



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

BEATRIZ DE OLIVEIRA VARGAS

**ENGENHARIA GENÉTICA E EVOLUTIVA DE LEVEDURAS
INDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

**CAMPINAS
2022**

BEATRIZ DE OLIVEIRA VARGAS

**ENGENHARIA GENÉTICA E EVOLUTIVA DE LEVEDURAS
INDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Co-orientador: Dr. Fellipe da Silveira Bezerra de Mello

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA BEATRIZ DE
OLIVEIRA VARGAS E ORIENTADA PELO
PROFESSOR DR. GONÇALO
AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA.

CAMPINAS

2022

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

V426e Vargas, Beatriz de Oliveira, 1994-
Engenharia genética e evolutiva de leveduras industriais para produção de etanol de segunda geração / Beatriz de Oliveira Vargas. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Coorientador: Fellipe da Silveira Bezerra de Mello.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Aldeídos. 3. Xilose isomerase. 4. Engenharia metabólica. 5. Etanol 2G. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Mello, Fellipe da Silveira Bezerra de, 1990-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic and evolutionary engineering of industrial yeasts for second generation ethanol production

Palavras-chave em inglês:

Saccharomyces cerevisiae

Aldehydes

Xylose isomerase

Metabolic engineering

2G ethanol

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Elizabeth Bilsland

Líbia Diniz Santos

Data de defesa: 05-08-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4756-7701>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3983895104665126>

Campinas, 5 de agosto de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira – Presidente
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Elizabeth Bilsland
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Líbia Diniz Santos
Universidade Federal de Uberlândia

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 Genética e Biologia Molecular na Unidade do Instituto de Biologia.

*Dedico este trabalho a
minha família, que acreditou
e apoiou este sonho, mesmo
que para isso tínhamos que
ficar distantes.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência.

Ao orientador, Professor Doutor Gonçalo Amarante, por confiar em mim e acreditar no meu potencial para desenvolver esse trabalho, pelos conselhos durante todas as etapas e por me instigar a abrir os olhos para novos horizontes.

Ao coorientador Dr. Fellipe Mello, por me ensinar o amor pela pesquisa, pela paciência nas vezes que errei e por participar ativamente do meu amadurecimento durante todas as etapas desenvolvidas desse projeto.

Ao Professor Doutor Marcello Carazzolle, pela confiança no meu trabalho e por acompanhar com otimismo todas as etapas do projeto, sendo um ponto de luz sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos comigo.

À equipe responsável pela administração do Laboratório de Genômica e BioEnergia (LGE): Welbe Bragança, Eliane Laranja Dias e Ana Paula Ferreira, por terem me auxiliando de várias maneiras por diversas vezes.

Aos colegas do LGE que por tantas formas me ajudaram durante esse projeto, em especial a Jade Ribeiro, Juliana Galhardo, Monique Furlan, Thais Secches, Frank Soares, Caroline Torres, Lucas Miguel, ultrapassando as barreiras profissionais e se tornando amigos queridos.

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, aos seus professores, funcionários e alunos, que tornam possível a expansão da formação acadêmica, profissional e pessoal.

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

A Sinochem Petróleo Brasil Ltda, pelo apoio financeiro sem o qual este projeto não teria sido possível.

Aos meus amigos César Helly, Nicollas Mello, Ailton Pereira e Willian Elias, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes de alguma forma.

A Guilherme Araújo, por aceitar e me abraçar durante essa fase.

A minha família, minha base, tudo para mim.

Obrigada.

RESUMO

O etanol de segunda geração, produzido pela fermentação de pentoses presentes em material lignocelulósico, surge como uma alternativa promissora para a obtenção de energia a partir de recursos renováveis, especialmente em um cenário de preocupação ambiental. Contudo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada para fermentação industrial, é incapaz de consumir naturalmente a xilose, tornando necessário a expressão heteróloga de enzimas – preferencialmente xiloses isomerases (XI) – que possibilitam a metabolização desse açúcar. Logo, a engenharia metabólica que permita a expressão de XI funcionais e eficientes em *S. cerevisiae* é um ponto crítico para viabilização da produção de etanol celulósico. Neste contexto, foi construída uma plataforma para teste e expressão de novas XI em *S. cerevisiae* a partir do cruzamento das linhagens FMY097 e LVY27 – segregantes haploides derivadas das cepas industriais SA-1 e PE-2, respectivamente. Finalmente, foi obtida a linhagem BVY008, apresentando fenótipo de resistência à até 40 mM de 5-hidroximetilfurfural e modificações genéticas para superexpressão de genes da via da pentose fosfato não oxidativa (*TAL1*, *RKI1*, *TKL1* e *RPE1*) e do gene *XKS1*, além da deleção do gene *GRE3*. Paralelamente, foram prospectadas *in silico* 14 novas sequências que codificam xilose isomerases potencialmente funcionais, dentre as quais três (XI-05, XI-11, XI-12) possibilitaram o crescimento aeróbio em xilose e duas (XI-11 e XI-12) apresentaram a capacidade de fermentar xilose e produzir etanol, a partir de expressão episomal. Os genes XI-05 e XI-11 foram integradas no genoma da plataforma BVY008 desenvolvida para melhora do fenótipo a partir de abordagens de evolução adaptativa. Desta forma, a descoberta de novas XI funcionais em *S. cerevisiae* fornece um excelente ponto de partida para obtenção de novas linhagens fermentadoras de xilose utilizando o *background* robusto de cepas industriais.

ABSTRACT

Second-generation ethanol, produced by the fermentation of pentoses present in lignocellulosic material, appears as a promising alternative for obtaining energy from renewable resources, especially in a scenario of environmental concern. However, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, widely used for industrial fermentation, is unable to naturally consume xylose, requiring the heterologous expression of enzymes – preferably xyloses isomerases (XI) – that allow the metabolism of this sugar. Therefore, metabolic engineering that allows the expression of functional and efficient XI in *S. cerevisiae* is a critical point for the viability of cellulosic ethanol production. In this context, a platform was built to test and express new XI in *S. cerevisiae* from the crossing of FMY097 and LVY27 strains – haploid segregants derived from industrial strains SA-1 and PE-2, respectively. Finally, the BVY008 strain was obtained, presenting a phenotype of resistance to up to 40 mM of 5-hydroxymethylfurfural and genetic modifications for the overexpression of genes of the non-oxidative pentose phosphate pathway (*TAL1*, *RKI1*, *TKL1* and *RPE1*) and of the *XKS1* gene, in addition to the deletion of the *GRE3* gene. At the same time, 14 new sequences encoding potentially functional xylose isomerases were prospected in silico, among which three (XI-05, XI-11, XI-12) enabled aerobic growth in xylose and two (XI-11 and XI-12) showed the ability to ferment xylose and produce ethanol from episomal expression. The genes XI-05 and XI-11 were integrated into the genome of the BVY008 platform developed to improve the phenotype from adaptive evolution approaches. Thus, the discovery of new functional XI in *S. cerevisiae* provides an excellent starting point for obtaining new xylose fermenting strains using the robust background of industrial strains.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1	BIOETANOL.....	11
1.2	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	12
1.3	INIBIDORES DE FERMENTAÇÃO	14
1.4	<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	15
2	JUSTIFICATIVA	18
3	CAPÍTULO I: Xylose to ethanol: Genetic Engineering strategies for improved performance in <i>S. cerevisiae</i>	19
	Resumo	19
	ABSTRACT	21
3.1	INTRODUCTION	21
3.2	THE XYLOSE PATHWAYS	23
3.2.1	The oxireductive	23
3.2.2	The isomerase.....	24
3.2.3	Endogenous	27
3.3	REWIRING METABOLIC PATHWAYS	28
3.3.1	Deletions.....	29
3.3.2	Superexpression.....	33
3.3.3	Regulation Fine Tuning	36
3.4	COFACTORS	39
3.5	TRANSPORTERS	41
3.6	POLYMORPHISMS.....	46
3.7	REFERENCE	48
4	CAPÍTULO II: Desenvolvimento de uma linhagem de <i>S. cerevisiae</i> para fermentação industrial de xilose	65
	Resumo	65
4.1	INTRODUÇÃO	66
4.2	OBJETIVOS	70
4.3	OBJETIVO GERAL.....	70
4.3.1	Objetivos específicos.....	70
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.4.1	Cepas e plasmídeos.....	71
4.4.2	Meios e condições de crescimento	72
4.4.3	Biologia molecular geral	73
4.4.3.1	Amplificações de DNA e digestões de DNA	73
4.4.3.2	Montagem e clonagem de vetores	74
4.4.3.3	Abordagens de transformação	75
4.4.3.4	Extração e confirmação de DNA	75
4.4.4	Acasalamento e análises de mating type.....	75
4.4.5	Esporulação e coleta de segregantes	76
4.4.6	Teste <i>Spot</i> em 5-hidroximetilfurfural (HMF)	76
4.4.7	Fenotipagem <i>high-throughput</i> e seleção dos segregantes	77
4.4.8	Prospecção de novas XI.....	77
4.4.9	Crescimento aeróbico das XI	77
4.4.10	Fermentações.....	78

4.4.11	Análise de composição de analito.....	78
4.4.12	Engenharia evolutiva	78
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.5.1	Obtenção do diploide e confirmação do genótipo.....	79
4.5.2	Seleção do haploide	83
4.5.2.1	Fenotipagem high throughput de segregantes BVY003.....	83
4.5.2.2	Genotipagem de segregantes BVY003	86
4.5.2.3	Caracterização do haploide selecionado.....	87
4.5.2.4	Fenotipagem do haploide BVY003.351	88
4.5.3	Construção de <i>background</i> robusto para metabolizar xilose	88
4.5.3.1	Deleção do gene <i>GRE3</i>	89
4.5.3.2	Superexpressão do gene <i>XKS1</i>	90
4.5.4	Prospecção de novas xiloses isomerasas funcionais	95
4.5.4.1	Identificação de XI funcionais por análise <i>in silico</i>	95
4.5.4.2	Síntese, montagem e inserção de plasmídeos das XI	96
4.5.4.3	Avaliação e seleção das XI	96
4.5.5	Engenharia evolutiva	99
4.6	CONCLUSÃO.....	101
4.7	PERSPECTIVAS FUTURAS	102
4.8	REFERÊNCIAS	102
5	CONCLUSÃO GERAL.....	109
6	REFERÊNCIAS.....	110
7	Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética	116

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Bioetanol

Problemas ambientais como o aquecimento global e a crise energética estimularam a busca e o desenvolvimento de novas fontes de energia a partir de recursos renováveis e sustentáveis, como os biocombustíveis. Os biocombustíveis são quaisquer combustíveis produzidos partir de matéria orgânica de origem animal ou vegetal[1], [2]. Um desses biocombustíveis é o bioetanol, obtido a partir da fermentação microbiana de carboidratos de plantas ou algas, apresentando uma classificação considerando a matéria-prima utilizada na produção, bem como sua perspectiva tecnológica[1], [3]. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol combustível, atrás apenas dos Estados Unidos. Em 2021, a produção mundial de etanol atingiu cerca de 27 bilhões de galões, 15 bilhões de galões produzidos pelos Estados Unidos, seguido do Brasil com 7,5 bilhões de galões[4].

Na produção de etanol de primeira geração (1G) são utilizadas culturas alimentares com altas frações sacaríneas e amiláceas como substratos para o processo fermentativo[5]. Embora a produção de etanol 1G seja um processo muito bem estabelecido, sendo este o principal biocombustível líquido produzido no mundo[6], há certas ressalvas nessa tecnologia. A principal preocupação é associada a disponibilidade limitada de terras para geração de energia devido a competição com a agricultura por terras agrícolas usadas para produção de alimentos, sendo este gargalo estendido a todos os substratos utilizados na produção desse biocombustível. A fim de evitar tal conflito, bem como possíveis limitações na oferta de etanol, tornou-se necessário investir em novas tecnologias [7]–[10].

Na tecnologia de etanol de segunda geração (2G) utilizam-se os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica[11] enquanto no etanol de terceira geração emprega-se a biomassa de algas como substrato[12]. A utilização de resíduos agroindustriais - matéria-prima abundante e de baixo custo - para produção de etanol 2G surgiu como uma alternativa interessante para atender a demanda global de energia, não oferecendo competição com a indústria alimentícia ou de ração para consumo animal[13], [14]. No entanto, os biocombustíveis de segunda e terceira geração ainda podem ser encontrados em etapa de pesquisa e desenvolvimento, a

fim de tornar economicamente viável tais processos, enquanto a tecnologia 1G já é um processo mundialmente consolidado[8], [15].

A produção de biocombustíveis ganhou visibilidade na década de 80 no Brasil, com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). O Proálcool, foi implementado em 1975, consistindo em uma iniciativa governamental, visando intensificar a produção de etanol para substituir combustíveis derivados do petróleo, sendo uma resposta brasileira à crise petrolífera ocorrida em 1973[16]. Em 2005, o governo brasileiro sugeriu metas ambiciosas no acordo climático de Paris na Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima, sendo estas atualizadas em maio do presente ano: mitigar as emissões de gases de efeito estufa em 50% até 2030 em relação a 2005 e, como objetivo a longo prazo, alcançar a neutralidade climática até 2050[17]. Para cumprir tais metas, uma das estratégias utilizadas, foi a implementação do programa de Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), instituído pela Lei 13.576/2017, com o objetivo de aumentar a participação de biocombustíveis na matriz energética brasileira[18]. No ano de 2021, 365 unidades de usinas de etanol estavam ativas: 343 usinas de etanol de cana-de-açúcar, 7 usinas de etanol de milho, 12 usinas flex produzindo etanol de cana-de-açúcar e/ou milho e 3 refinarias de etanol lignocelulósico[19].

No Brasil, utiliza-se principalmente o caldo da cana-de-açúcar, enquanto nos Estados Unidos e na Europa, se destacam como principais matérias-primas o amido de milho e a sacarose da beterraba, respectivamente[20]. Na indústria, durante o processamento da cana-de-açúcar, o bagaço produzido nas moendas e, eventualmente, a palha são coletados e usados como fontes de energia nas caldeiras, gerando vapor e eletricidade a fim de suprir a necessidade energética durante o processo. Entretanto, somente uma quantidade pequena de material é empregado para cogeração de energia em usinas de cana-de-açúcar, sendo a maior parte queimado em campo[21], [22]. Logo, o aproveitamento de tais resíduos industriais tornou-se importante do ponto de vista ecológico, indicando a necessidade de um novo fim para esse material. Atualmente, a capacidade avançada de produção de etanol 2G em usinas brasileiras é estimada em 75 milhões de litros[19].

1.2 Composição da Biomassa Lignocelulósica

Os principais constituintes da biomassa lignocelulósica são celulose, hemiceluloses, lignina e outros materiais inorgânicos. A celulose é um polímero linear, não ramificado, formado por monômeros de D-glicose conectadas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo envolvida em uma bainha de hemicelulose e uma rede de lignina[23]. As fibras desse homopolissacarídeo são unidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, gerando uma estrutura cristalina altamente ordenada, sendo interrompida por regiões amorfas[24], [25]. Diferente da celulose, a hemicelulose é um heteropolissacarídeo mais curto altamente ramificado composto por monômeros de hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose). Além disso, em sua composição existem ácidos de açúcar chamados ácidos urônicos, incluindo o α -D-glucurônico, α -D-galacturônico e α -D-galacturônico[26]. Já a lignina é uma matriz polimérica amorfa, insolúvel em água e responsável por fornecer um reforço estrutural e resiliência ao tecido vegetal. Esse biopolímero polifenólico apresenta em sua composição unidades estruturais p-hidroxifenil, guaiacil e siringil unidas por ligações éter e por ligações carbono-carbono entre essas unidades estruturais, tornando à lignina uma estrutura complexa e irregular[24], [25], [27]. Os polímeros de celulose e hemicelulose são conectados por ligações de hidrogênio e covalentes, sendo ambas ligadas à lignina formando-se uma matriz complexa e altamente recalcitrante à desconstrução[13].

No entanto, as composições do material lignocelulósico apresentam proporções variáveis de acordo com a espécie de planta. A fim de ser utilizada para obtenção de um bom rendimento de etanol e eficiência na conversão de açúcares, a biomassa utilizada deve apresentar alto teor de celulose e hemicelulose bem como, baixo teor de lignina[28]. A cana-de-açúcar, principal fonte de material lignocelulósico para produção de etanol brasileiro, apresenta em sua composição cerca de 40-45% de celulose, 30-35% de hemicelulose e 20-30% de lignina[29]. Devido a esses três componentes formarem uma matriz extremamente recalcitrante, é exigindo pré-tratamento quando a biomassa lignocelulósico é utilizada na produção de bioetanol[29].

A etapa de pré-tratamento permite fragmentar e aumentar a área de contato com os polímeros presentes no material[30]. Os métodos comuns de pré-tratamento do bagaço da cana incluem processos físicos e termoquímicos que realizam o rompimento da matriz celular, transformando as estruturas lignocelulósicas complexas em polímeros simples (celulose, hemicelulose e lignina)[14]. Esse pré-tratamento

possibilita a retirada da lignina, preservação das hemiceluloses, diminuição da cristalinidade da celulose e melhora a porosidade do material. Além disso, a utilização de um processo de pré-tratamento eficiente pode potencializar a formação de açúcares diretamente por hidrólise, reduzir a degradação de açúcares e minimizar a formação de compostos inibitórios durante o processo[31]–[33]. Após a etapa de pré-tratamento, é realizado um processo de hidrólise (enzimática ou química), onde celulases e hemicelulases atuam na liberação dos monômeros de açúcares: hexoses e pentoses, majoritariamente glicose e xilose, respectivamente.

1.3 Inibidores de Fermentação

Compostos inibitórios de fermentação são liberados na etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, sendo responsáveis por afetar severamente o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, limitar a utilização eficiente do hidrolisado para produção de etanol. Estes compostos estão divididos em três principais grupos: I) aldeídos furanos, como 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural; II) ácidos fracos, predominantemente os ácidos acético, fórmico e levulínico; e III) compostos fenólicos[34]. Um esquema dos principais inibidores encontrados no hidrolisado de cana-de-açúcar é apresentado na **Figura 1**.

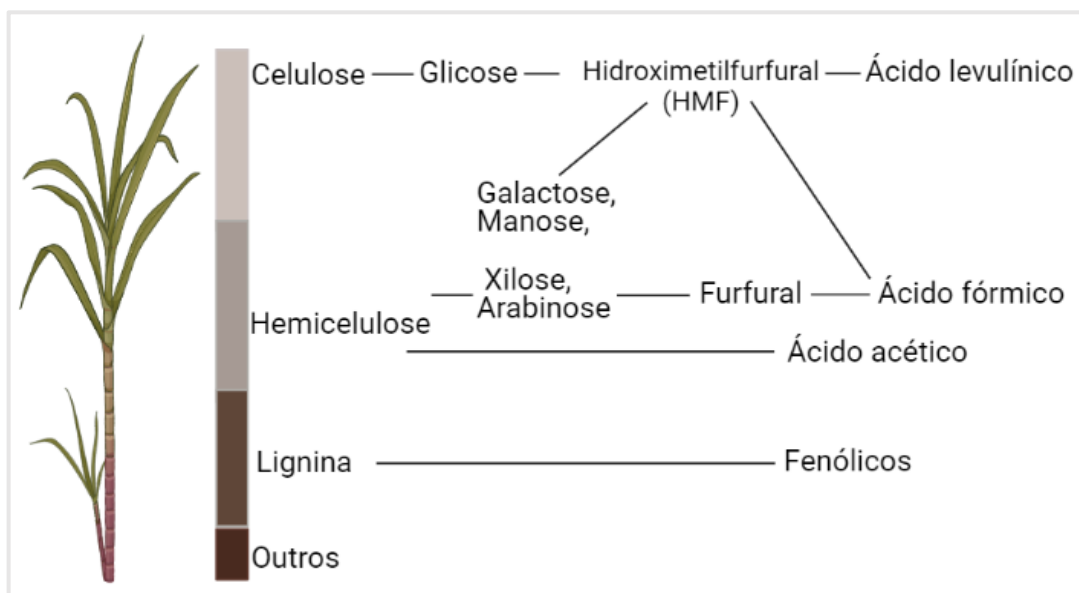


Figura 1. Formação de inibidores. Esquema indicando os principais inibidores formados no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Created with BioRender.com.

O pré-tratamento do complexo celulósico está correlacionado com a geração de aldeídos furanos (HMF e furfural, formados da partir de hexoses e pentoses, respectivamente), ácidos fracos e compostos fenólicos[35]. O prolongamento dessa etapa ou o aumento da gravidade do método utilizado leva a degradação de aldeídos furânicos, ocasionando na produção de ácidos fracos, como ácidos fórmico e levulínico. HMF e furfural são responsáveis por danos à parede celular e à membrana, pela quebra de fitas de DNA, inibição da síntese de proteínas e RNA em leveduras. Em altas concentrações, inibem o crescimento de microrganismos, diminuindo o rendimento e a produtividade do etanol[36].

Já o ácido acético é gerado durante a etapa de pré-tratamento da fração hemicelulósica, enquanto a quebra da lignina leva a produção de compostos fenólicos e aromáticos (ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, aldeído coniferílico, álcool diidroconiferílico, siringaldeído e ácido siríngico). Nesse processo também são liberados contaminantes de metais pesados[37]. Na utilização de métodos de pré-tratamento mais baratos, como hidrólise à base de ácido ou alcalino, podem ser encontradas concentrações ainda mais altas de ácido acético, resultando em um baixo pH do mosto, afetando fortemente a viabilidade celular[38].

Em estudos focados no desenvolvimento de microrganismos tolerantes a diferentes estresses, estratégias de engenharia evolutiva de seleção sob pressão são utilizadas, o que também contribui para desvendar a relação genótipo-fenótipo[39]. A tolerância aos inibidores está associada a uma arquitetura poligênica, ou seja, envolve dois ou mais alelos com variação no grau de expressão de cada gene envolvido, conferindo um fenótipo quantitativo[40], [41]. Para mapear os traços genéticos vinculados ao fenótipo e também os polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) ligados a eles, são aplicadas metodologias como o *microArray*[42] e mapeamento de *Quantitative Trait Loci* (QTL)[40], [41].

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura de brotamento *S. cerevisiae* vem sendo explorada há centenas de anos para geração de diferentes produtos. As evidências mais antigas de sua ligação com a humanidade são em sua utilização na produção de bebidas fermentadas em 3000 a.C no Egito[43] e em 7000 a.C na China[44]. Essas tecnologias de fermentação difundiram-se pelo mundo e se atrelaram a cultura humana, tornando

a *S. cerevisiae* um microrganismo de grande importância econômica e cultural. Estudos sugerem que essa conexão com seres humanos pode ter contribuído na diversidade genética das leveduras atuais[45], [46].

