZHANG W, LI BZ, YUAN YJ. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. Front Microbiol. (2015).

RAGAUSKAS AJ, BECKHAM GT, Biddy MJ, CHANDRA R, CHEN F, DAVIS MF, DAVISON BH, DIXON RA, GILNA P, KELLER M, LANGAN P, NASKAR AK, SADDLER JN, TSCHAPLINSKI TJ, TUSKAN GA, WYMAN CE. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science*. (2014).

RICHARD P, VERHO R, PUTKONEN M, LONDESBOROUGH J, PENTTILÄ M. Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS Yeast Res*, 185-189 (2003).

ROBAK K, BALCEREK M. Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technol Biotechnol*, 174-187 (2018).

ROSEN J. The carbon harvest. *Science*, 733–737 (2018).

RUNQUIST D, FONSECA C, RÅDSTRÖM P, SPENCER-MARTINS I, HAHN-HÄGERDAL B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 123–130 (2009).

SAUER M, PORRO D, MATTANOVICH D, BRANDUARDI P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*, 100–108 (2008).

SATO TK, TREMAINE M, PARREIRAS LS, HEBERT AS, MYERS KS, HIGBEE AJ, SARDI M, MCILWAIN SJ, ONG IM, BREUER RJ, AVANASI NR, MCGEE MA, DICKINSON Q, LA REAU A, XIE D, Tian M, REED JL, ZHANG Y, COON JJ, HITTINGER CT, GASCH AP, LANDICK R. Directed Evolution Reveals Unexpected Epistatic Interactions That Alter Metabolic Regulation and Enable Anaerobic Xylose Use by *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. (2016).

SEDLAK M, HO NW. Expression of *E. coli araBAD* operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.*, 16-24 (2001).

SHI L, TU BP. Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin *CLN3* to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 7318-23 (2013).

SMICHI N, MESSAOUDI Y, ALLAF K, GARGOURI M. Steam explosion (SE) and instant controlled pressure drop (DIC) as thermo-hydro-mechanical pretreatment methods for bioethanol production. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 945–957 (2020).

SOIFER I, BARKAI N. Systematic identification of cell size regulators in budding yeast. *Mol. Syst. Biol.* (2014).

SOMMER RA, DEWITT JT, TAN R, KELLOGG DR. Growth-dependent signals drive an increase in early G1 cyclin concentration to link cell cycle entry with cell growth. *Elife.* (2021).

STINCONE A, PRIGIONE A, CRAMER T, WAMELINK MM, CAMPBELL K, CHEUNG E, OLIN-SANDOVAL V, GRÜNING NM, KRÜGER A, TAUQEER AM, KELLER MA, BREITENBACH M, BRINDLE KM, RABINOWITZ JD, RALSER M. The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the Pentose Phosphate Pathway. *Biol Rev camb philos Soc.*, 927-63 (2015).

SKOTHEIM JM, DI TALIA S, SIGGIA ED, CROSS FR. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature.*, 291–296 (2008).

SUBTIL T, BOLES E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* (2012).

SUBTIL T, BOLES E. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotechnology for Biofuels* (2011).

SUN L, JIN YS. Xylose Assimilation for the Efficient Production of Biofuels and Chemicals by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J.*, (2021).

SURESH S, SUDHAKAR k, PREMALATHA M. An Overview of CO₂ Mitigation Using

Algae Cultivation Technology. International Journal of Chemical Research, 110–117 (2011).

TEUFEL L, TUMMLER K, FLÖTTMANN M, HERRMANN A, BARKAI N, KLIPP E. A transcriptome-wide analysis deciphers distinct roles of G1 cyclins in temporal organization of the yeast cell cycle. Sci Rep. (2019).

TRAVESA A, KALASHNIKOVA TI, DE BRUIN RA, Cass SR, Chahwan C, Lee DE, Lowndes NF, Wittenberg C. Repression of G1/S transcription is mediated via interaction of the GTB motifs of Nrm1 and Whi5 with Swi6. Mol Cell Biol. 2013 Apr;33(8):1476-86.

TURNER, Timothy L.; KIM, H.; KONG, I.I.; LIU, J.J.; ZHANG, G.C.; JIN, Y.S. Engineering and Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to Produce Biofuels and Chemicals. Advances in Biochemical Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 175–215 (2016).

VASSILEV SV, BAXTER D, ANDERSEN LK, VASSILEVA CG, MORGAN T J. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass, 1–33 (2012).

VERHOEVEN MD, BRACHER JM, NIJLAND JG, BOUWKNEGT J, DARAN JG, DRIESSEN AJM, VAN MARIS AJA, PRONK JT. Laboratory evolution of a glucose-phosphorylation-deficient, arabinose-fermenting *S. cerevisiae* strain reveals mutations in *GAL2* that enable glucose-insensitive l-arabinose uptake. FEMS Yeast Res. (2018).

VERHOEVEN MD, DE VALK SC, DARAN JG, VAN MARIS AJA, PRONK JT. Fermentation of glucose-xylose-arabinose mixtures by a synthetic consortium of single-sugar-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. FEMS Yeast Res. (2018).