Em 1857, Louis Pasteur associou a levedura *S. cerevisiae* a seu importante papel na fermentação alcoólica[47]. Já em 1996, o isolado de referência de *S. cerevisiae* S288c tornou-se o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma completamente sequenciado[48]. Posteriormente, a *S. cerevisiae* começou a ganhar destaque, tornando-se um modelo em fisiologia, genética e biologia molecular, por apresentar importantes características como: rápida reprodução[49], alta atividade glicolítica[50], capacidade de crescer anaerobicamente[51] e baixo custo de manutenção[52]. Além disso, possui uma elevada eficiência de recombinação homóloga facilitando manipulações direcionadas em locais específicos dos cromossomos[49].

A *S. cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado na produção de etanol em larga escala[53]. Leveduras industriais ganharam destaque devido ao desempenho fermentativo eficiente e persistência prolongada no processo, sobrevivendo e dominando a fermentação na indústria mesmo em condições estressantes[54]. Logo, essas características tornaram-na um alvo interessante na produção de etanol lignocelulósico[55], [56]. No entanto, apesar de fermentar eficientemente hexoses, esta levedura é incapaz de metabolizar naturalmente as pentoses (xilose e arabinose) obtidas na hidrólise da hemicelulose[53]. Embora na natureza existam microrganismos que possuem a capacidade de fermentar estes açúcares e convertê-los a etanol[57], a sensibilidade a altos níveis osmóticos e aos inibidores encontrados em hidrolisados celulósicos de cana-de-açúcar impossibilitam a utilização sob condições industrialmente relevantes[58]. Logo, a obtenção de microrganismos que metabolizam eficientemente os monossacarídeos presentes na biomassa de cana-de-açúcar pode reduzir os custos na produção e aumentar a produtividade do biocombustível de segunda geração[53], [59].

Diante disso, além da capacidade natural de *S. cerevisiae* em produzir etanol, descobertas em sua fisiologia, genética e bioquímica, associadas a técnicas de engenharia genética possibilitaram a obtenção de produtos novos ou melhorados utilizando leveduras como plataforma industrial[51]. Este crescente interesse na aplicação de leveduras como biofábricas de produtos e em processos biotecnológicos contribuiu diretamente para o avanço da engenharia metabólica, área que busca o

melhoramento racional de vias celulares para produção de determinados compostos de interesse[51]. Dentre as estratégias utilizadas na engenharia metabólica está a inserção de vias heterólogas[60] bem como, superexpressão[61], [62] ou deleção de alvos gênicos[63], [64], a fim de redirecionar o fluxo celular para a produção do metabólito desejado. Neste sentido, a integração de vias metabólicas de pentoses vem sendo reconstruídas com êxito em vários microrganismos, incluindo a levedura *S. cerevisiae*[65].

2 JUSTIFICATIVA

O aumento crescente da temperatura global e a crise energética motivaram a busca por novas fontes de energia, como os combustíveis renováveis. O etanol de segunda geração (2G) é um biocombustível obtido a partir dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, matéria-prima abundante e de baixo custo, sendo uma alternativa interessante para atender a demanda de energia, não oferecendo competição com a indústria alimentícia. No entanto, ainda existem gargalos que afetam a eficiência da tecnologia de etanol 2G, tornando necessário aprimorar esse processo. Uma das etapas mais importantes do processo é a fermentação, realizada principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, que há muito tempo tem ganhado destaque devido ao seu importante potencial comercial na produção de etanol de primeira geração através de leveduras industriais. Contudo, na produção 2G os subprodutos com características inibitórias, derivados do pré-tratamento da biomassa, se mostram uma barreira ao metabolismo de leveduras, reduzindo drasticamente a viabilidade das células durante a fermentação e por consequência a produção de etanol, em especial, os aldeídos furanos (HMF e furfural) formados na degradação dos açúcares. Além disso, o fato de *S. cerevisiae* não apresentar capacidade natural de metabolizar xilose impacta diretamente no rendimento de etanol, tornando necessário a inserção de vias heterólogas nesse microrganismo. No entanto, a maioria das XI (xilose isomerases) – enzimas normalmente usadas para metabolização industrial de pentoses – não são funcionais quando expressas em *S. cerevisiae*. Outras modificações adicionais no genoma da levedura também se mostram necessárias, para gerar fluidez em tal via metabólica. Nesse contexto, desenvolver linhagens microbianas robustas capazes de manter boa performance no processo fermentativo mesmo em condições estressante proporcionadas pelos compostos inibitórios e com a capacidade aprimorada de fermentar eficientemente todos os açúcares presentes no material lignocelulósico, incluindo a xilose, é extremamente importante para tornar a fermentação para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica economicamente viável.

3 CAPÍTULO I: Xylose to ethanol: Genetic Engineering strategies for improved performance in *S. cerevisiae*

Neste capítulo é apresentado um manuscrito sobre as diferentes abordagens de engenharia genética aplicadas em *S. cerevisiae* para melhorar o desempenho de consumo de xilose para produção de etanol. O título provável: “Xylose to ethanol: Genetic Engineering strategies for improved performance in *S. cerevisiae*”, estando este em desenvolvimento. Posteriormente, será submetido para publicação Microbiological Research (Elsevier).

Resumo

A xilose é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, estando presente principalmente em material lignocelulósico. No entanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* – amplamente utilizada na indústria para produção de etanol devido à sua robustez e alto desempenho fermentativo – é incapaz de assimilar essa pentose. Assim, em um mundo com crescente conscientização ambiental, a fermentação eficiente desse açúcar é um gargalo crucial para a produção de biocombustível a partir de recursos de biomassa renovável. Nesse contexto, os avanços na engenharia genética de *S. cerevisiae* têm contribuído para um notável progresso na compreensão do metabolismo da xilose em leveduras, bem como na identificação de alvos gênicos que permitem o desenvolvimento de linhagens melhoradas para a produção de etanol celulósico. Nesse sentido, esta revisão enfoca as principais estratégias abordadas para entender a rede de genes que estão diretamente ou indiretamente relacionados a esse fenótipo e, suas respectivas contribuições para a melhoria do consumo de xilose para produção de etanol em *S. cerevisiae*. No seu fundo, a informação contida neste trabalho resume os resultados recentes mais relevantes que surgiram de investigações científicas que datam da década de 90.

Xylose to ethanol: Genetic Engineering strategies for improved performance in *S. cerevisiae*

Beatriz de Oliveira Vargas^a, Jade Ribeiro dos Santos^a, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira^{a,*}, Marcelo Falsarella Carazzolle^a, Fellipe da Silveira Bezerra de Mello^a

^aDepartment of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: goncalo@unicamp.br

Keywords: pentoses, PPP, CRISPR, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Xylose is the second most abundant carbohydrate in nature, being mostly present in lignocellulosic material. However, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast – widely used in the industry for ethanol production due to its robustness and high fermentation performance – is unable to assimilate this pentose. Hence, in a world with raising environmental awareness, the efficient fermentation of this sugar is a crucial bottleneck to produce biofuel from renewable biomass resources. In this context, advances in the genetic engineering of *S. cerevisiae* have contributed to a noteworthy progress in the understanding of xylose metabolism in yeast, as well as the identification of gene targets that enables the development of improved strains to produce cellulosic ethanol. Accordingly, this review focuses on the main strategies addressed to understand the network of genes that are directly or indirectly related to this phenotype, and their respective contributions to the improvement of xylose consumption for ethanol production in *S. cerevisiae*. Altogether, the information comprised in this work summarizes the recent most relevant results that have arisen from scientific investigations that date back to the 90's.

3.1 INTRODUCTION

Modern globalization history is structured on the use of energy provided by fossil sources; however, due to the high industrialization rates and continuous increase in world energy demand, pollution and fuel crisis tend to be the main problems that humanity may face in the future if alternative and renewable energy sources are not fully explored. Within this context, biorefineries – which use lignocellulosic biomass as feedstock for the production of high-added value molecules, such as ethanol –, are important vectors for the generation of sustainable biofuels, envisioning the total or partial replacement of fossil-based fuels. Ethanol is the most used biofuel in the world; in 2021, 103.4 million liters were commercialized worldwide[1], and, due to the growing concern for environment preservation in recent years, more investments are being made in order to develop new technologies that economically warrant the renewable energy industry.

For the first generation (1G) ethanol production, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used for the fermentation of hexoses, such as glucose[2], available from

the main product of designated crops. From this process, lignocellulosic residues are generated, comprising a feedstock with high sugar content (hexoses and pentoses) available in the cell wall, which can be further exploited to produce second generation (2G) ethanol. The concentration of such carbohydrates varies depending on the plant used; however, one of the main monomers found in the hemicellulose fraction is xylose[3]. The use of a yeast capable of consuming both hexoses (glucose) and pentoses (xylose) would be ideal to explore all the energy potential of lignocellulose; however, natural xylose-fermenting yeasts such as *Scheffersomyces stipitis* and *Spathaspora passalidarum* do not have the same fermentative capacity, tolerance to high levels of ethanol and robustness shown by *S. cerevisiae*[4], [5]. Thus, one of the main challenges for the production of 2G ethanol is the insertion of xylose assimilation pathways in *S. cerevisiae*, since it is not able to consume this pentose naturally[6].

There are two possible pathways for xylose metabolization, with different origins and biochemical properties, that can be used for the heterologous expression: the oxireductive (XDH)[7] and the xylose isomerase (XI)[8] pathway. However, the insertion of these pathways alone is not sufficient for an optimal consumption of xylose; many works were not susceptible to the heterologous expression in *S. cerevisiae*[9]–[12]. In that way, many efforts have been made to improve these pathways in *S. cerevisiae* aiming at an efficient expression of genes related to xylose consumption.

Genetic engineering allows to understand the network of genes and how they interfere with each other so that it is possible to develop a yeast strain that can be efficiently used industrially, increasing the productivity of lignocellulosic ethanol (2G ethanol) from the improvement of the xylose consumption phenotype. Thus, it is necessary to know the main studies developed in this area, the methodology applied and the results achieved, as well as what their target genes were.

In this context, this review focuses on the principal strategies used to understand the network of genes that are directly or indirectly related to this phenotype and what is the contribution of these genes to the improvement in xylose consumption and ethanol production. The main biotechnological strategies used will be addressed, such as: deletion of genes that hinder the xylose metabolization flux; overexpression of genes to increase xylose metabolization; fine tuning performed with promoters and terminators correlated with xylose; improvement of cofactor availability in the oxireductive pathway; expression of heterologous xylose-specific transporters to increase xylose assimilation and genetic variations and evolutionary approaches to

identify non-obvious genes that are correlated with xylose consumption. An overview of the xylose assimilation pathways that can be inserted by genetic engineering and the main challenges in the heterologous expression of each of them will also be discussed.

3.2 THE XYLOSE PATHWAYS

Metabolic engineering strategies have been used to enable and optimize the consumption of fermentable carbon sources by microorganisms[13]. One target has been xylose metabolic pathways, which have been successfully reconstructed in several microorganisms, including the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[14]. Strains of *S. cerevisiae* have been shown to be able to ferment xylulose, an intermediate of the xylose metabolism[6] however, they exhibit little or no ability to metabolize xylose. A putative xylose metabolic pathway is also found in their genome, but the genes are expressed at low levels, making it unfeasible to grow on this sugar as the sole carbon source[15]. Thus, to design efficient xylose consuming strains of *S. cerevisiae*, it was initially necessary to insert heterologous genes to obtain an initial assimilation pathway, being these: the (I) oxireductive pathway: with xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) enzymes[5], [7], [16]–[18]; and the (II) isomerase pathway[8], [19]–[22] with the activity of xylose isomerase (XI). Both pathways have different origins and biochemical properties, therefore, optimization is essential for efficient expression in *S. cerevisiae*. Many approaches have been used to optimize xylose metabolization pathways as well as other pathways and genes correlated with xylose consumption, in order to increase ethanol yield.

3.2.1 The oxireductive

The oxireductive pathway can be found in fermenting yeast and fungal species and has two steps, catalyzed by the enzymes xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH)[7], [23]. In the first reaction, XR reduces xylose to xylitol, preferentially using NADPH over NADH as a cofactor, in most cases. The xylitol produced is oxidized to xylulose by the enzyme XDH, which uses naturally only NAD⁺ as a cofactor. The difference in the cofactor preference between the XR and XDH

enzymes causes an imbalance that generates xylitol accumulation and consequently reduces ethanol production[24].

The heterologous genes *XYL1* and *XYL2* from *Scheffersomyces stipitis*, which encode the enzymes XR and XDH, respectively, have already been used in the construction of the xylose oxireductive assimilation pathway in *S. cerevisiae*[7], [16]–[18]. Two genes encoding XR (*XYL1.1* and *XYL1.2*) have also been identified in the genome of *Spathaspora Passalidarum*. The XR encoded by the *SpXYL1.2* gene was cloned and expressed in recombinant *S. cerevisiae*; the obtained strain presented a higher activity of XR with NADH, allowing an efficient consumption of xylose during fermentation, generating an improvement in ethanol production, as well as a lower production of xylitol[5].

Many studies have also used metabolic engineering strategies in order to reduce xylitol excretion and optimize XR and XDH expression levels[25], [26] through changes in cofactor affinity, including mutagenesis approaches at domain-specific sites that bind these cofactors[27]–[30]. In addition, other strategies have relied on modifications in redox and yeast metabolism to obtain higher availability of cofactors and consequently higher rate in ethanol production[31], [32].

Some studies have also indicated that although the oxyreductive pathway can present the imbalance of enzyme cofactors and consequently the accumulation and production of xylitol, it is thermodynamically more favorable than the isomerase pathway, performing faster xylose assimilation in genetically modified strains[33]–[35].

3.2.2 The isomerase

The isomerase pathway is found mainly in bacteria, this pathway presents a single step conversion of xylose to xylulose, being catalyzed by the metal ion-dependent enzyme xylose isomerase (XI)[9], [36], [37]. The XI pathway does not require cofactors, thus when expressed in *S. cerevisiae* it does not exhibit the redox imbalance observed in the oxireductive pathway, and it also eliminates xylitol overproduction[9], [37]. However, XI pathway genes are often not functional when inserted into *S. cerevisiae*[38]. Studies have attempted to express XI from *Escherichia coli*[9], *Bacillus subtilis*, *Actinoplanes missouriensis*[10], *Clostridium thermosulfurogenes* (renamed as *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*)[11] and *Streptomyces rubiginosus*[12] in *S. cerevisiae*, but have not been successful.

Studies have been incessantly carried out in order to obtain functional XI genes in *S. cerevisiae*. The genes obtained from different microorganisms are usually expressed in plasmids or integrated into the genome; some works suggested that the overexpression of the gene may confer a higher performance to the strain. This subtopic will present strategies used in the literature for *xyl1* expression in *S. cerevisiae* and the main organisms whose functional XIs have been taken.

The first functional XI was identified in the bacterium *Thermus thermophiles* being cloned and expressed episomally in *S. cerevisiae* using the yeast *PGK1* promoter and terminator control[19]. In the bacteria *Clostridium phytofermentans*[8] and *Bacteroides stercoris*[20] functional XI were also identified. In both studies, strong and constitutive promoters were used for *xylA* expression: *HXT7* and *TEF*, respectively. Furthermore, in *xylA* from *Clostridium phytofermentans*, codon optimization was also performed for genes encoding glycolytic enzymes in *S. cerevisiae*, allowing their functional expression[8]. However, despite being functional, when cloned and expressed in *S. cerevisiae*, the XI found in bacteria presented low activity and in the case of XI from *Thermus thermophiles* high temperatures would be required, making the expression in yeast unfeasible[19].

In anaerobic fungi, functional XI was identified in a *Piromyces sp. E2* isolated from the feces of an Indian elephant. For expression of XI from *Piromyces sp. E2*, it was used the expression vector pAKX002 carrying the *xylA* gene from this fungus (ATCC 76762) expressed from the constitutive promoter *TPI1*, using the *URA3* gene as a selection marker. The obtained yeast RWB202-AFX (derived CEN.PK113-5D) showed high levels of *Piromyces sp. E2* XI[39], [40]. Subsequently, the yeast underwent adaptation in xylose combined with genetic modifications to optimize the xylose consumption[41]; the recombinant strain showed high rate of ethanol from xylose without xylitol accumulation. XI from the fungus *Orpinomyces sp.*, that was isolated from bovine rumen fluid, had 94% amino acid sequence identity of XI from *Piromyces*, and both had similar specific enzyme activities. In the construction of a recombinant *S. cerevisiae* strain expressing XI from *Orpinomyces sp.*, *xylA* was cloned and expressed in the high copy vector pWGP3; the coding region was also modified by splicing with the *GAPDH* promoter to generate constitutive expression in the absence of xylose induction[22].

In a study from 2009, a recombinant *S. cerevisiae* strain expressing XI isolated from the anaerobic bacterium *Clostridium phytofermentans* proved to be less

susceptible to xylitol inhibition than the XI from the *Piromyces* strain, however, the rate of xylose consumption and ethanol production of the recombinant strain was still slow[8].

In 2011, two new genes encoding functional XI in *S. cerevisiae* were isolated in a soil metagenomic library[42]. Degenerated primers and a screening based on protein sequence similarity were used to obtain them. However, despite being functionally expressed, the aerobic growth rate in xylose of recombinant *S. cerevisiae* strains carrying multiple copy plasmids expressing the *xyIAs* under the same promoter (*TEF*) was much lower than the growth of yeast expressing the *Piromyces*'s XI under the same conditions[42].

Zhou et al.[36], developed a recombinant *S. cerevisiae* strain overexpressing XI from *Piromyces sp. E2* under the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (*TDH3*) via a multiple copy vector combined with an optimization of the gene codon. Further modifications and an evolutionary engineering process were performed and it was suggested that the high expression level of *xyIA* caused by the integration of multiple copies into the genome in the evolved recombinant strain may have contributed to even more efficient xylose assimilation.

In 2013, a study was developed with XI from *Prevotella ruminicola* with optimized codons. The gene was cloned and expressed in a high copy plasmid, and it was suggested that this XI shows a higher affinity to xylose and greater specific activity compared to XI from *Piromyces sp.*, moreover, the performance could be improved with evolutionary engineering[43]. However, the comparison becomes complicated since XI from *Piromyces sp.* did not undergo codon optimization.

Two other functional XIs were identified from a metagenomics library from bovine rumen[44] contents and from a cDNA library of the protists residing in the hind gut of the termite *Reticulitermes speratus*[45], a similar approach was used in both studies, using degenerated primers, making it possible to identify specific sequences of relatively conserved XI. The obtained XI were evaluated through episomal plasmids in *S. cerevisiae* using the *TEF* and *GAP* promoters, respectively.

More recently, a new functional XI was found in *S. cerevisiae* using metagenomic data derived from microorganisms found in the gut of the woody beetle *Odontotaenius disjunctus*. It was used a methodology that associates direct metagenome reconstruction combined with *in vitro* gene optimization and synthesis. The study obtained a novel XI that presents higher specific activity and affinity for D-

xylose than that of *Piromyces sp.*, the new gene being of bacterial origin and the host *Parabacteroides sp.*[46].

The possibility to functionally express heterologous XI associated with other optimizations in metabolic flux combined with evolutionary engineering in *S. cerevisiae* has enabled the projection of strains with the ability to ferment xylose into ethanol on an industrial scale[47].

3.2.3 Endogenous

In studies carried out, some *Saccharomyces* that showed the natural ability to grow on xylose in small amounts were identified[48], [49], indicating the presence of the complete xylose metabolization pathway[49], [50]. Some studies suggest that this is possible due to the presence of endogenous genes encoding putative enzymes of the oxireductive pathway (XR and XDH) of initial xylose consumption. In the *S. cerevisiae* S288c reference genome were identified several genes encoding putative enzymes of the xylose pathway or showing a correlation contributing to the xylose consumption phenotype. The genes *GRE3*, *GCY1*, *YPR1*, *YDL124W*, *YJR096W* encode putative XR enzymes and the genes *XYL2*, *SOR1*, *SOR2* express enzymes homologous to XDH[49]. However, the specific activity of these enzymes is much lower in *S. cerevisiae* when compared to other xylose fermenting yeasts[51]. Therefore, many efforts have been carried out in order to evaluate the activity of the endogenous xylose pathway (oxireductive pathway)[48], [50] and to uncover where xylose can induce the activities of the XR and XDH enzymes in *S. cerevisiae*[49], [51].

In this sense, in a study from 2004, it was performed both deletion and overexpression of the endogenous *GRE3* gene to evaluate its contribution in the xylose consumption pathway. The deletion of the gene led to decreased xylitol formation, while its overexpression using *PGK1* as promoter and terminator generated an increase in ethanol production in a recombinant yeast expressing a XDH from *Pichia stipitis*[52]. Toivari et al.[50], meanwhile, by overexpressing the endogenous genes *GRE3* and *XYL2* in *S. cerevisiae*, enabled its growth using xylose in the presence of glucose under aerobic condition with agitation. However, the strains that had the endogenous genes overexpressed showed slower growth and greater accumulation of xylitol, compared to a recombinant *S. cerevisiae* strain expressing XR and XDH from *P. stipitis*.

Wenger and contributors, in 2010[49], performed a robust work evaluating xylose consumption in *Saccharomyces* strains where they identified an endogenous gene as responsible for conferring the xylose consumption phenotype in a *S. cerevisiae* wine yeast, this gene, named *XDH1*, is responsible for encoding a putative XDH. Through mass segregation analysis (BSA) and yeast tile arrays using the xylose-consuming wine strain and a non-consuming laboratory strain (S288C) they identified that the positive phenotype for xylose consumption is linked to an unique, dominant locus, being located in a subtelomeric region on the right-end of chromosome XV, and is not present in the genome of S288C. Confirmation of the contribution of the *XDH1* gene to the xylose consumption phenotype was accomplished by its deletion in the *S. cerevisiae* wine strain, after which the phenotype was nullified. The gene was also cloned and expressed episomally in the laboratory yeast S288C, allowing xylose utilization by this strain that previously was not able to consume xylose; the phenotype was lost upon removal of the plasmid. These results indicated that this gene could be used to confer the ability of xylose consumption in non-consuming yeast. Furthermore, in the same study by Wenger and co-workers (2010)[49], other genes and their correlation with the positive xylose phenotype in the obtained wine strain were analyzed by performing gene knockouts separately and in all possible combinations to verify their contribution to the xylose consumption phenotype. By deleting each XDH (*sor1Δ*, *sor2Δ*, *xyI2Δ*) separately, an improvement in xylose consumption was observed, and deleting the three genes together resulted in an even more enhanced phenotype, suggesting that endogenous *XDH* may be limiting the xylose consuming ability of non-recombinant *S. cerevisiae*. It was also confirmed that *XDH1*, *XKS1* and two putative XR genes (*GRE3* and *YPR1*) contribute to growth on xylose.

3.3 REWIRING METABOLIC PATHWAYS

In some strains of *Saccharomyces*, genes encoding enzymes of the oxidoreductive pathway as well as an active xylitol dehydrogenase are found, however, they do not show efficiency in xylose conversion. Therefore, for an efficient assimilation of xylose, different strategies were used: overexpression of endogenous genes and insertion of heterologous genes responsible for encoding key enzymes from isomerase and oxireductive pathways (XI and XR-XDH, respectively). In both pathways, after xylose is converted to xylulose (in one or two steps), it undergoes phosphorylation to

xylulose-5-phosphate via endogenous xylulose kinase (XK). Subsequently metabolism by the pentose phosphate pathway (PPP) and channeling to the glycolytic pathway to produce ethanol under anaerobic conditions occurs. However, in addition to the limitations found internally in xylose assimilation pathways, additional modifications are required to optimize the metabolic flux of xylose. Therefore, many approaches have been used to optimize the metabolism pathways, as well as other pathways and genes correlated with xylose consumption in order to increase ethanol yield. The main strategies are: (I) Deletion of genes that hinder the xylose metabolism flux; (II) Overexpression of genes to increase xylose metabolism; (III) Fine tuning performed with promoters and terminators correlated with xylose. Other strategies used to improve xylose consumption are: (IV) Improvement of cofactor availability in the XR-XDH pathway; (V) Expression of heterologous xylose-specific transporters to increase xylose assimilation; (VI) Genetic variations and evolutionary approaches. Furthermore, through comparative omics analysis, using genomic sequencing, transcriptomics, proteomics, metabolomics or fluxomics, it was possible to perform a comparative analysis between xylose fermenting strains that had their capacity improved and their respective parental strains, as well as the prediction and analysis of genes through integration networks, thus identifying which genes are correlated with xylose consumption.

3.3.1 Deletions

Several combined approaches have been explored with the aim of identifying genes related to the xylose consumption phenotype and their role in xylose metabolism. Among others, the combination of strategies of (I) Reverse metabolic engineering of xylose metabolism; (II) *Microarray* gene expression analysis; (III) Synthetic gene array; (IV) Transposon mutagenesis; (V) Omics approaches for comparative analysis of mutated or evolved xylose fermenting strains and their respective parental strains. In these approaches, several genes were then suggested as knockout targets that either directly contribute to enhanced xylose consumption or that, associated with other deletion/superexpression gene targets, enhance this pentose consumption phenotype in *S. cerevisiae*. Below are some examples of genes related to negative regulation in xylose metabolism and their contributions to the enhancement of this phenotype.

The *GRE3* gene encodes a non-specific aldose reductase that functions as an NADPH-dependent XR and consequently contributes to the formation of xylitol[52]. Therefore, the deletion of the *GRE3* gene became interesting to reduce the accumulation of xylitol in the xylose fermentation process[53]. In addition, most of the heterologous XIs expressed in *S. cerevisiae* strains were sensitive to the presence of xylitol, indicating this metabolite as a potent inhibitor of these enzymes, suggesting that its exclusion is important for ethanol production via the XI pathway[54], [55]. However, in one study, the deletion of *GRE3* was related to the reduction in biomass and it was suggested that a fine-tuning of gene expression would be preferable to deletion[52].

In a study to identify new targets through a reverse metabolic engineering approach to xylose metabolism, strains that showed growth on xylose were compared with varying degrees of the same phenotype using a genomic transcription analysis methodology via microarray. Strains that had the genes *YLR042C*, that encodes a protein with unknown function linked to glycosylphosphatidylinositol (GPI); *MNI1* (methyltransferase), or *RPA49* (RNA polymerase) deleted showed improved xylose consumption compared to the reference strains[56]. In a later study, the positive effect of the *YLR042C* deletion on xylose fermentation was confirmed, with an increase in the co-consumption of xylose with glucose, as well as an excess production of xylitol, suggesting that the metabolic pathway of sugar transport was saturated and that the performance of *YLR042C* may be at the level of transport or signaling of sugar. However, the authors indicated that more efforts should be devoted to elucidating the physiological role of *YLR042C* in the use of sugars as carbon sources[57].

Using a genomic synthetic array screening methodology, it was possible to evaluate the contribution of non-essential genes to xylose utilization in the genome of recombinant *S. cerevisiae* expressing *xylA* from *Piromyces sp. E2* alone or in combination with overexpression of endogenous XKS. Four deletion mutant genes were identified: *BUD21* (component of the small ribosomal subunit, SSU, processome), *ALP1* (arginine transporter), *ISC1* (inositol phospho-sphingolipid phospholipase C) and *RPL20B* (component of the large ribosomal subunit, 60S). In order to evaluate the influence of each gene separately, the genes were deleted individually being confirmed that all contribute positively to the xylose consumption phenotype[58].

A mutation in *PMR1*, responsible for encoding a Golgi $\text{Ca}_2^+/\text{Mg}_2^+$ ATPase, was identified in an adapted *S. cerevisiae* strain expressing nine heterologous XI copies of *Piromyces* and other additional modifications (overexpression of *XKS1*, *RKI1*, *RPE1*, *TKL1*, *TKL2*, *TAL1* and *NQM1*). To understand whether the mutation was accompanied with loss of function, a *PMR1* deletion was performed by integrating an amdSYM-based deletion cassette into the parental strain, which allowed anaerobic growth on D-xylose[59]. A mutation in *PMR1* was also found in another evolved recombinant *S. cerevisiae* strain harboring mutant xylose isomerase (*xyIA*3*) genes from *Piromyces spp.* and other additional metabolic alterations (overexpression of *XKS1* and *TAL1* and, $\Delta gre3$ and $\Delta pho13$ - using a strategy of simultaneous integration and exclusion of the chosen target genes). Although the mutation identified in *PMR1* is different from that found in the previous study, the phenotype obtained was the same, an improved utilization of xylose. In that same study, a new mutation identified in the *ASC1* gene, which encodes the beta subunit of the G protein and the guanine dissociation inhibitor for Gpa2p, was also described. This gene is known as a negative regulator of several metabolic and signal transduction pathways. When the mutated genes (*PMR1* and *ASC1*) were deleted by the *CRISPR-Cas9* editing system, as well as when the mutations were expressed in knockout strains, a significant improvement in xylose consumption and ethanol production was obtained, indicating the contribution of the evolutionary engineering-derived point mutations. Therefore, both mutations identified are correlated with loss of function of these genes[60].

Through directed evolution combined with resequencing and analysis in omics tools, epistatic interactions that altered the metabolic regulation allowing the consumption of xylose in *S. cerevisiae* anaerobically were identified. Mutations were observed in the genes: *GRE3* (endogenous XR), *HOG1* (a component of MAP kinase, MAPK, signaling), *IRA2* (GTPase activating protein) and *ISU1* (scaffolding protein involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly). In the study it was suggested that the loss of function of *ISU1* is indispensable for anaerobic fermentation of xylose as well as epistatic interactions with mutations of *IRA2*, *HOG1* and *GRE3*. In validation, the genes (*HOG1*, *ISU1*, *IRA2* and *GRE3*) underwent deletion in a combined manner in strains with different background, as a result, strains with significantly faster anaerobic consumption were obtained, regardless of the background, suggesting that the phenotype improvement through the mutations is not limited to a strain[61]. In another study, a systems-level investigation was performed on *S. cerevisiae* strains

that presented improved anaerobic xylose fermentation regulatory changes related to cellular xylose signaling, showing a connection between the sugar source and the anaerobic response, which were previously unrecognized. This allowed the identification of new gene targets: *BCY1*, *AZF1* and *MGA2*[62].

Whereas in a work conducted by Santos et al. (2016)[2], two mutations that conferred improved xylose consumption were identified. In the study an industrial strain of *S. cerevisiae* was modified with essential genes for pentose metabolism and with a XI of *Orpimomyces sp.* associated with an evolution process in xylose. In order to identify the differences, the yeasts before and after evolution had their genomes sequenced and analyzed. One of the mutations identified in the strains was in *ISU1*, and it was found in two parallel evolved strains. In another evolved strain in the same study, a mutation in *SSK2* (a member of the MAPKKK signaling pathway) was identified. In validation experiments, the genes were deleted in the evolved strains and in the parents, as a result, an improvement in xylose metabolization capacity similar to that found in the strains with the mutations was conferred, indicating that these obtained mutations had a gene inactivation function.

One mutation that has been extensively studied is the deletion of *PHO13*, which encodes a type IIA halo acid dehalogenase phosphatase. This mutation was evaluated in recombinant strains regardless of the initial xylose assimilation pathway[63]–[70]. The mutation was first identified by transposon mutagenesis in a strain that metabolizes xylose, improving the assimilation of this sugar[63]. The mutation in *PHO13* was also identified through an approach combining adaptive evolution for xylose consumption and genomic sequencing, suggesting that loss of *PHO13* gene function plays an important role in improving xylose consumption rates and ethanol yields[66]. Other studies suggested that deletion of *PHO13* resulted in transcriptional and metabolic changes favorable for xylose fermentation, in particular, transcriptional activation of PPP pathway genes and NADPH-producing enzymes as part of an oxidative stress response mediated by Stb5 activation[71]. Through a metabolomic analysis it was suggested that the positive regulation of *TAL1*, which prevents sedoheptulose accumulation, is the critical point for improved xylose metabolism in the *pho13Δ* mutant *S. cerevisiae* strain[70].

However, in a more recent study by Shin and colleagues (2021)[72], were identified modified strains whose phenotypes had not been affected by the deletion of *PHO13*. Through resequencing of the *Δpho13-negative* strains, a loss-of-function

mutation in *GCR2* was identified and indicated as responsible for the xylose consumption phenotype. *GCR2* is a global transcription factor correlated with glucose metabolism. Deletion of *GCR2* ($\Delta gcr2$) led to positive regulation of PPP genes as well as negative regulation of glycolytic genes, with the changes being more significant under xylose conditions than under glucose conditions. Although no synergistic effect was found between deletion of *PHO13* and *GCR2* in improving xylose fermentation, *GCR2* was indicated as a target for knockout to enhance ethanol production.

Many other genes were also identified and suggested as contributors to the xylose consumption phenotype, contributing to the phenotype improvement directly or indirectly, alone or associated with other modifications (combined deletions or overexpression). Through reverse metabolic engineering, target genes of central carbon metabolism were also identified, such as *ALD6*, which encodes a NADPH-dependent aldehyde dehydrogenase; its deletion yielded an improvement in xylose fermentation efficiency[66]. In 2018, Wei and colleagues[73] suggested that deletion of the transcription factor *THI2* (activator of thiamine biosynthetic genes) may promote xylose metabolism in co-fermentation of glucose and xylose by increasing ribosome synthesis. In the same study, a beneficial effect on xylose metabolism was suggested through the overexpression of transcription factors *NRM1* or *YHP1*, both related to the cell cycle. Wu et al. (2020)[74] investigated how simulating extracellular glucose signals can increase xylose metabolism in fermenting strains, suggesting a regulation through the cAMP-PKA and Rgt2/Snf3-Rgt1 pathways that respond to extracellular glucose. This study identified novel gene regulation targets that contribute to xylose metabolism, including *PDE1*, *PDE2*, and *RGT1*. Palermo and colleagues (2021)[75], meanwhile, analyzed the effect of metal homeostasis under xylose fermentation and suggested two promising new targets for metabolic engineering of *S. cerevisiae*: *CCC1* (vacuolar Fe_2^+/Mn_2^+ transporter) and *BSD2* (protein involved in heavy metal ion homeostasis). More recently, transcription factors of xylose catabolism (*Znf1*, *Sip4*, *Adr1*, *Tup1* and *Hap4*) were evaluated in a xylose fermenting *S. cerevisiae* strain; however only deletion of *hap4 Δ* (global regulator of respiratory gene expression) generated an increase in ethanol production from xylose compared to the parental strain[76].

3.3.2 Superexpression

Genome-wide genetic array analyses associated with omics techniques have been an important tool in understanding xylose metabolism as well as identifying targets for improving xylose metabolism in recombinant *S. cerevisiae*. Among these rational metabolic modifications performed in fermenting yeast to improve xylose uptake, the identification and overexpression of gene targets have become an interesting strategy gaining prominence, because it directly contributes to accelerating the uptake of this pentose and increasing the flux of xylose metabolism in genetically modified *S. cerevisiae* strains.

In the xylose metabolism flux, the product of its isomerization, xylulose, is slowly consumed by an endogenous XK that has low levels of activity, limiting xylose fermentation, making the *XKS1* gene encoding XK a major target for overexpression. XK is responsible for phosphorylating xylulose in xylulose-5-phosphate and driving carbon flux to the pentose phosphate pathway (PPP), and is present in both xylose assimilation pathways. The first recombinant *S. cerevisiae* strain expressing the ScXKS1 gene had the PsXR and PsXDH genes jointly expressed, these characteristics indicated an increase in ethanol production and reduction in xylitol excretion[7]. Many other studies have evaluated endogenous as well as exogenous overexpression of *XKS1*, suggesting that its overexpression is responsible for a considerable improvement in xylose fermentation[7]. However, some studies have indicated that high XK expression can be harmful to xylose metabolism, inhibiting and reducing xylose consumption even in cases where increases in ethanol yield rates were presented[77], [78]. Johansson et al., (2001)[77], even associated a deleterious effect with uncontrolled overexpression of *XKS1*. Jin et al., (2003)[78] pointed out that the inhibitory effect on cell growth and ethanol production in cells with high levels of XK is similar to substrate-accelerated death. Such a delay in cellular metabolism due to overexpression of *XKS1* would also be responsible for the accumulation of xylulose-5-phosphate and the depletion of ATP[77], [78]. In this context, the need for modulated expression of XK for an efficient xylose fermentation was suggested, considering the intrinsic characteristics of the host strain and modulations in its metabolic engineering[78].

Other gene targets that contributed to the improvement of xylose metabolism were the *RPE1*, *RKI1*, *TAL1* and *TKL1* genes of *S. cerevisiae* responsible for encoding the enzymes of the PPP non-oxidative pathway: ribulose 5-phosphate epimerase (*RPE*), ribose 5-phosphate isomerase (*RKI*), transaldolase (*TAL*) and

transketolase (*TKL*). In studies analyzing the bottlenecks of xylose consumption, the expression levels of the non-oxidative PPP enzymes have been indicated as an impacting factor on the rate of xylose utilization in fermenting yeast[69], [79]. Overexpression of the *TAL1* gene was responsible for an improved rate of xylose assimilation in *S. cerevisiae*[63], [79]. In other studies, the genes *XKS1*, *RPE1*, *RKI1*, *TAL1* and *TKL1* were overexpressed simultaneously, and an improvement in the rate of xylose consumption and ethanol production was observed in recombinant *S. cerevisiae*[21], [25]. In a characterization study of enzymes of the non-oxidative PPP pathway, the effect of the *TAL1* and *TKL1* genes was analyzed by deletion, and it was suggested that the enzymatic activity of the transaldolase and transketolase encoded by these genes, respectively are limiting for efficient xylose utilization and that their overexpression is responsible for an increased flux from the pentose phosphate pathway to the glycolytic pathway in recombinant *S. cerevisiae*[79].

Through molecular analysis of a recombinant xylose consuming *S. cerevisiae* strain (XR-XDH) and its mutant with enhanced xylose consumption capacity, it was possible to identify different target genes of overexpression, among these genes, were identified: *XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, as well as two new genes: *SOL3* (6-phosphogluconolactonase) and *GND1* (6-phosphogluconate dehydrogenase). In the study, it was suggested that the improved growth rate on xylose, as well as the higher uptake of xylose in medium containing both glucose and xylose is related to the increased expression of those genes in the improved strain[80]. Bengtsson et al. (2008)[56], in a similar study, performed a genome-wide transcriptome analysis of *S. cerevisiae* strains that showed increased xylose consumption and of their parents, in order to identify new targets for metabolic engineering. In this study, the *SOL3* and *TAL1* genes were also suggested as interesting targets for overexpression; the strains expressing such genes showed faster growth compared to the reference strains.

In a more recent study focusing on simultaneous co-fermentation of glucose and xylose, the *RPE1* gene of the non-oxidative PPP pathway was selected as a target for overexpression, leading to an increase in xylose consumption and ethanol production rate[81]. Expression of *HXK2*, which encodes a constitutively hexokinase 2 localized in the nucleus (*Hxk2*), was also responsible for an increase in xylose consumption rate and ethanol yield in a xylose-consuming recombinant yeast strain[82].

Wei et al., (2018)[73] suggested a beneficial effect on xylose metabolism through overexpression of *NRM1* or *YHP1* in *S. cerevisiae*. In another study by Wei (2019)[83], it was pointed that overexpression of the TFs *STT4* (Phosphatidylinositol-4-kinase), *RGI2* (respiratory growth induced, function unknown) and *TFC3* (subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor complex), which have different expression levels in the X (xylose) and GX (glucose-xylose) stages, also contribute to a considerable increase in xylose uptake rates and ethanol production in the GX stage of anaerobic fermentation *S. cerevisiae*.

In addition to the metabolic overexpression targets, elevated and balanced expression of the initial genes of the xylose assimilation pathways: *xy11*, *xy12*, and *xy1A*, may contribute to even more efficient assimilation of this sugar[36], [84], [85]. Overexpression of sugar transporters is another interesting approach to improve the performance of xylose-consuming strains, enabling even more effective xylose transport in recombinant *S. cerevisiae* strains[86].

3.3.3 Regulation Fine Tuning

Metabolic engineering and synthetic biology approaches often require fine-tuning of gene expression to balance and optimize the expression levels of certain metabolic enzymes and regulatory proteins. This adaptation of gene expression is essential to balance metabolic fluxes and increase the productivity of metabolites of interest[87]. At the transcriptional level, for the cell to stay healthy and develop continuously, specific intracellular modifications are performed[88]. And in case of stress, it is important that the cell adapts its gene expression rapidly to ensure its integrity and survival[89]. *S. cerevisiae* presents its own mechanisms in response to environmental changes; promoters are responsible for controlling these gene expression programs[90]. However, genes from the same metabolic pathway present different levels of expression, as well as different catabolic intermediates. In this context, an interesting strategy to optimize the metabolic flux is through the use of different promoters, in order to fine-tune the expression of genes present in the metabolic pathway of interest[91]. In *S. cerevisiae* endogenous promoters differ by different strengths (*i.e.*, rates of transcription initiation) and regulation, and are classified into (I) constitutive and (II) inducible. Constitutive promoters have stable expression levels and are constantly active in the cell[92], [93]. Inducible promoters,

on the other hand, are activated in response to different stimuli[94], [95]. Promoters can be obtained by (a) characterizing gene expression; (b) targeted modifications of already known promoters, by increasing transcriptional activation using the addition of upstream activating sequences (UASs) and by (c) altering sequences using random mutations, deletions, nucleosome removal or intron insertion; one of the strategies used is error-prone PCR[96]. This last strategy allows to obtain from a strong promoter, different levels of expression of the target gene due to mutations added to it during amplification[97].

In a study, it was suggested that constitutive expression of *XYL1*, *XYL2* and *TAL1*, although beneficial for xylose metabolism, reduces specific growth rate and ethanol production from glucose[98]. Regulation of *ZWF1* gene expression was performed using the copper-regulated *CUP1* promoter; altering the Cu^{2+} concentration in the medium was possible to observe an activity of the G6PDH enzyme. The obtained strain presented increased xylose consumption, reduced xylitol secretion and increased ethanol yield[99]. Lu & Jeffries (2007)[100] developed a multiple-gene-promoter shuffling (MGPS) technique that consists of joining promoters of variable strength to the genes of interest; the constructs are joined by ligation and an analysis is performed to the phenotype of interest. The MGPS method was used in *S. cerevisiae* to achieve optimal levels of overexpression in several genes simultaneously, in order to optimize xylose fermentation. In the study, the *GND2* and *HXK2* promoters along with the *TAL1*, *TKL1* and *PYK1* (pyruvate kinase) genes were inserted into xylose-fermenting recombinant *S. cerevisiae*. The optimal expression levels for *TAL1*, *TKL1*, and *PYK1* were identified by analysis of volumetric ethanol production by transformed cells. The authors suggested *GND2-TAL1-HXK2-TKL1-HXK2-PYK1* as the ideal combination for ethanol production. Zha and co-workers (2012)[85] reported a combined strategy of chassis selection and fine-tuning in the expression of *XYL1* and mutated *XYL2* to obtain efficient *S. cerevisiae* strains in xylose fermentation. In the obtained strain, the *XYL1* gene was adjusted using the promoters *PGK1*, *ADH1* and truncated *ADH1*, in addition, the mutated *XYL2* with different copy numbers was expressed under the *PGK1* promoter. However, only the *PGK1* promoter was able to improve XR activity, increasing the ability to assimilate and metabolize xylose in the developed strain.

More recently, Hector & Mertens (2017)[101] suggested the need for regulation at the transcriptional and post-translational level in *S. cerevisiae* strains

engineered to metabolize xylose. In this study, xylose-regulated synthetic hybrid promoters were developed, and the p*TEF*-xyIO2-1 promoter in the presence of xylose showed activity comparable to other known *S. cerevisiae* promoters. In 2018, in another study, 30 *S. cerevisiae* promoters showing different strengths were selected by microarray data and had their activity analyzed in a xylose-metabolizing yeast strain. In the study, it was suggested that p*TDH3*, p*FBA1* and p*TDH1* promoters showed high expression and p*SED1*, p*HXT7*, p*PDC1*, p*TEF1*, p*TPI1* and p*PGK1* had medium-high expression in aerobic culture, and moderate expression in microaerobic fermentation[102]. The activities of different native promoters and a synthetic hybrid promoter p3xC-TEF1 were also evaluated in *S. cerevisiae* in the presence of xylose and under stressful conditions (toxic levels of acetic acid and furfural and high temperature). The p*TDH3* promoters and the synthetic hybrid promoter (p3xC-TEF1) showed higher strength and stability under almost all conditions[103]. The p*TDH3* promoter and the *CYC1t* terminator were used to control the expression of PPP genes (*TAL1*, *TKL1*, *RKI1* and *RPE1*), and as a result, improved xylose metabolism was obtained[104]. A pGal3 mutant, with the ability to detect xylose and regulate all galactose-inducible promoters in the presence of xylose, enabled improved xylose metabolization and growth rate[105].

Studies have also analyzed the importance of terminators and how their regulation of transcription can interfere with an enhanced metabolic flux[106], [107]. There are two events that are related to terminator gene expression: I) "transcriptional termination" and II) "post-transcriptional regulation". In the first event, the terminator is responsible for determining where the mRNA will be cleaved and for the addition of the poly(A) tail; while the second determines the stability, translation efficiency and position of the mRNA[108]–[112]. Curran et al., (2013)[106] analyzed 30 terminators and obtained *S. cerevisiae* strains with higher growth from xylose when the xylose isomerase gene was combined with the p*TDH3* promoter and *CPS1t* terminator, thus it was suggested that a strong promoter and an efficient terminator act in combination. Curran also suggested that terminators can modulate expression and that a combination of a high efficiency terminator and a low expression promoter can generate the same phenotypic results as a construct using a promoter considered strong and a standard terminator.