VILELA LF, DE ARAUJO VP, PAREDES RS, BON EP, TORRES FA, NEVES BC, ELEUTHERIO EC. Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. AMB Express. (2015).

VIVEK M, MEERA CM, KIRAN K, EULOGIO C, PARAMESWARAN B, ASHOK P. Pentose rich acid pretreated liquor as co-substrate for 1,3-propanediol production. *Renewable Energy.*, 794-799 (2018).

WAGNER ER, MYERS KS, RILEY NM, COON JJ, GASCH AP. PKA and HOG signaling contribute separable roles to anaerobic xylose fermentation in yeast engineered for biofuel production. *PLoS One.* (2019).

WANG C, LI Y, QIU C, WANG S, MA J, SHEN Y, ZHANG Q, DU B, DING Y, BAO X. Identification of Important Amino Acids in Gal2p for Improving the L-arabinose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.* (2017).

WANG C, SHEN Y, ZHANG Y, SUO F, HOU J, BAO X. Improvement of L-arabinose fermentation by modifying the metabolic pathway and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Res Int.* (2013).

WANG C, ZHAO J, QIU C, WANG S, SHEN Y, DU B, DING Y, BAO X. Couitilization of D-Glucose, D-Xylose, and L-Arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by Coexpressing the Metabolic Pathways and Evolutionary Engineering. *Biomed Res Int.* (2017).

WIEDEMANN B, BOLES E. Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.*, 2043-2050 (2008).

WILLIAMS JH, DE BENEDICTIS A, GHANADAN R, MAHONE A, MOORE J, MORROW WR, PRICE S, TORN, MS. The technology path to deep greenhouse gas emission cuts by 2050: The pivotal role of electricity, *Science*, 53–59 (2012)

WISSELINK, HW, TOIRKENS MJ, BERRIEL RF, WINKLER AA, VAN DIJKEN JP, PRONK JT, VAN MARIS AJ. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Efficient Anaerobic Alcoholic Fermentation of l-Arabinose. *Applied Environmental Microbiology*, 4881-4891 (2007).

YADAV P, ATHANASSIADIS D, YACOUT DMM, TYSKLIND M, UPADHYAYULA VKK. Environmental Impact and Environmental Cost Assessment of Methanol Production from wood biomass. *Environ Pollut.* (2020).

WITTENBERG C, REED SI. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene.*, 2746–2755 (2005).

YE S, JEONG D, SHON JC, LIU KH, KIM KH, SHIN M, KIM SR. Deletion of *PHO13* improves aerobic L-arabinose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 1725-1731 (2019b).

YE S, KIM JW, KIM SR. Metabolic Engineering for Improved Fermentation of L-Arabinose. *J Microbiol Biotechnol.*, 339-346 (2019a).

YIN Y, PETES TD. Genome-Wide High-Resolution Mapping of UV-Induced Mitotic Recombination Events in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* (2013).

YOUNG EM, TONG A, BUI H, SPOFFORD C, ALPER HS. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 131-6 (2014).

YOUNG E, LEE S, ALPER H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnology for Biofuels* (2010).

ZERBINO DR, BIRNEY E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 821–829 (2008).

ZHA J, YUWEN M, QIAN W, WU X. Yeast-Based Biosynthesis of Natural Products From Xylose. *Front Bioeng Biotechnol.*, (2021).

ZHANG J, TEN PIERICK A, VAN ROSSUM HM, SEIFAR RM, RAS C, DARAN JM, HEIJNEN JJ, WAHL SA. Determination of the Cytosolic NADPH/NADP Ratio in *Saccharomyces cerevisiae* using Shikimate Dehydrogenase as Sensor Reaction. *Sci Rep.* (2015).

ZHANG Y, LANE S, CHEN JM, HAMMER SK, LUTTINGER J, YANG L, JIN YS, Avalos JL. Xylose utilization stimulates mitochondrial production of isobutanol and 2-methyl-1-butanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. (2019).

ZHANG J, KOBERT, K FLOURI T, STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 614–620 (2014).

ZHENG Y, ZHAO J, XU F, LI Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogasproduction. *Prog Energy Combust*, 35-53 (2014).

ZHOU H, CHENG JS, WANG BL, FINK GR, STEPHANOPOULOS G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 611–622 (2012).

ANEXO I



Campinas, 08 de setembro de 2020

Para Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

Ref. Declaração de Biossegurança

Prezado coordenador, declaramos para fins do programa de pós-graduação que **Paulo Emílio dos Santos Costa**, desenvolve seu projeto de pesquisa associado a sua tese, intitulada "**Elucidação das bases moleculares da fermentação de arabinose e xilose em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***", sob orientação do prof. Dr. **Leandro Vieira dos Santos**. O projeto utiliza organismos geneticamente modificados classe de risco I, cumprindo os requisitos de biossegurança necessários, que integram o protocolo CIBio 2017-15, o qual foi **APROVADO** para execução no CNPEM.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Leandro Vieira dos Santos
Orientador

Dr. Marcio Chaim Bajgelman
Presidente da CIBio - CNPEM