3.4 COFACTORS

Although fermentation of xylose to ethanol can be performed by *S. cerevisiae* strains expressing heterologous XR (NAD(P)H-dependent) and XDH (NAD⁺-dependent), the resulting strains have low ethanol productivity and accumulate a considerable amount of xylitol during the fermentation process. The excretion of xylitol is mainly attributed to the imbalance of cofactors between the conversion steps. XR normally has a higher affinity for NADPH than for NADH, whereas XDH uses only NAD⁺, which leads to an excessive accumulation of NADH and a shortage of NAD⁺ necessary for the XDH reaction. However, although xylitol accumulation impairs the final ethanol yield, it is still an important by-product from ethanol production by the oxireductive pathway.

In this context, many strategies have been outlined to minimize xylitol accumulation and improve cofactor availability, thus increasing ethanol yield. One interesting approach is through protein engineering, altering the coenzyme specificity, either of XR, by changing its preference from NADPH to NADH or of XDH, from NAD⁺ to NADP⁺[113], [114]. Many studies have used mutagenesis techniques to obtain XRs with higher affinity for NADH[29], [56], [113], [115]–[118]. Jeppsson and co-workers (2006)[115], expressed a mutant XR from *S. stipitis* (K270M)[119], that showed increased affinity for NADH in recombinant *S. cerevisiae* harboring XDH from *P. stipitis* and overexpression of endogenous *XKS*; higher ethanol yield and reduced xylitol formation were obtained[115]. Other XR mutants (K270R, K270G, R276H, N272D, K270R/N272D, N272D/P275Q, K270R/R276H) of *S. stipitis* with a preference for NADH were obtained by site-directed mutagenesis[29], [113], [118] and expressed in recombinant *S. cerevisiae*, showing positive effects on ethanol yield and reduced xylitol excretion[29], [56], [113], [115], [116], [118], [120]. Several XR mutants have also been obtained from *Candida tenuis*[121]–[125]. In 2008, Petschacher & Nidetzky[117] inserted a double XR mutant from *C. tenuis* (K274R-N276D CtXR) into a recombinant *S. cerevisiae*; the obtained strain showed an increase in NADH utilization resulting in improved ethanol production and decreased xylitol excretion. Through site-directed mutagenesis it was also possible to obtain a change in the specificity of the coenzyme of XDH, from NAD⁺ to NADP⁺[27], and improve thermostabilization by inserting a zinc binding site[126]. A quadruple ARSdR mutant (D207A/I208R/F209S/N211R) showed 4,500-fold higher catalytic efficiency (kcat/Km) with NADP than wild-type PsXDH[27].

The ARSdR mutant was expressed in recombinant *S. cerevisiae* strains under the control of a strong constitutive promoter, together with PsXR and ScXK, achieving increased ethanol yield and lower xylitol production[30], [113], [114], [127]. Protein engineering proved to be an interesting approach to reduce the accumulation of by-products in recombinant strains expressing XR-XDH, because the reactions performed by XR and XDH cause an accumulation of NADH and consumption of NADPH. Therefore, many strategies have focused on reducing NADH production and increasing NADPH availability.

Therefore, since the PPP oxidative pathway is responsible for NADPH generation, another strategy used was to reduce the activity of enzymes present in the PPP oxidative pathway to improve the performance of XR NADH-dependent and reduce CO₂ production. Deletion of the *ZWF1* gene, which encodes glucose-6-phosphate dehydrogenase and/or deletion of *GND1* in strains containing the *XYL1/XYL2* genes resulted in improved ethanol production. However, the fermentability of xylose was decreased, and it has been suggested that the cause is a limitation of the NADPH-dependent reduction reaction of XR[128]. To solve this problem, the fungal *GDP1* gene encoding an NADP⁺-dependent *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was overexpressed along with the deletion of *ZWF1*, which generated an improvement in ethanol production[31]. Through a genome-scale metabolic modeling approach it was indicated that the *gapN* gene, which encodes a non-phosphorylating NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPN*), obtained from the genomic DNA of *Streptococcus* mutants, is also capable of improving ethanol yield[32].

Some studies have analyzed the flow redirection of metabolic pathways for ethanol production. Metabolic engineering of ammonia assimilation has been suggested as an alternative approach to modulate redox metabolism, favoring xylose metabolism, by improving cofactor availability and reducing the accumulation of by-products formed during fermentation. A yeast strain was constructed by overexpressing the *GLN1* (glutamine synthetase) and *GLT1* (glutamate synthase) genes, and by deleting the *GDH1* (NADPH-dependent glutamate dehydrogenase) gene. The resulting strain showed higher ethanol yield and lower glycerol production compared to the wild-type strain in anaerobic fermentations[129]. In another study of metabolic engineering of ammonia assimilation, changes were made in order to improve cofactor utilization in a *S. cerevisiae* containing *XYL1*, *XYL2* and *XKS1*. The

GDH1 gene was deleted, while the *GDH2* gene, encoding an NADH-dependent glutamate dehydrogenase, was overexpressed. Overexpression of *GDH2* led to NADH utilization in ammonia assimilation, generating an improvement in the availability of NAD⁺ for XDH in xylose metabolism and, consequently, an increase in the conversion of xylitol to xylulose. In addition, the change in the use of cofactors during ammonia assimilation led to an increased availability of NADPH, a cofactor of the XR enzyme, which is responsible for the conversion of xylose into xylitol. Thus, there was an improvement in xylose conversion and ethanol yield, as well as a decrease in xylitol production[130]. In another study of comparative metabolic flux analysis, the functionality of the ammonia assimilation pathway was also confirmed in a mutant strain with deleted *gdh1* and overexpression of *GDH2*, indicating a shift in the specific xylose reduction activity of the XR to the use of NADH as a cofactor[131].

The redirection of flux to ethanol production seems to be responsible for generating an increased availability of cofactors in *S. cerevisiae* cells. However, overexpression of the *POS5* gene, encoding an NADH-kinase in recombinant *S. cerevisiae*, proved inefficient for anaerobic growth and increased the accumulation of xylitol[132]. Whereas, overexpression of the *noxE* gene, encoding a water-forming NADH-oxidase taken from *Lactococcus lactis* in *S. cerevisiae*, led to decreased xylitol formation and increased ethanol production during xylose fermentation[133].

3.5 TRANSPORTERS

In the production of any metabolite from a cell, the first step is substrate assimilation. This efficient entry of substrate molecules into yeast cells is suggested in many studies as a critical factor for obtaining efficient biofactories[134]. In yeast, sugar entry is facilitated by a family of sugar porters, the major facilitator superfamily (MFS), present in different species in all kingdoms of nature[135]–[137]. This transport of sugars occurs mostly by facilitated diffusion, being a passive transport mechanism of substances across the cell membrane[23]. In *S. cerevisiae*, at least 18 genes encoding hexose transporters (*Hxt1-17*) and galactose permease (*Gal2*) are found endogenously, however only *Hxt1-7* and *Gal2* show active expression, with *Hxt8-Hxt17* being inactive (not transcribed) or cryptic[138]–[140]. In *S. cerevisiae*, xylose-specific transporters are not found, and although native hexose transporters also have the ability to import pentoses, such as xylose, their transport occurs inefficiently due to the

lower affinity of these transporters for this sugar[140], [141]. Moreover, transporters that perform xylose assimilation suffer a strong inhibition in the presence of other sugars, especially glucose, and this repression is considered a limiting factor in mixed sugar fermentation, as most recombinant *S. cerevisiae* yeasts are unable to initiate xylose assimilation before glucose depletion[141]–[143], what causes a direct impact on increasing the fermentation time of industrial lignocellulosic biomass. Therefore, many studies have sought to design xylose-specific and glucose-insensitive transporters in order to obtain more efficient *S. cerevisiae* platforms for mixed sugar fermentation[143]. In this context, platforms for sugar transporter characterization were obtained by deletion of native hexose transporters (*hxt null*), avoiding the interference of their effect on sugar transporter analyses[144]–[146]. These strains, that had the hexose transporters excluded, did not exhibit the ability to grow on glucose as the sole carbon source, and have been used to characterize various endogenous hexose transporters, as well as those from different origins[134], [139], [144], [145], [147].

One interesting approach in engineering xylose metabolism in *S. cerevisiae* is the insertion of specific xylose transporters heterologously from other organisms (bacteria, fungi, yeasts and plants)[148]. In this context, many studies have focused on identifying specific xylose transporters in different species, including xylose transporters from other xylose fermenting yeasts such as *Candida intermedia*, *S. stipitis* and *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*[147], [149], [150]. However, although heterologous expression of some of the identified xylose transporters allowed growth on xylose using recombinant *S. cerevisiae*, glucose inhibition of xylose transport was still observed[86], [149], [151]. The high-capacity, low-affinity D-glucose/D-xylose facilitated diffusion transporter (*Gxf1*), obtained from *C. intermedia*, showed a threefold improvement in transport kinetics and xylose utilization when expressed in *S. cerevisiae*; however, these improvements in xylose transport by *Gxf1* were only observed at low xylose concentrations, presenting no changes at high concentrations of this sugar, what suggests that the expression of this specific transporter in *S. cerevisiae* would be beneficial only at low xylose concentrations[86], [151], [152]. Another sugar transporter identified from *C. intermedia* was the *Gxs1*, which had the F40 point mutation observed[153], indicating that substitutions in F40 have a relationship with the change in sugar transport and consequently can produce different transporter phenotypes, including improved transport of xylose. Besides these, many other mutations, obtained by error-prone PCR, made it possible to obtain a transporter

with enhanced xylose transport rates in the presence of glucose, as well as co-utilization of glucose and xylose[154]. Young et al. (2014)[155] evaluated the sequence similarity of different expressed heterologous transporters and reported the conserved amino acid motif (G-G/FXXXG) as responsible for monosaccharide selectivity in sugar transporters, showing that the sugar preference of the *C. intermedia* *Gxs1* transporter can be relinked. The mutation in this motif was achieved by modifying the residues V38F, L39I and F40M. A xylose-uptake mutant was obtained, showing a slight increase in xylose uptake rate; however, the transporter did not show the ability to transport glucose and xylose simultaneously.

The yeast *P. stipitis* (*S. stipitis*) has been widely used to prospect xylose transporters due to its ability to ferment this sugar. Many transporters from this species were analyzed and expressed in *hxt null* *S. cerevisiae* mutants, among them: *Sut1*, *Sut2*, *Sut3*[156]; *Xut1* and *Xut3*[147]. The *Sut1* transporter improved xylose uptake capacity and increased ethanol productivity during xylose fermentation, when expressed in a xylose-metabolizing *S. cerevisiae* strain[157]. *Xut1* and *Xut3* transporters from *S. stipitis*, on the other hand, showed moderate efficiency in transporting sugars, but with a higher preference for xylose when expressed in *hxt null* strains of *S. cerevisiae*, supporting growth on D-glucose[147]. Young et al., (2012)[153] suggested the E538K mutation in *Xut3* as responsible for improved affinity for xylose, in addition to improved growth at low xylose rates. Bueno et al., (2020)[158] used an evolutionary approach combined with analysis of diverse microbiomes to identify new xylose transporter candidates. In the study, the Cs4130 transporter from *Candida sojae* was identified and showed functional expression in *S. cerevisiae* at high xylose concentrations.

The Mgt05196 transporter identified in *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* underwent an analysis of its amino acid residues by site-directed mutagenesis to identify which ones are key in xylose transport. In the study, it was suggested that the F432A and N360S mutants increased the D-xylose transport activity of Mgt 05196 without any glucose inhibition[150]. From the xylose-consuming filamentous fungus *Trichoderma reesei*, was also identified a xylose transporter (*Xltr1*) with a suggested xylose transport activity with better efficiency than the endogenous *S. cerevisiae* transporter *Gal2*. Through site-directed mutagenesis it was indicated that the N326F amino acid mutation is the factor that contributes to the xylose-uptake activity.

Expression of N326F^{Xltr1p} in *S. cerevisiae hxt null* conferred high efficiency in xylose transport[159].

In *Arabidopsis thaliana*, genes encoding sugar transporters At5g17010 and At5g59250 were identified. Both genes were expressed in recombinant *S. cerevisiae* containing the genetic modifications for xylose consumption and had the consumption of this pentose analyzed in fermentations containing glucose and xylose. Strains expressing the At5g17010 and At5g59250 transporters consumed 25% and 40% more xylose, respectively, than the control strain[160]. However, in a comparative analysis of heterologous sugar transporters, the At5g59250 transporter did not show significant results in xylose uptake kinetics compared to the control[161]. Many other transporters have been identified in different origins: *An hxtB* (*Aspergillus nidulans*)[162], [163], *XylHP* (*Debaryomyces hansenii*)[147], among others.

Although many studies have focused on expressing heterologous xylose transporters in *S. cerevisiae*, the low activity and stability of such exogenous transporters, as well as the fact that most of these transporters exhibit competitive inhibition by glucose, have become a bottleneck for use in fermentations with co-consumption of sugars[164]. Thus, another widely used strategy is the expression of endogenous transporters modified to reconnect sugar affinity[143], [165], [166]. However, although recombinant strains exhibit the ability to ferment xylose as the sole carbon source, when mixed glucose and xylose fermentations are performed, xylose is consumed only after glucose depletion because the affinity of endogenous transporters for glucose is much higher than that of xylose, leading to slow metabolization of xylose in the presence of this hexose, even at low concentrations of this sugar[141], [164]. Several studies have sought to improve the ability of simultaneous sugar metabolization in recombinant strains, requiring a reduction in the affinity of hexose transporters for glucose, as well as an increase in their affinity for xylose[143]. In *S. cerevisiae*, endogenous *Hxt1-7* transporters along with *Gal2*, are responsible for the facilitated diffusion of xylose monosaccharides in *S. cerevisiae*[140]. Many studies have used different methodologies aiming to improve the ability of co-metabolism by increasing the affinity of hexose transporters to xylose in modified strains. Among these modifications there are random mutagenesis, genetic shuffling, evolutionary engineering, and overexpression[86], [143], [166]. Through rational and directed evolution approaches, several mutant xylose

transporters that do not undergo strong inhibition by glucose have also been identified[143], [154], [155], [166].

In this context, from an evolutionary engineering strategy, a growth-based screening platform for xylose transporters that lack glucose repression was developed. Using this platform and one of the error-prone PCR strategy, two mutant xylose transporters, *Hxt7*(N370S) and *Gal2*(N376F) insensitive to glucose, were identified[143]. In another study, an endogenous chimeric transporter (*Hxt36*) was constructed by fusing the endogenous transporters *Hxt3p* and *Hxt6p*. Through evolutionary engineering approach, in a strain expressing the *Hxt36* transporter, a mutation that increased the affinity for xylose was identified; such improvement was attributed to mutation of the residue N367A[165]. Through evolution, Shin et al. (2015)[166] also identified a mutation of residue N366 in *Hxt11* in recombinant *S. cerevisiae* htx null (*hxt1-7* and *gal2*). This mutation altered the specificity of the glucose transporter for xylose and enabled improved co-fermentation of these sugars. Nijland et al. (2016)[167], in a later study, suggested that some endogenous transporters underwent catabolite degradation and that prevention of *Hxt11* and *Hxt36* ubiquitination would be responsible for improved xylose fermentation. In another evolutionary engineering study, a F79S mutation in *Hxt7* resulted in improved D-xylose uptake[168]. Although many mutations have been identified as contributors to the affinity change in hexose transporters, a conserved asparagine residue has been identified in several studies at positions 360, 366, 367, 370 and 376 in Mgt05196[150], *Hxt11*[166], *Hxt36*[165], *Hxt7* and *Gal2*[143], respectively. This asparagine residue was mutated to different amino acids, causing a decreased affinity for glucose and, in some cases, an increased affinity for xylose. Another mutation identified was a cysteine to proline at position 505 that resulted in a 3-fold improvement in the xylose affinity of *Hxt2*[169]. The *Gal2* transporter was also used as a random mutagenesis model to obtain new mutants with increased xylose affinity. Through this strategy, the N376F mutation was identified. It caused a completely lost in D-glucose uptake, and in contrast, showed an increased affinity for D-xylose[143]. The *Gal2* N376Y mutant, after the addition of an M435I mutation by the same mutagenesis approach, showed an improved growth rate on xylose. However, a double mutant of *Gal2* N376F M435I did not show the same phenotype. Using new rounds of random mutagenesis, it was obtained the *Gal2* N376Y/M435I double mutant, that was shown to be completely insensitive to competitive inhibition by glucose and presented an improved ability to

transport xylose upon expression in recombinant *S. cerevisiae*[170]. Another mutation identified in *Gal2* was threonine at position 386 (T386A), enabling increased xylose uptake capacity and decreased glucose affinity, allowing co-consumption at low sugar concentrations[171].

Overexpression of hexose transporters has also been shown as another interesting approach to improve xylose uptake. In studies, it was proven that overexpression of the endogenous hexose transporters, *Hxt* and *Gal2*, can also provide improvements in the rate of xylose uptake in recombinant *S. cerevisiae*[86], [172].

3.6 POLYMORPHISMS

Metabolic engineering has been used to optimize microorganisms through targeted alteration in simple cellular characteristics[173]. In *S. cerevisiae*, such interventions have contributed to increased growth rates and xylose assimilation[21]. However, the need to improve this phenotype has intensified the search for techniques capable of improving xylose metabolism, with evolutionary approaches being one of the main ones used to increase the efficiency of metabolic engineering of complex phenotypes[21]. These evolutionary approaches are based on natural evolution and selection for lineage improvement, encompassing random genetic modifications and variations that occur at genome locations through random mutagenesis. The process of evolutionary engineering occurs by applying selective pressure to favor the desired phenotype; subsequently through screenings, it is possible to identify superior lineages presenting the characteristic of interest[174].

In the process of evolution, typically genetic variations encountered are single nucleotide polymorphisms (SNPs), deletions and insertions, gene duplications, chromosomal rearrangements, altered ploidy, and interspecific hybridization. SNPs are single changes in nucleotide bases along a DNA sequence, such single substitutions or small nucleotide deletions-insertions generate point mutations which occur due to errors in DNA replication or repair[175]. The presence of SNPs can cause “silent” mutations (also called synonymous mutation), where in both presented forms there is the same polypeptide sequence. However, synonymous mutations can affect the conformation and function of the protein and consequently the post-transcriptional processing and RNA regulation[176]. On the other hand, if the nucleotide change

generates a different polypeptide sequence, they are called non-synonymous mutations[177]. The non-synonymous mutation can lead to missense mutation or nonsense mutation; in the missense mutation it is obtained a different amino acid in the corresponding polypeptide, while in the nonsense mutation a termination codon appears, preventing the complete synthesis of the polypeptide chain[178].

In several evolutionary engineering studies, genetic perturbations were identified and through them, gene targets related to efficient xylose metabolization in recombinant *S. cerevisiae* were indicated. Evolutionary engineering has also been associated with other methodologies among chemical mutagenesis techniques, genome shuffling, genomic library screenings or transposon mutagenesis, to design mutant strains with enhanced xylose consumption and increased ethanol production rates[58], [63], [66], [100].

In genomic analyses in evolved strains of *S. cerevisiae* presenting different assimilation pathways, high expression of the *TAL1* and *TKL1* genes of the non-oxidative PPP pathway was observed and indicated as overexpression targets contributing to xylose metabolism[80]. The *PHO13* gene was another well elucidated metabolic target responsible for improving xylose consumption. This gene dephosphorylates intermediates derived from the PPP pathway, which can lead to the accumulation of dead-end metabolites. Therefore, in evolved *S. cerevisiae* strains different loss-of-function mutations in *PHO13* were identified and consequently the accumulation of metabolites was avoided, improving ethanol production from xylose[63], [66].

Other more complex approaches such as omics techniques: genomics, transcriptomics, metabolomics and fluxomics, directly contribute to an advance in the understanding of different phenotypes at the molecular level through the identification of new genetic targets responsible for the enhancement of phenotypes. A combination of omics-assisted evolution allowed the identification of different genes displaying loss-of-function mutations that contributed positively to the xylose consumption phenotype in recombinant *S. cerevisiae*, among them: *GRE3*, *HOG1*, *IRA2*, *ISU1*, *SSK2*, *GCR2*, *PMR1* and *ASC1*[2], [60], [61], [72]. Discussed in more detail in the subtopic "Deletions". Another interesting mutation was found in *CYC8*, a general transcriptional co-repressor, being a point mutation that resulted in an amino acid change causing a transcription alteration in a group of genes correlated with sugar metabolism and cell

wall biogenesis, including an increase in the expression of hxt transporters, favoring sugar transport and hexose/pentose co-metabolization[179].

However, despite the success in approaches used to obtain xylose assimilating *S. cerevisiae*, the understanding of the metabolism, regulation and signaling pathways involved in xylose consumption is still limited. There are hidden features of xylose metabolism that need to be identified to optimize fermentation processes. New approaches should be sought to identify non-obvious gene targets and to analyze the role of essential genes for the xylose consumption phenotype, as well as to evaluate the optimal expression level of genes directly and indirectly involved in xylose metabolism, in order to obtain optimized and efficient strains in xylose consumption and ethanol production.

3.7 REFERENCE

- [1] “Renewable Fuels Association (2022) Annual fuel ethanol production”, 2022.
- [2] L. V. Dos Santos *et al.*, “Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains”, *Sci. Rep.*, vol. 6, dez. 2016, doi: 10.1038/srep38676.
- [3] A. K. Chandel *et al.*, “Brazilian biorefineries from second generation biomass: critical insights from industry and future perspectives”, *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 15, n° 4, p. 1190–1208, 2021, doi: 10.1002/bbb.2234.
- [4] M. Balat, “Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review”, *Energy Convers. Manag.*, vol. 52, n° 2, p. 858–875, 2011, doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013.
- [5] R. M. Cadete *et al.*, “Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, n° 1, ago. 2016, doi: 10.1186/s13068-016-0570-6.
- [6] P. Y. Wang e H. Schneider, “Growth of yeasts on D-xylulose¹”, 1980. doi: 10.1139/m80-193.
- [7] N. W. Y. Ho, Z. Chen, e A. P. Brainard, “Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Effective Cofermentation of Glucose and Xylose”, 1998.
- [8] D. Brat, E. Boles, e B. Wiedemann, “Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, n° 8, p. 2304–2311, abr. 2009, doi: 10.1128/AEM.02522-08.

- [9] A. V Sarthy, B. L. McConaughy, Z. Lobo, J. A. Sundstrom, C. E. Furlong, e B. D. Hall, "Expression of the Escherichia coli Xylose Isomerase Gene in Saccharomyces cerevisiae", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 53, n° 9, p. 1996–2000, 1987.
- [10] R. Amore, M. Wilhelm, e C. P. Hollenberg, "Applied AFwrobiology Biotechnology The fermentation of xylose -- an analysis of the expression of Bacillus and Actinoplanes xylose isomerase genes in yeast **", vol. 75, p. 351–357, 1989.
- [11] C. J. Moes, I. S. Pretorius, e W. H. Van Zyl, "Cloning and expression of the Clostridium thermosulfurogenes D-xylose isomerase gene (XYK4) in Saccharomyces cerevisiae.", 1996.
- [12] M. Gárdonyi e B. Hahn-Hägerdal, "The Streptomyces rubiginosus xylose isomerase is misfolded when expressed in Saccharomyces cerevisiae", 2003.
- [13] E. Young, S. M. Lee, e H. Alper, "Optimizing pentose utilization in yeast: The need for novel tools and approaches", *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, 2010, doi: 10.1186/1754-6834-3-24.
- [14] Y. Wang *et al.*, "Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae", 2004.
- [15] K. L. Träff, L. J. Jönsson, e B. Hahn-Hägerdal, "Putative xylose and arabinose reductases in Saccharomyces cerevisiae", *Yeast*, vol. 19, n° 14, p. 1233–1241, 2002, doi: 10.1002/yea.913.
- [16] P. Kötter, R. Amore, C. P. Hollenberg, e M. Ciriacy, "Isolation and characterization of the Pichia stipitis xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae transformant", *Curr. Genet.*, vol. 18, n° 6, p. 493–500, 1990, doi: 10.1007/BF00327019.
- [17] M. Walfridsson *et al.*, "Xylose-Metabolizing Saccharomyces cerevisiae Strains Overexpressing the TKL1 and TAL1 Genes Encoding the Pentose Phosphate Pathway Enzymes Transketolase and Transaldolase", 1995.
- [18] A. Eliasson, C. Christensson, C. Fredrik Wahlbom, B. Ba", B. Hahn-Ha"gerdal, e H. Ha"gerdal, "Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant Saccharomyces cerevisiae Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures", 2000.
- [19] M. Walfridsson *et al.*, "Ethanolc Fermentation of Xylose with Saccharomyces cerevisiae Harboring the Thermus thermophilus xylA Gene, Which Expresses an Active Xylose (Glucose) Isomerase", 1996.
- [20] S. J. Ha, S. R. Kim, J. H. Choi, M. S. Park, e Y. S. Jin, "Xylitol does not inhibit xylose fermentation by engineered Saccharomyces cerevisiae expressing xylA as severely as it inhibits xylose isomerase reaction in vitro", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 92, n° 1, p. 77–84, out. 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3345-

9.

- [21] M. Kuyper *et al.*, “Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation”, vol. 5, p. 399–409, 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.010.
- [22] A. Madhavan *et al.*, “Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: Gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, n° 6, p. 1067–1078, abr. 2009, doi: 10.1007/s00253-008-1794-6.
- [23] T. W. Jeffries, “Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts, and Fungi”, 1983.
- [24] T. W. Jeffries, “Engineering yeasts for xylose metabolism”, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 17, n° 3. p. 320–326, junho de 2006. doi: 10.1016/j.copbio.2006.05.008.
- [25] K. Karhumaa, R. Fromanger, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 73, n° 5, p. 1039–1046, jan. 2007, doi: 10.1007/s00253-006-0575-3.
- [26] A. Matsushika e S. Sawayama, “Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 106, n° 3, p. 306–309, set. 2008, doi: 10.1263/jbb.106.306.
- [27] S. Watanabe, T. Kodaki, e K. Makino, “Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc”, *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 11, p. 10340–10349, mar. 2005, doi: 10.1074/jbc.M409443200.
- [28] J. Hou, Y. Shen, X. P. Li, e X. M. Bao, “Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 45, n° 2, p. 184–189, ago. 2007, doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02165.x.
- [29] S. Watanabe, S. P. Pack, A. A. Saleh, N. Annaluru, T. Kodaki, e K. Makino, “The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, n° 5, p. 1365–1369, 2007, doi: 10.1271/bbb.70104.
- [30] A. Matsushika, S. Watanabe, T. Kodaki, K. Makino, e S. Sawayama, “Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 105, n° 3, p. 296–299, mar. 2008, doi: 10.1263/jbb.105.296.

- [31] R. Verho, J. Londesborough, M. Penttilä, e P. Richard, “Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 10, p. 5892–5897, out. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.10.5892-5897.2003.
- [32] C. Bro, B. Regenber, J. Förster, e J. Nielsen, “In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production”, *Metab. Eng.*, vol. 8, n° 2, p. 102–111, mar. 2006, doi: 10.1016/j.ymben.2005.09.007.
- [33] K. Karhumaa, R. G. Sanchez, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microb. Cell Fact.*, vol. 6, 2007, doi: 10.1186/1475-2859-6-5.
- [34] M. Bettiga, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 1, out. 2008, doi: 10.1186/1754-6834-1-16.
- [35] X. Li, A. Park, R. Estrela, S. R. Kim, Y. S. Jin, e J. H. D. Cate, “Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Reports*, vol. 9, p. 53–56, mar. 2016, doi: 10.1016/j.btre.2016.01.003.
- [36] H. Zhou, J. sheng Cheng, B. L. Wang, G. R. Fink, e G. Stephanopoulos, “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.*, vol. 14, n° 6, p. 611–622, 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.07.011.
- [37] S. Kwak e Y. S. Jin, “Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective”, *Microbial Cell Factories*, vol. 16, n° 1. BioMed Central Ltd., 11 de maio de 2017. doi: 10.1186/s12934-017-0694-9.
- [38] B. Temer *et al.*, “Conversion of an inactive xylose isomerase into a functional enzyme by co-expression of GroEL-GroES chaperonins in *Saccharomyces cerevisiae*”, *BMC Biotechnol.*, vol. 17, n° 1, set. 2017, doi: 10.1186/s12896-017-0389-7.
- [39] M. Kuyper *et al.*, “High-level functional expression of a fungal xylose isomerase : the key to e/cient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae* ?”, vol. 4, 2003, doi: 10.1016/S1567-1356(03)00141-7.
- [40] M. Kuyper, A. A. Winkler, J. P. Van Dijken, e J. T. Pronk, “Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: A proof of principle”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 4, n° 6, p. 655–664, mar. 2004, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.01.003.

- [41] M. Kuyper, M. J. Toirkens, J. A. Diderich, A. A. Winkler, J. P. Van Dijken, e J. T. Pronk, “Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain”, vol. 5, p. 925–934, 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2005.04.004.
- [42] N. S. Parachin e M. F. Gorwa-Grauslund, “Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 4, 2011, doi: 10.1186/1754-6834-4-9.
- [43] R. E. Hector, B. S. Dien, M. A. Cotta, e J. A. Mertens, “Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, n° 1, 2013, doi: 10.1186/1754-6834-6-84.
- [44] J. Hou, Y. Shen, C. Jiao, R. Ge, X. Zhang, e X. Bao, “Characterization and evolution of xylose isomerase screened from the bovine rumen metagenome in *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 121, n° 2, p. 160–165, fev. 2016, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.05.014.
- [45] S. Katahira *et al.*, “Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, n° 1, ago. 2017, doi: 10.1186/s13068-017-0890-1.
- [46] P. C. Silva, J. A. Ceja-Navarro, F. Azevedo, U. Karaoz, E. L. Brodie, e B. Johansson, “A novel d-xylose isomerase from the gut of the wood feeding beetle *Odontotaenius disjunctus* efficiently expressed in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Sci. Rep.*, vol. 11, n° 1, dez. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83937-z.
- [47] M. M. Demeke *et al.*, “Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, n° 1, 2013, doi: 10.1186/1754-6834-6-89.
- [48] P. V. Attfield e P. J. L. Bell, “Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 6, n° 6, p. 862–868, set. 2006, doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00098.x.
- [49] J. W. Wenger, K. Schwartz, e G. Sherlock, “Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*”, *PLoS Genet.*, vol. 6, n° 5, p. 18, maio 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1000942.
- [50] M. H. Toivari, L. Salusjärvi, L. Ruohonen, e M. Penttilä, “Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, n° 6, p. 3681–3686, jun. 2004, doi: 10.1128/AEM.70.6.3681-3686.2004.

- [51] C. A. Batt, S. Carvallo, D. D. Easson, M. Akedo, e A. J. Sinskey, “Direct Evidence for a Xylose Metabolic Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*”, 1986.
- [52] K. L. Traäff-Bjerre, M. Jeppsson, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Yeast*, vol. 21, n° 2, p. 141–150, jan. 2003, doi: 10.1002/yea.1072.
- [53] K. L. Träff, R. R. O. Cordero, W. H. V Zyl, e B. Hahn-Hägerdal, “Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 12, p. 5668–5674, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.12.5668.
- [54] K. Yamanaka, “Inhibition of D-Xylose Isomerase”, 1969. doi: 10.1016/0003-9861(69)90422-6.
- [55] A. Lönn, K. L. Träff-Bjerre, R. R. Cordero Otero, W. H. Van Zyl, e B. Hahn-Hägerdal, “Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated xylA from *Thermus thermophilus*”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 32, n° 5, p. 567–573, abr. 2003, doi: 10.1016/S0141-0229(03)00024-3.
- [56] O. Bengtsson *et al.*, “Identification of common traits in improved xylose-growing *Saccharomyces cerevisiae* for inverse metabolic engineering”, *Yeast*, vol. 25, n° 11, p. 835–847, 2008, doi: 10.1002/yea.1638.
- [57] N. S. Parachin, O. Bengtsson, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “The deletion of YLR042c improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Yeast*, vol. 27, n° 9, p. 741–751, set. 2010, doi: 10.1002/yea.1777.
- [58] J. Usher *et al.*, “Chemical and synthetic genetic array analysis identifies genes that suppress xylose utilization and fermentation in *saccharomyces cerevisiae*”, *G3 Genes, Genomes, Genet.*, vol. 1, n° 4, p. 247–258, set. 2011, doi: 10.1534/g3.111.000695.
- [59] M. D. Verhoeven *et al.*, “Mutations in PMR1 stimulate xylose isomerase activity and anaerobic growth on xylose of engineered *Saccharomyces cerevisiae* by influencing manganese homeostasis”, *Sci. Rep.*, vol. 7, abr. 2017, doi: 10.1038/srep46155.
- [60] P. Tran Nguyen Hoang, J. K. Ko, G. Gong, Y. Um, e S. M. Lee, “Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, n° 1, set. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1269-7.
- [61] T. K. Sato *et al.*, “Directed Evolution Reveals Unexpected Epistatic Interactions That Alter Metabolic Regulation and Enable Anaerobic Xylose Use by *Saccharomyces cerevisiae*”, *PLoS Genet.*, vol. 12, n° 10, out. 2016, doi:

10.1371/journal.pgen.1006372.

- [62] K. S. Myers *et al.*, “Rewired cellular signaling coordinates sugar and hypoxic responses for anaerobic xylose fermentation in yeast”, *PLoS Genet.*, vol. 15, n° 3, mar. 2019, doi: 10.1371/journal.pgen.1008037.
- [63] H. Ni, J. M. Laplaza, e T. W. Jeffries, “Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-xylose”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n° 7, p. 2061–2066, abr. 2007, doi: 10.1128/AEM.02564-06.
- [64] J. H. Van Vleet, T. W. Jeffries, e L. Olsson, “Deleting the para-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), PHO13, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on d-xylose”, *Metab. Eng.*, vol. 10, n° 6, p. 360–369, nov. 2008, doi: 10.1016/j.ymben.2007.12.002.
- [65] K. Fujitomi, T. Sanda, T. Hasunuma, e A. Kondo, “Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural”, *Bioresour. Technol.*, vol. 111, p. 161–166, maio 2012, doi:10.1016/j.biortech.2012.01.161.
- [66] S. R. Kim *et al.*, “Rational and Evolutionary Engineering Approaches Uncover a Small Set of Genetic Changes Efficient for Rapid Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*”, *PLoS One*, vol. 8, n° 2, fev. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057048.
- [67] Y. C. Li, Z. X. Gou, Z. S. Liu, Y. Q. Tang, T. Akamatsu, e K. Kida, “Synergistic effects of TAL1 over-expression and PHO13 deletion on the weak acid inhibition of xylose fermentation by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain”, *Biotechnol. Lett.*, vol. 36, n° 10, p. 2011–2021, 2014, doi: 10.1007/s10529-014-1581-7.
- [68] S. M. Lee, T. Jellison, e H. S. Alper, “Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, n° 1, ago. 2014, doi: 10.1186/s13068-014-0122-x.
- [69] T. Bamba, T. Hasunuma, e A. Kondo, “Disruption of PHO13 improves ethanol production via the xylose isomerase pathway”, *AMB Express*, vol. 6, n° 1, p. 1–10, dez. 2016, doi: 10.1186/s13568-015-0175-7.
- [70] H. Xu *et al.*, “PHO13 deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*”, *Metab. Eng.*, vol. 34, p. 88–96, mar. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2015.12.007.
- [71] S. R. Kim *et al.*, “Deletion of PHO13, encoding haloacid dehalogenase type IIA phosphatase, results in upregulation of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, n° 5, p. 1601–1609, 2015, doi: 10.1128/AEM.03474-14.

- [72] M. Shin *et al.*, “Transcriptomic Changes Induced by Deletion of Transcriptional Regulator GCR2 on Pentose Sugar Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, mar. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.654177.
- [73] S. Wei *et al.*, “Disruption of the transcription factors Thi2p and Nrm1p alleviates the post-glucose effect on xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, n° 1, abr. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1112-1.
- [74] M. Wu *et al.*, “Simulating extracellular glucose signals enhances xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microorganisms*, vol. 8, n° 1, jan. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8010100.
- [75] G. C. de L. Palermo, N. Coutouné, J. G. R. Bueno, L. F. Maciel, e L. V. dos Santos, “Exploring metal ion metabolisms to improve xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microb. Biotechnol.*, vol. 14, n° 5, p. 2101–2115, set. 2021, doi: 10.1111/1751-7915.13887.
- [76] L. Dzanaeva, B. Kruk, J. Ruchala, A. Sibirny, e K. Dmytruk, “The impact of transcription factors Znf1, Sip4, Adr1, Tup1, and Hap4 on xylose alcoholic fermentation in the engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 114, n° 9, p. 1373–1385, set. 2021, doi: 10.1007/s10482-021-01607-6.
- [77] B. Johansson, C. Christensson, T. Hogley, e B. Hahn-Hägerdal, “Xylulokinase Overexpression in Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Also Expressing Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase and Its Effect on Fermentation of Xylose and Lignocellulosic Hydrolysate”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 9, p. 4249–4255, set. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.9.4249-4255.2001.
- [78] Y. S. Jin, H. Ni, J. M. Laplaza, e T. W. Jeffries, “Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 1, p. 495–503, jan. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.1.495-503.2003.
- [79] A. Matsushika, T. Goshima, T. Fujii, H. Inoue, S. Sawayama, e S. Yano, “Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, n° 1, p. 16–25, jun. 2012, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.03.008.
- [80] C. F. Wahlbom, R. R. Cordero Otero, W. H. Van Zyl, B. Hahn-Hägerdal, e L. J. Jönsson, “Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 2, p. 740–746, fev. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.2.740-746.2003.
- [81] P. Hoang Nguyen Tran, J. K. Ko, G. Gong, Y. Um, e S. M. Lee, “Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 13,

- n° 1, jan. 2020, doi: 10.1186/s13068-019-1641-2.
- [82] L. Zheng *et al.*, “Improving xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing nuclear-localized hexokinase 2”, *Microorganisms*, vol. 8, n° 6, p. 1–14, jun. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8060856.
- [83] S. Wei *et al.*, “A Thi2p Regulatory Network Controls the Post-glucose Effect of Xylose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Front. Microbiol.*, vol. 10, n° JULY, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01649.
- [84] S. R. Kim, S. J. Ha, I. I. Kong, e Y. S. Jin, “High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*”, *Metab. Eng.*, vol. 14, n° 4, p. 336–343, 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.04.001.
- [85] J. Zha, M. L. Hu, M. H. Shen, B. Z. Li, J. Y. Wang, e Y. J. Yuan, “Balance of XYL1 and XYL2 expression in different yeast chassis for improved xylose fermentation”, *Front. Microbiol.*, vol. 3, n° OCT, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00355.
- [86] T. Tanino, T. Ito, C. Ogino, N. Ohmura, T. Ohshima, e A. Kondo, “Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xyloseisomerase pathway”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 114, n° 2, p. 209–211, ago. 2012, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.004.
- [87] L. Xu, P. Liu, Z. Dai, F. Fan, e X. Zhang, “Fine-tuning the expression of pathway gene in yeast using a regulatory library formed by fusing a synthetic minimal promoter with different Kozak variants”, *Microb. Cell Fact.*, vol. 20, n° 1, dez. 2021, doi: 10.1186/s12934-021-01641-z.
- [88] Tong Ihn Lee *et al.*, “Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*”, 2002.
- [89] H. C. Causton *et al.*, “Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes”, 2001.
- [90] D. Maya, M. J. Quintero, M. De La Cruz Muñoz-Centeno, e S. Chávez, “Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnology Letters*, vol. 30, n° 6. p. 979–987, junho de 2008. doi: 10.1007/s10529-008-9647-z.
- [91] G. Hubmann, J. M. Thevelein, e E. Nevoigt, “Natural and modified promoters for tailored metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Methods Mol. Biol.*, vol. 1152, p. 17–42, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0563-8_2.
- [92] N. A. Da Silva e S. Srikrishnan, “Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS Yeast Research*, vol. 12, n° 2. p. 197–214, março de 2012. doi: 10.1111/j.1567-

1364.2011.00769.x.

- [93] H. Tang *et al.*, “Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Metabolites*, vol. 10, nº 8. MDPI AG, p. 1–20, 1 de agosto de 2020. doi: 10.3390/metabo10080320.
- [94] K. Weinhandl, M. Winkler, A. Glieder, e A. Camattari, “Carbon source dependent promoters in yeasts”, 2014.
- [95] N. Li, L. M. Zhang, K. Q. Zhang, J. S. Deng, R. Prändl, e F. Schöffl, “Effects of heat stress on yeast heat shock factor-promoter binding in vivo”, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 38, nº 5, p. 356–362, maio 2006, doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00170.x.
- [96] X. Feng e M. A. Marchisio, “*Saccharomyces cerevisiae* promoter engineering before and during the synthetic biology era”, *Biology*, vol. 10, nº 6. MDPI AG, 1 de junho de 2021. doi: 10.3390/biology10060504.
- [97] H. Alper, C. Fischer, E. Nevoigt, e G. Stephanopoulos, “Tuning genetic control through promoter engineering”, 2005.
- [98] N. Q. Meinander, I. Boels, e H.-H. / Igerdalt, “TI QIIIOL(iY Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpression of TALI”, 1999.
- [99] M. Jeppsson, B. Johansson, P. R. Jensen, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains”, *Yeast*, vol. 20, nº 15, p. 1263–1272, nov. 2003, doi: 10.1002/yea.1043.
- [100] C. Lu e T. Jeffries, “Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, nº 19, p. 6072–6077, out. 2007, doi: 10.1128/AEM.00955-07.
- [101] R. E. Hector e J. A. Mertens, “A Synthetic Hybrid Promoter for Xylose-Regulated Control of Gene Expression in *Saccharomyces* Yeasts”, *Mol. Biotechnol.*, vol. 59, nº 1, p. 24–33, jan. 2017, doi: 10.1007/s12033-016-9991-5.
- [102] Y. Nambu-Nishida, Y. Sakihama, J. Ishii, T. Hasunuma, e A. Kondo, “Selection of yeast *Saccharomyces cerevisiae* promoters available for xylose cultivation and fermentation”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 125, nº 1, p. 76–86, jan. 2018, doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.08.001.
- [103] L. Xiong, Y. Zeng, R. Q. Tang, H. S. Alper, F. W. Bai, e X. Q. Zhao, “Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microb. Cell Fact.*, vol. 17, nº 1, abr. 2018, doi: 10.1186/s12934-018-0899-6.

- [104] Y. Kobayashi, T. Sahara, S. Ohgiya, Y. Kamagata, e K. E. Fujimori, “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*, vol. 8, n° 1, dez. 2018, doi: 10.1186/s13568-018-0670-8.
- [105] V. Endalur Gopinarayanan e N. U. Nair, “A semi-synthetic regulon enables rapid growth of yeast on xylose”, *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, dez. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03645-7.
- [106] K. A. Curran, A. S. Karim, A. Gupta, e H. S. Alper, “Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications”, *Metab. Eng.*, vol. 19, p. 88–97, set. 2013, doi: 10.1016/j.ymben.2013.07.001.
- [107] T. Matsuyama, “Recent developments in terminator technology in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 128, n° 6. Elsevier B.V., p. 655–661, 1 de dezembro de 2019. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.06.006.
- [108] Z. Guo e F. Sherman, “Signals Sufficient for 3-End Formation of Yeast mRNA”, 1996.
- [109] T. Tuller, E. Ruppin, e M. Kupiec, “Properties of untranslated regions of the *S. cerevisiae* genome”, *BMC Genomics*, vol. 10, ago. 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-391.
- [110] H. E. Mischo e N. J. Proudfoot, “Disengaging polymerase: Terminating RNA polymerase II transcription in budding yeast”, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1829, n° 1. p. 174–185, janeiro de 2013. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.10.003.
- [111] M. Yamanishi *et al.*, “A genome-wide activity assessment of terminator regions in *saccharomyces cerevisiae* provides a ‘terminatome’ toolbox”, *ACS Synth. Biol.*, vol. 2, n° 6, p. 337–347, jun. 2013, doi: 10.1021/sb300116y.
- [112] K. A. Curran, N. J. Morse, K. A. Markham, A. M. Wagman, A. Gupta, e H. S. Alper, “Short Synthetic Terminators for Improved Heterologous Gene Expression in Yeast”, *ACS Synth. Biol.*, vol. 4, n° 7, p. 824–832, jul. 2015, doi: 10.1021/sb5003357.
- [113] S. Watanabe, A. A. Saleh, S. P. Pack, N. Annaluru, T. Kodaki, e K. Makino, “Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase”, *J. Biotechnol.*, vol. 130, n° 3, p. 316–319, jun. 2007, doi:10.1016/j.jbiotec.2007.04.019.
- [114] A. Matsushika *et al.*, “Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 81, n° 2, p. 243–

255, nov. 2008, doi: 10.1007/s00253-008-1649-1.

- [115] M. Jeppsson, O. Bengtsson, K. Franke, H. Lee, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher KM for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 93, n° 4, p. 665–673, mar. 2006, doi: 10.1002/bit.20737.
- [116] L. Liang, J. Zhang, e Z. Lin, “Altering coenzyme specificity of *Pichia stipitis* xylose reductase by the semi-rational approach CASTing”, *Microb. Cell Fact.*, vol. 6, nov. 2007, doi: 10.1186/1475-2859-6-36.
- [117] B. Petschacher e B. Nidetzky, “Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microb. Cell Fact.*, vol. 7, mar. 2008, doi: 10.1186/1475-2859-7-9.
- [118] D. Runquist, B. Hahn-Hägerdal, e M. Bettiga, “Increased ethanol productivity in xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* via a randomly mutagenized xylose reductase”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, n° 23, p. 7796–7802, dez. 2010, doi: 10.1128/AEM.01505-10.
- [119] M. Kostrzynska, C. R. Sopher, e H. Lee, “Mutational analysis of the role of the conserved lysine-270 in the *Pichia stipitis* xylose reductase”, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 159, n° 1, p. 107–112, fev. 1998, doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12848.x.
- [120] S. H. Lee, T. Kodaki, Y. C. Park, e J. H. Seo, “Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biotechnol.*, vol. 158, n° 4, p. 184–191, abr. 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.005.
- [121] K. L. Kavanagh, M. Klimacek, B. Nidetzky, e D. K. Wilson, “The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*”, *Biochemistry*, vol. 41, n° 28, p. 8785–8795, jul. 2002, doi: 10.1021/bi025786n.
- [122] K. L. Kavanagh, M. Klimacek, B. Nidetzky, e D. K. Wilson, “Structure of xylose reductase bound to NAD⁺ and the basis for single and dual co-substrate specificity in family 2 aldo-keto reductases”, 2003.
- [123] S. Leitgeb, B. Petschacher, D. K. Wilson, e B. Nidetzky, “Fine tuning of coenzyme specificity in family 2 aldo-keto reductases revealed by crystal structures of the Lys-274 → Arg mutant of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) bound to NAD⁺ and NADP⁺”, *FEBS Lett.*, vol. 579, n° 3, p. 763–767, jan. 2005, doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.063.
- [124] B. Petschacher, S. Leitgeb, K. L. Kavanagh, D. K. Wilson, e B. Nidetzky, “The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography”, 2005.

- [125] B. Petschacher e B. Nidetzky, "Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: Antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site-directed mutants under simulated in vivo conditions", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, n° 10, p. 6390–6393, out. 2005, doi: 10.1128/AEM.71.10.6390-6393.2005.
- [126] N. Annaluru, S. Watanabe, S. P. Pack, A. A. Saleh, T. Kodaki, e K. Makino, "Thermostabilization of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase by mutation of structural zinc-binding loop", *J. Biotechnol.*, vol. 129, n° 4, p. 717–722, maio 2007, doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.006.
- [127] A. Matsushika, H. Inoue, S. Watanabe, T. Kodaki, K. Makino, e S. Sawayama, "Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, n° 11, p. 3818–3822, jun. 2009, doi: 10.1128/AEM.02636-08.
- [128] M. Jeppsson, B. Johansson, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, "Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, n° 4, p. 1604–1609, 2002, doi: 10.1128/AEM.68.4.1604-1609.2002.
- [129] T. L. Nissen, M. C. Kielland-Brandt, J. Nielsen, e J. Villadsen, "Optimization of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation", 2000.
- [130] C. Roca, J. Nielsen, e L. Olsson, "Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 8, p. 4732–4736, ago. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.8.4732-4736.2003.
- [131] T. Grotkjær, P. Christakopoulos, J. Nielsen, e L. Olsson, "Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains", *Metab. Eng.*, vol. 7, n° 5–6, p. 437–444, set. 2005, doi: 10.1016/j.ymben.2005.07.003.
- [132] J. Hou, G. N. Vemuri, X. Bao, e L. Olsson, "Impact of overexpressing NADH kinase on glucose and xylose metabolism in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, n° 5, p. 909–919, abr. 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1900-4.
- [133] G. C. Zhang, J. J. Liu, e W. T. Ding, "Decreased xylitol formation during xylose fermentation in *saccharomyces cerevisiae* due to overexpression of water-forming NADH oxidase", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, n° 4, p. 1081–1086, fev. 2012, doi: 10.1128/AEM.06635-11.
- [134] K. Y. Hara *et al.*, "Transporter engineering in biomass utilization by yeast", *FEMS Yeast Research*, vol. 17, n° 7. Oxford University Press, 1 de novembro de 2017. doi: 10.1093/femsyr/fox061.

- [135] M. D. Marger e M. H. Saier, "A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport " Principles of protein evolution", 1993.
- [136] S. S. Pao, I. T. Paulsen, e M. H. Saier, "Major Facilitator Superfamily", 1998.
- [137] E. M. Quistgaard, C. Löw, F. Guettou, e P. Nordlund, "Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 17, nº 2. Nature Publishing Group, p. 123–132, 1 de fevereiro de 2016. doi: 10.1038/nrm.2015.25.
- [138] S. Özcan e M. Johnston, "Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters", 1999.
- [139] T. Hamacher, J. Becker, M. R. Ga, B. R. Hahn-Ha, Gerdal, e E. Boles, "Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization", 2002.
- [140] M. Sedlak e N. W. Y. Ho, "Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast", *Yeast*, vol. 21, nº 8, p. 671–684, jun. 2004, doi: 10.1002/yea.1060.
- [141] T. Subtil e E. Boles, "Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Biofuels*, vol. 5, 2012, doi: 10.1186/1754-6834-5-14.
- [142] M. Bertilsson, J. Andersson, e G. Lidén, "Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 31, nº 4, p. 369–377, jun. 2008, doi: 10.1007/s00449-007-0169-1.
- [143] A. Farwick, S. Bruder, V. Schadeweg, M. Oreb, e E. Boles, "Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, nº 14, p. 5159–5164, 2014, doi: 10.1073/pnas.1323464111.
- [144] R. Wiczorke, S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg, e E. Boles, "Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*", 1999.
- [145] E. Boles e M. Oreb, "A growth-based screening system for hexose transporters in yeast", in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1713, Humana Press Inc., 2018, p. 123–135. doi: 10.1007/978-1-4939-7507-5_10.
- [146] M. Wijsman *et al.*, "A toolkit for rapid CRISPR-SpCas9 assisted construction of hexose-transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains", *FEMS Yeast Res.*, vol. 19, nº 1, jan. 2019, doi: 10.1093/femsyr/foy107.

- [147] E. Young, A. Poucher, A. Comer, A. Bailey, e H. Alper, "Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, n° 10, p. 3311–3319, maio 2011, doi: 10.1128/AEM.02651-10.
- [148] J. G. Nijland e A. J. M. Driessen, "Engineering of Pentose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7. Frontiers Media S.A., 29 de janeiro de 2020. doi: 10.3389/fbioe.2019.00464.
- [149] M. J. Leandro, P. Gonçalves, e I. Spencer-Martins, "Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: First molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter", *Biochem. J.*, vol. 395, n° 3, p. 543–549, maio 2006, doi: 10.1042/BJ20051465.
- [150] C. Wang *et al.*, "Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization", *Metab. Eng.*, vol. 30, p. 79–88, jul. 2015, doi: 10.1016/j.ymben.2015.04.007.
- [151] D. Runquist, C. Fonseca, P. Rådström, I. Spencer-Martins, e B. Hahn-Hägerdal, "Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, n° 1, p. 123–130, fev. 2009, doi: 10.1007/s00253-008-1773-y.
- [152] C. Fonseca *et al.*, "The glucose/xylose facilitator Gxf1 from *Candida intermedia* expressed in a xylose-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* increases xylose uptake in SSCF of wheat straw", *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 48, n° 6–7, p. 518–525, maio 2011, doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.02.010.
- [153] E. M. Young, A. D. Comer, H. Huang, e H. S. Alper, "A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", *Metab. Eng.*, vol. 14, n° 4, p. 401–411, jul. 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.03.004.
- [154] H. Li, O. Schmitz, e H. S. Alper, "Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, n° 23, p. 10215–10223, dez. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7879-8.
- [155] E. M. Young, A. Tong, H. Bui, C. Spofford, e H. S. Alper, "Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 1, p. 131–136, 2014, doi: 10.1073/pnas.1311970111.
- [156] T. Weierstall, C. P. Hollenberg, e E. Boles, "Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*".

- [157] S. Katahira *et al.*, “Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 43, n° 2, p. 115–119, ago. 2008, doi: 10.1016/j.enzmictec.2008.03.001.
- [158] J. G. R. Bueno *et al.*, “Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 13, n° 1, ago. 2020, doi: 10.1186/s13068-020-01782-0.
- [159] Y. Jiang *et al.*, “Identification and Characterization of an Efficient d -Xylose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 68, n° 9, p. 2702–2710, mar. 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.9b07113.
- [160] R. E. Hector, N. Qureshi, S. R. Hughes, e M. A. Cotta, “Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 80, n° 4, p. 675–684, set. 2008, doi: 10.1007/s00253-008-1583-2.
- [161] D. Runquist, B. Hahn-Hägerdal, e P. Rådström, “Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, 2010.
- [162] T. F. Dos Reis *et al.*, “Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*”, *PLoS One*, vol. 8, n° 11, nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0081412.
- [163] A. C. Colabardini *et al.*, “Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, n° 1, abr. 2014, doi: 10.1186/1754-6834-7-46.
- [164] J. Hou, C. Qiu, Y. Shen, H. Li, e X. Bao, “Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 17, n° 4, 2017, doi: 10.1093/femsyr/fox034.
- [165] J. G. Nijland, H. Y. Shin, R. M. De Jong, P. P. De Waal, P. Klaassen, e A. J. M. Driessen, “Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, n° 1, 2014, doi: 10.1186/s13068-014-0168-9.
- [166] H. Y. Shin, J. G. Nijland, P. P. De Waal, R. M. De Jong, P. Klaassen, e A. J. M. Driessen, “An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, n° 1, nov. 2015, doi: 10.1186/s13068-015-0360-6.
- [167] J. G. Nijland, E. Vos, H. Y. Shin, P. P. De Waal, P. Klaassen, e A. J. M. Driessen, “Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, n° 1, jul. 2016, doi: 10.1186/s13068-016-0573-3.

- [168] A. R. Apel, M. Ouellet, H. Szmidt-Middleton, J. D. Keasling, e A. Mukhopadhyay, “Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Sci. Rep.*, vol. 6, jan. 2016, doi: 10.1038/srep19512.
- [169] J. G. Nijland, H. Y. Shin, P. P. de Waal, P. Klaassen, e A. J. M. Driessen, “Increased xylose affinity of Hxt2 through gene shuffling of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 124, n° 2, p. 503–510, fev. 2018, doi: 10.1111/jam.13670.
- [170] S. A. T. Rojas, V. Schadeweg, F. Kirchner, E. Boles, e M. Oreb, “Identification of a glucose-insensitive variant of Gal2 from *Saccharomyces cerevisiae* exhibiting a high pentose transport capacity”, *Sci. Rep.*, vol. 11, n° 1, dez. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-03822-7.
- [171] O. Reznicek *et al.*, “Improved xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* due to directed evolution of galactose permease Gal2 for sugar co-consumption”, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 119, n° 1, p. 99–111, jul. 2015, doi: 10.1111/jam.12825.
- [172] D. L. Gonçalves, A. Matsushika, B. B. de Sales, T. Goshima, E. P. S. Bon, e B. U. Stambuk, “Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 63, p. 13–20, 2014, doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.05.003.
- [173] S. Ostergaard, L. Olsson, e J. Nielsen, “Artigo recombinação de leveduras”, vol. 64, n° 1, p. 34–50, 2000.
- [174] U. Sauer, “Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes.”, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 73, p. 129–169, 2001, doi: 10.1007/3-540-45300-8_7.
- [175] J. M. Guillamón e E. Barrio, “Genetic polymorphism in wine yeasts: Mechanisms and methods for its detection”, *Front. Microbiol.*, vol. 8, n° MAY, p. 1–20, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00806.
- [176] Z. E. Sauna e C. Kimchi-Sarfaty, “Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease”, *Nat. Rev. Genet.*, vol. 12, n° 10, p. 683–691, 2011, doi: 10.1038/nrg3051.
- [177] C. M. Yates e M. J. E. Sternberg, “The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) on protein-protein interactions”, *J. Mol. Biol.*, vol. 425, n° 21, p. 3949–3963, 2013, doi: 10.1016/j.jmb.2013.07.012.
- [178] K. J. DUDLEY, Joel T.; KARCZEWSKI, *Exploring personal genomics*, First edit. Oxford University Press, 2013.
- [179] J. G. Nijland, H. Y. Shin, L. G. M. Boender, P. P. De Waal, P. Klaassen, e A. J. M. Driessen, “Improved Xylose Metabolism by a CYC8 Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl Env. Microbiol* 83e00095-17, 2017.

4 CAPÍTULO II: Desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* para fermentação industrial de xilose

Neste capítulo é discutido o desenvolvimento de uma plataforma de levedura de parentais industriais com *background* robusto para metabolização de xilose e resistente aos estresses encontrados no hidrolisado de cana-de-açúcar de segunda geração.

Resumo

A xilose está presente no material lignocelulósico, sendo o segundo carboidrato mais abundante na natureza. Contudo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na indústria sucroenergética devido à uma alta capacidade de fermentar açúcares, é incapaz de assimilar essa pentose, tornando necessário a expressão heteróloga de enzimas – em especial as xiloses isomerases (XI) – que possibilitem a metabolização desse açúcar. A engenharia metabólica que permita a expressão de XI funcionais e eficientes em *S. cerevisiae* é um fator importante para tornar viável a produção de etanol de segunda geração (2G). Neste contexto, desenvolveu-se uma plataforma para teste e expressão de novas XI em *S. cerevisiae* a partir do cruzamento das linhagens FMY097 e LVY27 – segregantes haploides derivadas das cepas industriais SA-1 e PE-2, respectivamente. Por fim, obteve-se a linhagem BVY008, apresentando fenótipo de resistência à até 40 mM de 5-hidroximetilfurfural e modificações genéticas para superexpressão de genes da via da pentose fosfato não oxidativa (*TAL1*, *RKI1*, *TKL1* e *RPE1*) e do gene *XKS1*, além da deleção de *GRE3*. Em paralelo, 14 novas xilose isomerases potencialmente funcionais foram prospectadas *in silico*, dentre as quais: três (XI-05, XI-11, XI-12) apresentaram o crescimento aeróbio em xilose, sendo que duas (XI-11 e XI-12) demonstraram a capacidade de fermentar xilose e produzir etanol, a partir de expressão episomal. Os genes XI-05 e XI-11 foram integradas no genoma da plataforma desenvolvida BVY008, a fim de melhorar o fenótipo através de abordagens de evolução adaptativa. Sendo assim, a descoberta de novas XI funcionais em *S. cerevisiae* fornece um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de novas linhagens fermentadoras de xilose utilizando o *background* robusto de cepas industriais.

4.1 Introdução

Apesar de não possuir a capacidade natural de consumir xilose, a *S. cerevisiae* possui maquinaria para metabolizar a xilulose, um produto isomerizado da xilose, em etanol. Logo, a inserção de genes que permitam a conversão de xilose em xilulose torna-se importante para viabilizar a produção de etanol celulósico a partir dessa espécie[1]. Linhagens selvagens possuem o gene *XKS1* que codifica para enzima xiluloquinase (XK ou XKS) que possibilita a metabolização de xilulose. Uma vez metabolizada, a xilulose é convertida a xilulose-5-fosfato e, posteriormente, é canalizada na pela via das pentoses fosfato (PPP), levando a produção de etanol[2]. Devido a isso, duas vias diferentes são comumente expressas em *S. cerevisiae* para converter xilose em xilulose e, conseqüentemente em etanol: a via oxirredutiva - xilose redutase–xilitol desidrogenase (XR-XDH)[3] - e a da xilose isomerase (XI)[4], [5]. A **Figura 2** apresenta as vias heterólogas de consumo de xilose expressas em *S. cerevisiae*.

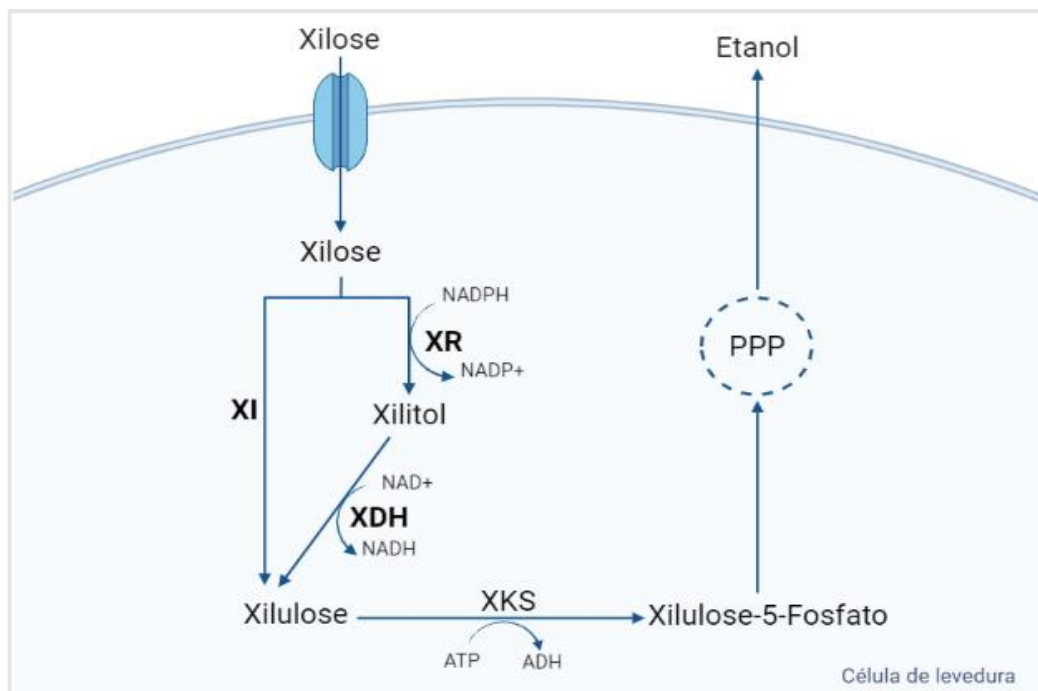


Figura 2. Expressão heteróloga das vias metabólicas da xilose em levedura. A xilose pode ser assimilada pela xilose (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) (via oxirredutiva) ou através da xilose isomerase (XI) (via isomerase) ambas produzindo xilulose. A fosforilação da xilulose pela xilulose quinase (XKS) produz xilulose-5-P, entra na via das pentoses fosfato (PPP) e finalmente é produzido o etanol.

A via oxirredutiva é encontrada em espécies de fungos e leveduras fermentadoras[3]. Apresenta duas etapas, catalisadas pelas enzimas xilose redutase

(XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Na primeira reação a xilose é reduzida a xilitol pela XR, preferencialmente usando NADPH como cofator. O xilitol é então oxidado a xilulose pela XDH, que normalmente utiliza NAD⁺ como cofator[6]. Essa predileção de cofatores entre as enzimas XR e XDH ocasiona um desequilíbrio no potencial redox da célula, levando ao acúmulo de xilitol no citosol e, conseqüentemente, compromete o rendimento final de etanol[4]. Na construção da via de assimilação oxirredutiva de xilose em *S. cerevisiae*, os principais genes utilizados foram obtidos a partir de *Scheffersomyces stipitis* *XYL1* e *XYL2*, que codificam as enzimas XR e XDH, respectivamente[6]–[8].

A via de isomerização é encontrada principalmente em bactérias, também sendo presente em alguns fungos filamentosos. Esta via apresenta uma única etapa de conversão de xilose à xilulose, sendo catalisada pela enzima xilose isomerase. A XI apresenta dependência por cátions bivalentes, especialmente, Mn²⁺, Co²⁺ e Mg²⁺, variando de acordo com a origem da enzima[9]–[11]. Deste modo, a via isomerase não apresenta problemas relacionados ao balanço redox como os encontrados na via oxirredutiva[12]. No entanto, muitas vezes os genes da via XI não são funcionais quando expressos em *S. cerevisiae*[13]. Diversos genes *XylA* bacterianos que codificam XI foram expressos de forma heteróloga em *S. cerevisiae*, incluindo *XylA* de *Escherichia coli*, *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus subtilis*[14] e *Clostridium thermosulfurogenes*[15]. Todas as tentativas anteriores se mostraram ineficazes, até a identificação de XI dos fungos anaeróbicos *Piromyces sp.*[16] e *Orpinomyces sp.*[17] que apresentaram níveis elevados de expressão funcional em *S. cerevisiae*. Contudo, a maioria das XI quando expressas em levedura apresentam lenta taxa de isomerização da xilose em D-xilulose, levando a um baixo rendimento de etanol. Este problema geralmente é contornado através da inserção de múltiplas cópias de *XylA* no genoma de levedura, permitindo uma assimilação mais eficiente de xilose[11].

Além da integração de enzimas heterólogas que realizam a metabolização de xilose em xilulose, existem outras alterações genéticas adicionais relacionadas ao aprimoramento do metabolismo de xilose em *S. cerevisiae* que foram identificadas em diferentes estudos - através de evolução adaptativa laboratorial seguido de sequenciamento genômico ou por deleção e superexpressão de alvos gênicos. Dentre elas (i) deleção do gene *GRE3*[18], [19]; (ii) superexpressão do gene *XKS1*; (iii) superexpressão dos genes da via PPP não oxidativa: *RPE1*, *RKI1*, *TAL1* e *TKL1*[5],

[20]. A **Figura 3** apresenta um esquema completo da via de consumo de xilose pela via PPP em *S. cerevisiae*.

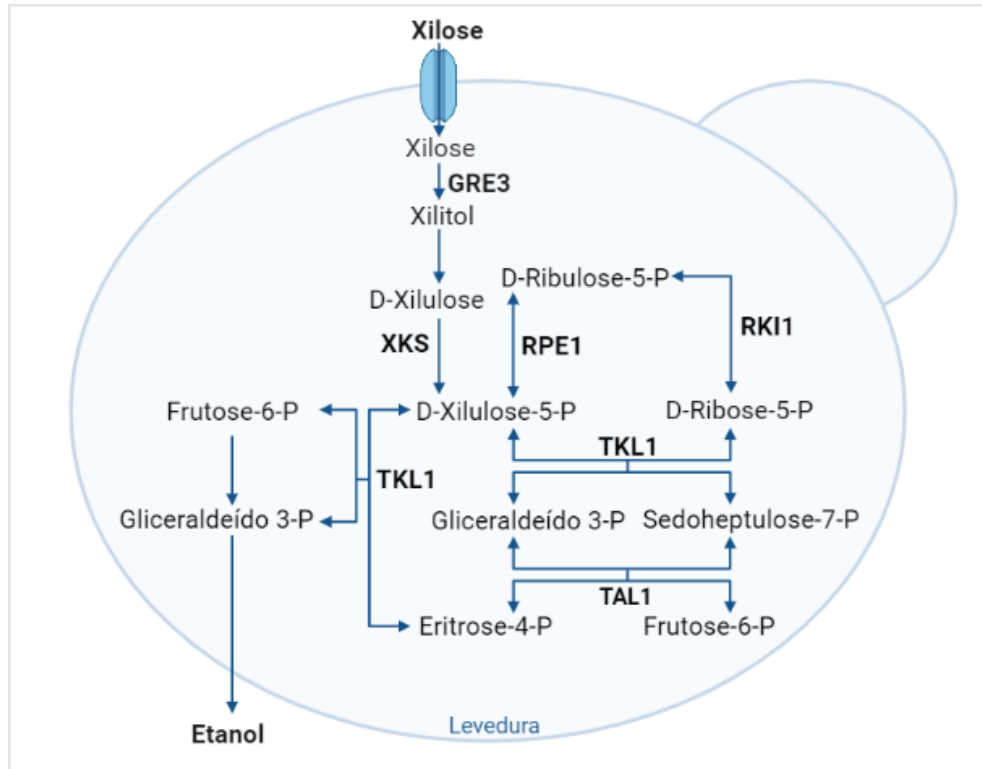


Figura 3. Visão geral das reações da via da pentose fosfato (PPP) não oxidativa em *Saccharomyces cerevisiae*. As enzimas são designadas em negrito com a nomenclatura em *S. cerevisiae*. As setas de uma ponta indicam reações fisiologicamente irreversíveis, as setas de duas pontas, reversíveis.

O gene endógeno *GRE3* codifica uma aldose redutase inespecífica dependente de NADPH capaz de reduzir xilose a xilitol em uma taxa lenta[18]. A expressão de tal enzima é responsável por um desvio no fluxo de metabolismo de xilose, levando ao acúmulo de xilitol em leveduras apresentando a via isomerase. Além disso, estudos apontam o xilitol como um potente inibidor da XI[21]. Essa inibição é atribuída ao fato do xilitol apresentar certa semelhança às formas lineares de xilose e glicose, logo, é um bom imitador dos açúcares lineares e apresenta uma alta afinidade para ligação no sítio ativo da XI[22]. Já em leveduras contendo a via oxirredutora, culmina na agravação do desequilíbrio redox devido ao aumento excessivo de xilitol no interior celular e o desvio no fluxo de carbono. Em ambos os casos, o resultado é uma fermentação ineficiente de xilose[18]. Nesse sentido, nas duas vias de assimilação, torna-se necessário a deleção de *GRE3*, para reduzir o acúmulo de xilitol e aumentar o rendimento de etanol[18].

No fluxo de metabólico da xilose, a xilulose é consumida de forma lenta através da XK endógena que apresenta baixos níveis de atividade, limitando a fermentação da pentose. Muitos estudos avaliaram a superexpressão endógena bem como exógena do gene *XKS1*, sugerindo que esta modificação genética é responsável por uma melhora considerável na fermentação da xilose[3], [23], [24], [25]. A primeira cepa de *S. cerevisiae* recombinante superexpressando o gene *XKS1*, apresentou um aumento na produção de etanol e redução na excreção de xilitol[3]. Contudo, estudos indicaram que o gene *XKS1* deve apresentar uma expressão moderada, considerado o *background* da linhagem e se a mesma apresenta outras alterações metabólicas[23], [24]. Neste sentido, afim de otimizar a expressão gênica de *XKS1*, podem ser utilizados diferentes promotores para um ajuste fino dos genes da via metabólica de interesse[25].

Os genes *RPE1*, *RKI1*, *TAL1* e *TKL1* de *S. cerevisiae* codificam as enzimas da via PPP não oxidativa: ribulose 5-fosfato epimerase (*RPE1*), ribose 5-fosfato isomerase (*RKI1*), transaldolase (*TAL1*) e transcetolase (*TKL1*), respectivamente. Em estudos de análise de gargalos do consumo de xilose, o nível de expressão das enzimas não oxidativas da PPP foi apontado como um fator impactante na taxa de utilização da xilose em leveduras fermentadoras[26], [27], indicando que a superexpressão desses genes é responsável por uma melhora expressiva na taxa de consumo de xilose e na produção de etanol em *S. cerevisiae* recombinante[5], [20].

Contudo, apesar da engenharia metabólica ser eficiente para viabilizar metabolismos específicos em microrganismos[16] e tais intervenções contribuïrem para o aumento das taxas de crescimento e assimilação de xilose em *S. cerevisiae*, é imprescindível o aprimoramento desse fenótipo para aplicações em escala industrial[28]. Essa necessidade, intensificou a busca por outras técnicas capazes de melhorar o metabolismo de microrganismos, sendo a engenharia evolutiva uma das abordagens utilizadas para aumentar a eficiência metabólica de fenótipos complexos. Diversos estudos foram realizados visando melhorar o fenótipo de consumo de xilose em *S. cerevisiae*. No entanto, a maneira mais eficiente foi a combinação de estratégias de engenharia metabólica e a evolução laboratorial em condições anaeróbicas, tornando possível obter linhagens de *S. cerevisiae* eficientes na produção de etanol a partir de xilose[4], [17], [19], [29]. O processo de engenharia evolutiva é conduzido na condição de interesse a fim aumentar o número de mutantes na população. Logo, o

cultivo celular com tal pressão seletiva levará ao acúmulo de várias adaptações e será favorecido o fenótipo desejado[30].

As variações genéticas mais comuns na evolução são: polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), inserção e deleção, duplicação de genes, rearranjo dos cromossomos, alteração da ploidia e hibridização interespecífica[31]. O SNP é uma alteração em uma única base de nucleotídeo em uma sequência de DNA, resultado de erros no reparo e replicação do material genético[31]. Mutações sinônimas (que não alteram a sequência de aminoácidos) podem afetar o dobramento e a função da proteína e, conseqüentemente, o processamento pós-transcricional e a regulação do RNA[32]. Por outro lado, se a alteração nucleotídica gera uma sequência polipeptídica diferente, são chamadas de mutações não sinônimas[33]. A mutação não sinônima pode levar à mutação *missense* ou *nonsense*: na mutação *missense* obtém-se um aminoácido diferente no polipeptídeo correspondente, enquanto na mutação *nonsense* aparece um códon de terminação, impedindo a síntese completa da proteína[34].

A partir da evolução adaptativa foi possível identificar diferentes perturbações genéticas e, através delas, surgiram novos alvos gênicos relacionados à metabolização eficiente da xilose em *S. cerevisiae* recombinante. Contudo, outras abordagens mais complexas, como as técnicas ômicas: genômica, transcriptômica, metabolômica e fluxômica, possibilitaram um enorme progresso na compreensão de fenótipos a nível molecular, através da identificação de alvos genéticos não óbvios responsáveis por contribuir com o aprimoramento desse fenótipo.

4.2 OBJETIVOS

4.3 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* para fermentação industrial de xilose. Para tal, deverá ser construída uma levedura recombinante híbrida de parentais industriais com *background* robusto para metabolização de xilose a partir da expressão de novas XI prospectadas *in silico* e reconfiguração do metabolismo endógeno da levedura.

4.3.1 Objetivos específicos

- i) Seleção de linhagens haploides industriais com fenótipo favorável para metabolização de xilose e robustez fermentativa, cruzamento e obtenção do híbrido;
- ii) Esporulação do híbrido e coleta dos segregantes para criação de uma biblioteca de haploides;
- iii) Fenotipagem *high-throughput* da biblioteca de haploides em HMF e xilose para seleção de segregante com fenótipo de interesse;
- iv) Modificações genéticas adicionais para melhora da metabolização de xilose no haploide selecionado;
- iv) Identificação e inserção de xiloses isomerases potencialmente funcionais prospectadas *in silico* no segregante selecionado;
- v) Avaliação do consumo de xilose pelas linhagens de *S. cerevisiae* construídas;
- vi) Engenharia evolutiva nas linhagens desenvolvidas para seleção de um fenótipo superior em consumo de xilose.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Cepas e plasmídeos

As cepas industriais de *S. cerevisiae* usadas neste trabalho foram selecionadas no banco de leveduras do Laboratório de Genômica e BioEnergia (LGE). As linhagens desenvolvidas e utilizadas neste estudo estão descritas na **Tabela 1**, assim como os plasmídeos usados. Algumas das cepas, foram obtidas em colaboração com a empresa BioInFood. *Escherichia coli* DH10 β foi utilizada para propagação e manutenção de vetores.

Tabela 1: Lista das cepas utilizadas neste estudo

Levedura	Genótipo/Característica Relevante	Referência
PE-2	Linhagem de levedura industrial PE-2; MATa/α	35
SA-1	Linhagem de levedura industrial SA-1; MATa/α	35
LVY27	PE-2, MATa; <i>CEN5::pTDH1-xylA-tTDH1</i> ; <i>gre3Δ</i> ; <i>CEN2::pADH1-XKS1-tADH1</i> ; <i>CEN8::pADH1-XKS1-tADH1</i> ; <i>CEN12::pTDH1-TAL1-tTDH1-pPGK1-RKI1-tPGK1</i> ; <i>CEN13::pTDH1-TKL1-tTDH1-pPGK1-RPE1-tPGK1</i>	29
FMY097	MATa; Resistência a aldeídos	36
BVY003	Cruzamento LVY27 x FMY097; MATa/MATa	Este estudo
BVY003.351	Segregante BVY003; MATa; <i>CEN12::pTDH1-TAL1-tTDH1-pPGK1-RKI1-tPGK1</i> ; <i>CEN13::pTDH1-TKL1-tTDH1-pPGK1-RPE1-tPGK1</i> ; Resistência a aldeídos	Este estudo
BVY005	BVY003.351; <i>gre3Δ</i>	Este estudo
BVY008	GGY018; <i>HO::pTEF1-XKS1-tCYC1</i>	Este estudo
BVY008+XIOrp	BVY008; <i>p426::pGPD1-xylAOrp-tCYC1</i>	Este estudo
BVY008-X5	BVY008; <i>Ty::GPD_X5_CYC</i>	Este estudo em colaboração
BVY008-X11	BVY008; <i>Ty::GPD_X11_CYC</i>	Este estudo em colaboração
GGY018	BVY005; <i>uraΔ</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+XIOrp	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylAOrp-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X1	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA1-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X2	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA2-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X3	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA3-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X4	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA4-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X5	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA5-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X6	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA6-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X7	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA7-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X8	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA8-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X9	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA9-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X10	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA10-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X11	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA11-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X12	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA12-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X13	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA13-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
GGY018+X14	GGY018; <i>p426::pGPD1-xylA14-tCYC1</i>	Este estudo em colaboração
Plasmídeo	Característica Relevante	Referência
pGS004_GRE3	pTEF1-Cas9-CYC1t; pSNR52-sgRNA-tSUP4	Coleção LGE
p425.TEF1_XKS1	pTEF1-XKS1-CYCt	Este estudo
p426.GPD1_XIOrp	p426::pGPD1-xylAOrp-CYC1t	Coleção LGE
pGS004.29	Cas9; sgRNA com homologia ao locus HO	Coleção LGE

4.4.2 Meios e condições de crescimento

O meio *Yeast extract – Peptone* (YP) (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona) suplementado com 20 g/L de D-glicose (YPD) foi utilizado como meio líquido ou em placas sólido (adicionando 20g/L ágar), para manutenção, extração de DNA genômico ou armazenamento de permanente (adicionando glicerol 25%). Meio YP com adição de 20 g/L de D-xilose (YPX) e meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (6,7 g/L yeast nitrogen base without aminoacids, Sigma-Aldrich contendo 500 mg/L *drop-out* sintético) e 20 g/L de D-glicose, foram utilizados na fenotipagem de segregantes em microplacas de 96 poços, sendo HMF 40 mM adicionado quando necessário. Meio YNB sólido (adicionando 20g/L ágar) contendo 20 mM de HMF foi utilizado no teste

spot. Os transformantes de leveduras com os plasmídeos foram plaqueados em meio YPD sólido, sendo adicionado 200 µg/mL de geneticina - G418 Gibco Geneticin™. Para transformações em leveduras com marca auxotrófica o meio YNB (glicose 2%) foi suplementado com *drop-out* sem adição de leucina ou uracila, sendo adicionado ágar (20g/L) quando necessário. Meios YNB contendo 20 g/L xilose e YNB com adição de 5 g/L glicose e 20 g/L xilose, suplementados com *drop-out sintético* sem adição de uracila foram utilizados na curva de crescimento e nas fermentações, respectivamente. Na evolução utilizou-se meio YP, contendo proporções variáveis de glicose (entre 10-15 g/L) e xilose (entre 15-20 g/L). As condições de cultivo foram a 30°C em incubadoras estáticas e em experimentos onde era necessário agitação, utilizou-se o agitador de incubação Multitron Infors HT® a 30°C variando a rotação entre 100-250 rpm de acordo com o experimento.

E. coli contendo os plasmídeos foram cultivadas em meio LB (10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extrato de levedura) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (LB-amp) como um meio líquido ou placas sólidas (adicionado 20 g/L de ágar). Culturas de *E. coli* em meio LB ocorreram a 37°C e 250 rpm em incubação Multitron Infors HT® para meio líquido ou 37°C em incubadoras estáticas para meio sólido.

4.4.3 Biologia molecular geral

4.4.3.1 Amplificações de DNA e digestões de DNA

As amplificações de DNA por Reação da Cadeira da Polimerase foram efetuadas com Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific®) seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, adicionou-se em cada reação 1X Phusion Buffer, 0,2 - 1 µM de primers, 200 µM dNTPs, 1U Phusion DNA Polimerase e 10-100 ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada no termociclador (Applied Biosystems® Veriti®), com o seguinte programa: 98°C durante 2m; 35X 98°C 10s; 50-58°C 30s / 72oC 30s Kb e 72°C 10m. As PCRs de colônias de bactérias, foram realizadas utilizando GoTaq Flexi® DNA Polymerase (Promega Corporation) de acordo com instruções do fabricante. Nas reações foram utilizados 1X Green GoTaq Flexi Buffer, 1mM MgCl₂, 0,2-0,4µM de cada primer, 200µM dNTPs e 1,25U DNA polimerase. Em cada reação, utilizou-se 5 µL células suspensas, apresentando OD de aproximadamente 0,5 no comprimento de onda de 600 nm. Aplicando o seguinte

programa no termociclador (Applied Biosystems® Veriti®): 95°C 10m; 35X 95°C 30s / 52-55°C 30s / 72°C 1m por Kb; 72°C 5m. Os primers foram sintetizados pela Exxtend Solução em Oligos Inc (**Tabela 2**)

Em relação as enzimas de restrição, as enzimas *BamHI*® (ThermoFisher Scientific) e *BsmBI* (*Esp3I*)® (ThermoFisher Scientific) foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante, sendo aplicados períodos de incubação de 15 minutos. A enzima *BglI*® (Promega Corporation) foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante, sendo aplicados períodos de incubação *overnight*.

Tabela 2: Primers utilizados no estudo.

Primer	Sequência 5'-3'	Descrição
BVO_001	AGCCACATGCGGAAGAAT	Verificar a deleção do <i>GRE3</i> (LVY27)
BVO_002	AAGCGTGGATGACACCAC	Verificar a deleção do <i>GRE3</i> (LVY27)
BVO_003	TGAGACGATTTAGAGTAAGGT	Verificar a integração do <i>XKS1</i> perto do CEN2 (LVY27)
BVO_004	AAGCTTTCTATTAGTCATTCTTC	Verificar a integração do <i>XKS1</i> perto do CEN2 (LVY27)
BVO_005	CTCAAGCCCAAATCTCTT	Verificar a integração do <i>XKS1</i> perto do CEN8 (LVY27)
BVO_006	TACTGAAAGCAATTTTGGC	Verificar a integração do <i>XKS1</i> perto do CEN8 (LVY27)
BVO_007	ATGTGCTCTCCTCTCCATTC	Verificar a integração do <i>TAL1</i> e <i>RKI1</i> perto do CEN12 (LVY27)
BVO_008	CGTTGATATTAGCATACACCAG	Verificar a integração do <i>TAL1</i> e <i>RKI1</i> perto do CEN12 (LVY27)
BVO_009	TGAGAAGTTCTGGCTACCT	Verificar a integração do <i>TKL1</i> e <i>RPE1</i> perto do CEN13 (LVY27)
BVO_010	TTGTATGTATGGGATGATAAC	Verificar a integração do <i>TKL1</i> e <i>RPE1</i> perto do CEN13 (LVY27)
BVO_015	ATGACTAAAGAATATTTTCCAAC	Verificar a integração de <i>xylA</i> de <i>Orpinomyces sp.</i> (LVY27)
BVO_016	TTATTGGTACATGGCAACA	Verificar a integração de <i>xylA</i> de <i>Orpinomyces sp.</i> (LVY27)
BVO_019	GTGCCCTTGGTGGTTGTTAT	Verificar a integração <i>XKS1</i> no locus HO (GGY018)
PBO_009	GCTATTTTATAAGATTCAGG	Verificar a integração <i>XKS1</i> no locus HO (GGY018)
BVO_035	TGTCTGTCTCTGAATTAAGCAACAACATCTTAGATTAGAT TGCTATGC	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
BVO_036	ATGTTGTGTTTCAGTAATTCAGAGACA	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
BVO_042	TCGAATTCCTGCAGCCCGGGgatccTTAGATGAGAGTCTTTT CC	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
BVO_043	CGACGGATTCTAGAAGTgagccCCACACACCATAGCTTC AA	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
FMO_014	CCTTCCTTTTCGGTTAGAGC	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
FMO_019	TCTCTACCTTACGGTTTGTGACGATCACGTTCCGCTGTCATT ATCAATACTCGCCATTTT	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
FMO_020	CTGGACCATCTCCATAATGAAGCCTTACATGTTTGGCACGG CAAATTAAGCCTTCGAGC	Montagem p425. <i>TEF1_XKS1</i>
CSO_060	ATTAAGGGAGCCCAAGGA	Verificar integração do stop códon no <i>GRE3</i>
CSO_061	TGGCACCGCAATCATTACTA	Verificar integração do stop códon no <i>GRE3</i>

4.4.3.2 Montagem e clonagem de vetores

A montagem de vetores foi realizada através do reparo de lacunas baseado em *S. cerevisiae* de acordo com o método de Ma et al., 1987[37]. Em resumo, os fragmentos de DNA foram amplificados com primers apropriados apresentando homologia com o fragmento subsequente. Utilizou-se quantidades equimolares dos produtos de PCR na transformação conforme especificado em 4.4.3.3. Após a seleção

dos transformantes, os plasmídeos foram recuperados por extração total de DNA e posteriormente transformados em *E. coli* - 4.4.3.3.

4.4.3.3 Abordagens de transformação

As transformações em leveduras foram realizadas segundo protocolo de transformação de acetato de lítio (LiAc)[38]. Os transformantes foram selecionados em placas ou tubos falcon contendo meio de cultura apropriado com adição de geneticina G418 ou meio de YNB (2% glicose) suplementado com *drop-out* sem adição de leucina ou uracila.

Transformações de células de *E. Coli* DH10 β foram realizadas de acordo com método padrão de choque térmico, utilizando 50 μ L de *E. coli* eletrocompetente sendo adicionados 1000 ng de DNA plasmidial, posteriormente eletroporados através de cubetas de eletroporação de 2 mm. A seleção dos transformantes foi realizada em placas sólidas contendo meio LB com adição de ampicilina.

4.4.3.4 Extração e confirmação de DNA

O DNA genômico de levedura foi extraído seguindo o protocolo método fenol-clorofórmio, sendo quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Os plasmídeos inseridos em *E. coli* foram extraídos usando o procedimento de lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979)[39]. A eletroforese em gel foi realizada em géis de agarose de 1% a 2%.

4.4.4 Acasalamento e análises de *mating type*

Para obtenção do diploide foi realizado o cruzamento entre os dois parentais haploides LVY27 (MAT α) e FMY097 (MATa). Em resumo, cerca de 6-8 colônias foram ressuspensas em 10 μ L de água destilada estéril e depositadas uma sobre a outra em uma placa contendo YPD sólido. Após secagem das células, as placas foram incubadas a 30°C *overnight*. Posteriormente, uma pequena alíquota das células foi estriada para obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram coletadas e transferidas para placas de 96 poços contendo YPD.

Análises de ploidia foram realizadas através de duas abordagens: protocolo de halo de *mating type* e PCR de DNA genômico utilizando primers específicos

(AGTCACATCAAGATCGTTTATGG MAT-R; GCACGGAATATGGGACTACTTCG MAT- α ; ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG MAT- A). A primeira abordagem através de análise de *mating type* foi realizada por plaqueamento, seguindo o protocolo estabelecido pelo Dunham Lab[40]. De forma resumida, consiste na diluição de aproximadamente 8 colônias de linhagens testers yMM421 (DBY7730, RC634a: MAT α ade2 his6 met1 ura1 can1 cyh1 rme sst1-3) e yMM422 (DBY7442, XT1-20A: MAT α leu- ura- ade- sst2) em 200 μ L de água destilada estéril e espalhadas em superfícies de placas de YPD sólido. As placas passaram por um período de incubação a 30°C por 1 hora para secagem. Após a incubação, com o auxílio de replicador de microplacas, os inóculos das colônias coletas com ploidia e/ou acasalamento desconhecido foram carimbados e levados à estufa a 30°C *overnight*. A avaliação da ploidia foi efetuada pela presença e ausência de halos. As colônias que apresentaram halos na placa contendo yMM421 foram considerados MAT α , as colônias apresentando halos na placa contendo yMM422 foram consideradas MAT α . Ausências de formação de halos em ambas as placas foram consideradas diploides.

4.4.5 Esporulação e coleta de segregantes

A esporulação foi realizada utilizando meio KAc 1% (1% de acetato de potássio suplementado com 10 μ g/mL de drop-out sintético) conforme Mello et al., (2019)[36]. Em resumo, as células diploides foram expostas a depleção de nutrientes essenciais afim de sofrer meiose, levando a formação de quatro esporos após as divisões celulares. Os esporos formados foram observados em microscópio óptico até a obtenção de taxa de 80% de tétrades, média de doze dias - confirmada por análise microscópica. Para o isolamento dos esporos foi utilizado um protocolo de preparação de esporos aleatórios de Treusch et al., 2015[41], com modificações e a coleta ocorreu manualmente de através de análise visual.

4.4.6 Teste *Spot* em 5-hidroximetilfurfural (HMF)

Testes do tipo *spot* foram realizados em placas contendo YNB com adição de HMF 20 mM. Resumidamente, os pré-inóculos foram quantificados em espectrofotômetro sendo o comprimento de onda da leitura em 600 nm. Após o processo de lavagem com água destilada estéril, as células foram diluídas em série, com fator de diluição 10, iniciando pela densidade óptica $OD^0 = 1$. Posteriormente, um

volume de 10µl de suspensão de células foram depositados sob a superfície das placas. As placas foram levadas à estufa a 30°C pelo período de 72 horas.

4.4.7 Fenotipagem *high-throughput* e seleção dos segregantes

O *screening* foi realizado a 30°C em estufa automatizada Cytomat (Thermo Scientific) acoplada a uma plataforma automática de pipetagem MicroLab Starlet (Hamilton) e leitora de placas Spectramax 384 Plus (Molecular Devices). Os meios utilizados foram: i) YNB + 40 mM HMF, ii) YPX, iii) YPX + 40 mM HMF. O cultivo foi realizado em microplacas de fundo plano de 96 poços seladas com um filme *MicroAmp*TM translúcido, utilizando 150 µL com inóculo de 15 µL. As leituras da densidade óptica a 600 nm foram realizadas em intervalos de 90 minutos variando o tempo entre 50-90 horas de acordo com o experimento. Análises de parâmetro cinético de crescimento, assim como gráficos de distribuição e crescimento, foram realizados utilizando o software OCHT[36].

4.4.8 Prospecção de novas XI

A busca por novas XI candidatas a serem funcionais em leveduras foi realizada pelo time de bioinformática do laboratório LGE através de buscas em bancos de dados biológicos públicos e uso de ferramentas de aprendizado de máquina. As XI foram prospectadas usando o Banco de dados de proteínas do NCBI (NR/NCBI) e Bancos de dados públicos de metagenomas e metatranscriptomas sequenciados de rúmen de mamíferos obtidos do repositório JGI Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IMG/M). As XI foram identificadas por BLASTp ou BLASTn (e-value de corte de 1e-10) usando como isca a proteína da XI funcional do fungo *Orpinomyces* sp. e as sequências resultantes foram analisadas em um algoritmo de aprendizado de máquina criado e implementado no software XIMMER2 (dados não publicados), desenvolvido no laboratório LGE. A síntese e otimização de códons foi realizado pela empresa Fastbio.

4.4.9 Crescimento aeróbico das XI

Pré-inóculos das XI e controles (negativo e positivo) foram cultivados aerobicamente em meio YNB com *drop-out* sem adição de URA (2% glicose) por 16 horas a 30°C. As células foram lavadas com água estéril e inoculadas em uma OD⁰

inicial de aproximadamente 1 em meio YNB com *drop-out* sem adição de URA (20 g/L xilose). Em seguida, culturas de 100 mL foram cultivadas erlenmeyer de 250 mL a 30 °C com agitação de 200 rpm. O experimento foi realizado em triplicata e o crescimento celular monitorado através da leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda 600 nm. Os valores quantificados, foram utilizados para obter as curvas de crescimento.

4.4.10 Fermentações

Os experimentos de fermentação anaeróbica em lote foram realizados a 30°C em frascos schott Duran® fechados (100 mL) contendo 80 mL de meio de fermentação (YNB líquido suplementado com drop-out sem adição de URA com adição de 5 g/L glicose e 20 g/L). As células dos pré-inóculos foram lavadas com água estéril e inoculadas em uma OD⁰ inicial de aproximadamente 1 no comprimento de onda 600 nm. A fermentação para avaliar o *XKS1* foi realizada a 30°C e 200 rpm e a avaliação das novas XI prospectadas a 30°C e 100 rpm. Os experimentos foram realizados em triplicata e amostras foram coletadas para análise conforme especificado no item 4.4.11.

4.4.11 Análise de composição de analito

As concentrações de glicose, xilose e etanol das amostras foram determinadas por *High performance liquid chromatography* (HPLC), utilizando uma coluna Bio-Rad® HPX-87H, sendo utilizado ácido sulfúrico 5 mM como a fase móvel e fluxo de 0,6 mL/min. Os componentes foram detectados por meio de detector de índice de refração, com temperatura controlada de 35°C.

4.4.12 Engenharia evolutiva

A evolução se iniciou com a lavagem das células dos pré-inóculos e inoculação com OD⁰ inicial de 0.5 sob o comprimento de onda 600 nm em frascos schott Duran® selados de 250 mL contendo 200 mL de meio YP (15 g/L glicose e 15 g/L xilose). O experimento ocorreu no agitador de incubação Multitron Infors HT® a 30°C e 200 rpm, periodicamente (3-7 dias) a suspensão de células foi transferida em culturas repetitivas nos frascos sob agitação. Amostras foram coletadas e analisadas conforme especificado no item 4.4.11.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Obtenção do diploide e confirmação do genótipo

Para a obtenção de uma robusta linhagem fermentadora de xilose e resistente aos estresses encontrados na produção de etanol lignocelulósico, foram avaliadas linhagens parentais que apresentassem as melhores características para o processo industrial: (i) ótimo desempenho em fermentações industriais e (ii) robustez frente aos estresses encontrados no processo fermentativo. Logo, foram selecionados os esporos haploides FMY097[36] e LVY27[29] derivados das linhagens industriais SA-1 e PE-2[35], respectivamente. SA-1 e PE-2 são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* diploides isoladas de usinas de etanol de cana-de-açúcar do Brasil, destaques na produção de etanol de primeira geração devido ao alto desempenho fermentativo e persistência prolongada no processo, sobrevivendo e dominando as dornas de fermentação mesmo em condições estressantes[35]. No geral, linhagens industriais apresentam o genoma altamente heterozigoto, tanto estruturalmente quanto a nível de nucleotídeos, logo, a capacidade de adaptação as condições de estresse em fermentação industrial estão associadas à sua arquitetura genômica heterogênea, justificando seu uso para compor uma plataforma de etanol de segunda geração[42].

O esporo haploide FMY097 foi obtido em um estudo de identificação de linhagens de *S. cerevisiae* altamente resistente a aldeídos, a partir do diploide FMY001 (derivado SA-1)[36]. Aldeídos furânicos, como HMF e furfural, são potentes inibidores de crescimento celular durante a etapa de pré-tratamento da biomassa da cana-de-açúcar[43]. Tais compostos danificam os microrganismos em sua estrutura celular, reduzem as atividades enzimáticas, além de causar rupturas no DNA e inibição da síntese de proteínas e RNA[43]. A linhagem FMY097 apresentou alta eficiência em fermentação e persistência prolongada no processo, além da capacidade de produzir biomassa na presença de concentrações de até 40 mM de furfural e 80 mM de HMF[36]. Além disso, mais recentemente foi demonstrado que esta cepa também apresenta termotolerância[44]. Logo, o fenótipo de resistência a aldeídos e a tolerância a altas temperaturas encontradas no haploide FMY097, se mostraram extremamente interessantes para compor um *background* robusto para produção de etanol lignocelulósico.

O outro haploide selecionado para formar a cepa híbrida foi a linhagem LVY27, modificada para consumo de xilose e proveniente da cepa PE-2 – apresentando alta tolerância ao etanol, baixo pH e alta temperatura[45], [46]. LVY27 possui modificações genéticas para permitir o consumo eficiente de xilose, sendo estas: inserção de duas cópias de *XKS1* próximas ao CEN2 e CEN8; cópia adicional de cada um dos genes que codificam as quatro enzimas não oxidativas da via PPP: *TAL1* e *RKI1* perto do CEN12 e, *TKL1* e *RPE1* integradas próximo ao CEN13[29]. Posteriormente, a linhagem passou pela exclusão do gene *GRE3*[29]. Estes alvos genéticos já foram elucidados e demonstraram melhorar a performance de fermentação de xilose em *S. cerevisiae*[5], [47]. A linhagem LVY27 também apresenta uma cópia da XI de *Orpinomyces sp.* permitindo o consumo de xilose a partir da via isomerase[29].

O diploide foi obtido pelo cruzamento dos parentais LVY27 (MAT α) e FMY097 (MATa). A confirmação da formação do diploide ocorreu visualmente por teste de halo de *mating type* (**Figura 4A e 4B**), onde a ausência de halos em ambas as placas indicou a diploidização da linhagem, sendo o híbrido selecionado nomeado BVY003.

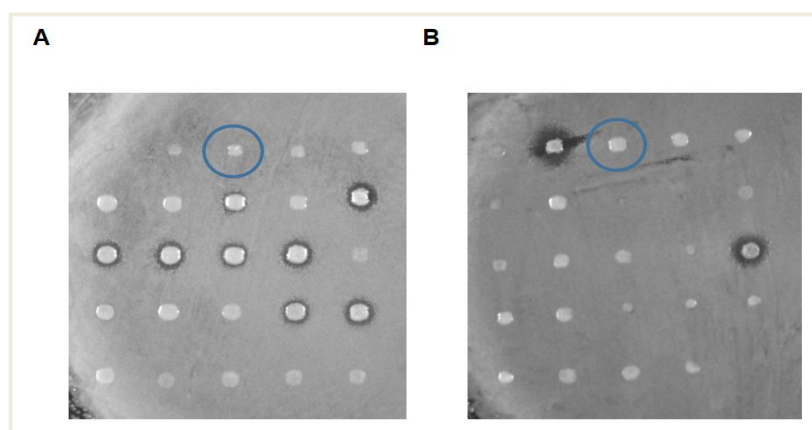


Figura 4. Identificação do tipo de acasalamento. **A.** Ensaio de halo usando células tester “a” **B.** Ensaio de halo usando células Tester “ α ”. Imagens após 24 horas de incubação a 30°C. O diploide selecionado como BVY003 (LVY27 / FMY097) está indicado em ambas as imagens.

Para confirmar o genótipo do diploide BVY003, realizaram-se PCRs com primers específicos (**Tabela 2**, Material e Métodos), sendo os parentais LVY27 e FMY097 utilizados como controle. Diferentes tamanhos de fragmentos foram obtidos no gel de agarose a partir de uma mesma reação de PCR, sendo atribuídos ao fato de que os primers utilizados nas amplificações são externos às regiões do genoma

onde estão integradas as modificações genéticas presentes em LVY27. Em vista disso, o diploide BVY003 apresentou ampliações de tais regiões com e sem a inserção dos cassetes de expressão, doadas por ambos os parentais. Sendo assim, foi possível confirmar a presença das modificações genéticas de LVY27 no diploide BVY003: i) deleção do *GRE3*; ii) superexpressão dos genes *TAL1* e *RKI1* (CEN12), *TKL1* e *RPE1* (CEN13); e, iii) cópias de *XKS1* (xilulose quinase): *XKS1* (CEN2) e *XKS1* (CEN8) e iv) *xylA* de *Orpinomyces sp.* (CEN5); assim como a presença dessas mesmas regiões sem alterações genéticas, provenientes do parental FMY097 (**Figura 5**).

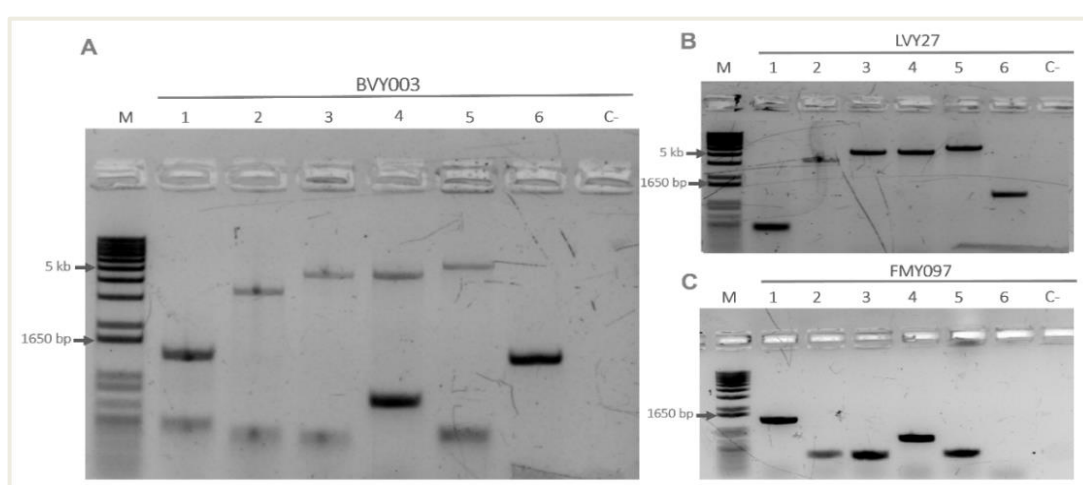


Figura 5. Géis de agarose mostrando os resultados obtidos por PCR de DNA genômico de leveduras. Cada reação de PCR foi realizada com primers externos para as mesmas regiões do genoma de *S. cerevisiae* nas linhagens. **A.** BVY003 (diploide LVY27/FMY097) **B.** LVY27 (haploide parental de BVY003), apresentando produtos de PCR com cassetes de expressão nas regiões do genoma **C.** FMY097 (haploide parental FMY097), apresentando produtos de PCR sem cassetes de expressão nas regiões do genoma. 1) *GRE3*; 2) CEN2 contendo cassete do *XKS1*; 3) CEN8 cassete do *XKS1*; 4) CEN12 cassetes do *TAL1* e *RKI1*; 5) CEN13 cassetes do *TKL1* e *RPE1* e 6) *xylA* de *Orpinomyces sp.* integrado próximo ao CEN5; (M) Marcador Molecular 1 Kb; (C-) reação de controle sem DNA.

O híbrido BVY003 (FMY097/LVY27) juntamente aos parentais haploides (FMY097 e LVY27) e os diploides *wild-type* (WT) (PE-2 e SA-1) foram fenotipados na presença de 20 mM HMF, a fim de confirmar a resistência ao aldeído do parental FMY097 (derivado SA-1) e avaliar se tal característica foi transferida para o diploide. A concentração de HMF utilizada foi descrita anteriormente como limiar para distinção dos fenótipos de resistência e suscetibilidade de cepas ao aldeído[44], e por isso utilizada aqui. A **Figura 6** apresenta o Test Spot.

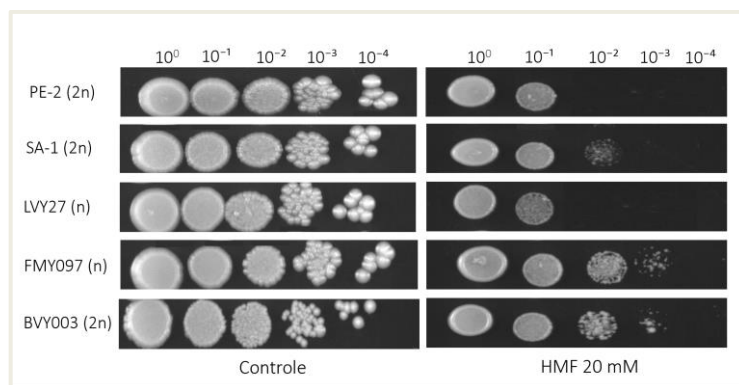


Figura 6. Teste *Spot* em 5-hidroxiacetilfurfural (HMF). Linhagens PE-2, SA-1, LVY27, FMY097, BVY003 (LVY27/FMY097) em YNB como controle (esquerda) e em 20 mM de HMF (direita). A imagem mostra 5 diluições (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) após 72 horas de crescimento à 30°C .

O haploide FMY097 (derivado SA-1) e o híbrido BVY003 demonstraram os melhores fenotipos de resistência à HMF, apresentando crescimento mesmo em diluições celulares de 10^{-3} , sendo estes superiores inclusive ao diploide natural SA-1. Este ensaio permitiu a confirmação do fenotipo superior do haploide FMY097 e que a resistência deste parental havia sido herdada pelo diploide BVY003, confirmando que essa característica é dominante. Os resultados obtidos corroboraram com a descrição realizada anteriormente por de Mello *et al.* (2019)[36], que indicou a linhagem FMY097 como altamente resistente a aldeídos e a apontou como um bom *background* para aplicação na produção de etanol de segunda geração.

No entanto, após a confirmação do genótipo e fenótipo do diploide BVY003, gerando um híbrido com resistência a HMF de FMY097 e apresentando modificações genéticas para consumo de xilose do parental LVY27, foram analisadas questões pontuais sobre a ploidia da linhagem: (i) complexidade na manipulação genética e, (ii) velocidade no processo de evolução adaptativa.

Embora cepas industriais diploides apresentem robustez e tolerância aos estresses presentes no processo fermentativo, na maioria das vezes essas linhagens foram adaptadas a ambientes específicos devido à pressão evolutiva. Logo, tais linhagens industriais são geneticamente mais complexas e por consequência menos passíveis de manipulação genética do que cepas haploides laboratoriais[48], o que provavelmente poderia dificultar posteriores edições genéticas no híbrido obtido.

Além disso, estudos sugeriram que populações de leveduras diploides apresentam uma adaptação mais lenta do que as populações de leveduras haploides[49]. Outro fator importante, é que em linhagens haploides possuindo apenas um único conjunto de cromossomos, ao surgirem novas mutações adaptativas

é possível visualizá-las imediatamente no processo de evolução, sendo a seleção mais eficiente[50]. Por outro lado, há trabalhos sugerindo que em evoluções adaptativas aplicadas a populações diploides, podem surgir uma classe distinta de mutações que proporcionam uma vantagem seletiva em diferentes condições[51].

Apesar das controvérsias sobre a melhor ploidia para abordagens evolutivas e ponderando que modificações genéticas subsequentes poderiam ser dificultadas ou inviabilizadas com a utilização de uma cepa diploide, definiu-se que a melhor estratégia seria a obtenção de um segregante haploide a partir da linhagem BVY003 para prosseguir com a construção da cepa final. Ademais, a utilização de um haploide abriria a possibilidade de posteriormente ser realizado um novo acasalamento, para incorporar outros fenótipos de interesse, melhorando ainda mais a robustez da linhagem.

Neste contexto, para a obtenção de um haploide superior a partir do híbrido BVY003, foi realizado um processo de esporulação segundo o método descrito por de Mello *et al.*, 2019[36]. No isolamento dos esporos utilizou-se um protocolo de preparação de esporos aleatórios de Treusch *et al.*, 2015[41] com modificações. Após duas rodadas de coleta de segregantes, construiu-se uma biblioteca com 545 segregantes da linhagem BVY003. No entanto, somente 314 segregantes foram confirmados como haploides, sendo 264 MAT α e 50 MAT α , indicando uma taxa de eficiência de 57,51% na obtenção de segregantes haploides. O baixo número de haploides obtidos pode estar relacionado com o fato de, apesar de linhagens industriais esporularem muito bem, geralmente não são produzidos apenas ascos contendo quatro esporos, apresentando uma frequência alta de ascos com dois e três esporos[52].

4.5.2 Seleção do haploide

4.5.2.1 Fenotipagem *high throughput* de segregantes BVY003

A primeira etapa de seleção do haploide baseou-se em uma abordagem de fenotipagem *high throughput* utilizando testes de crescimento para triagem de segregantes haploides com maior tolerância ao estresse oxidativo induzido por altas concentrações de HMF e melhor consumo de xilose a fim de identificar segregantes apresentando o maior número de modificações genéticas herdadas do parental LVY27. Para tanto, dois ensaios foram realizados, aplicando diferentes condições de

cultivo na presença de xilose e HMF, sendo o rendimento final de biomassa o parâmetro utilizado para identificação dos melhores haploides em ambas as condições.

No ensaio inicial, 257 haploides de BVY003, selecionados aleatoriamente na biblioteca construída a partir do híbrido BVY003, tiveram o crescimento analisado na presença das condições estabelecidas separadamente: (i) xilose (YPDX 2% xilose) e (ii) HMF (YNB 2% glicose + HMF 40 mM). Os dados de densidade óptica obtidos para as 257 microculturas testadas foram processados usando o software OCHT[36], sendo obtidas curvas de crescimento dos segregantes e o histograma de distribuição do rendimento de biomassa final (peso seco celular - CDW, g.L^{-1}), dados apresentados na **Figura 7**.

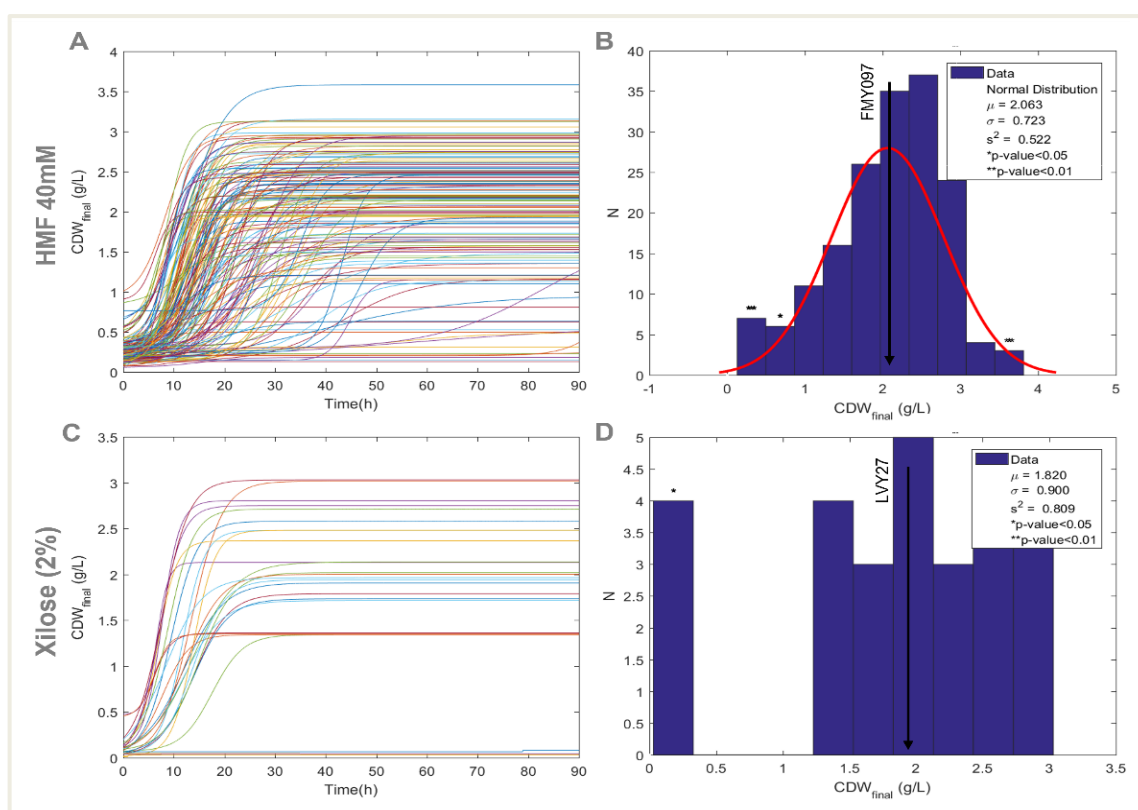


Figura 7. Análise fenotípica de haploides e parentais. **A.** Curvas de crescimento de 170 haploides de BVY003 em HMF 40 mM. **B.** Histograma dos valores finais de CDW (g.L^{-1}) dos 170 haploides em HMF 40 mM. Seta preta indicando a produção final de CDW da cepa FMY097 (2.00 g.L^{-1}); **C.** Curvas de crescimento dos 28 haploides de BVY003 em YPX 2% de xilose. **D.** Histograma dos valores finais de CDW (g.L^{-1}) dos 28 haploides em YPX 2% xilose. Seta preta indicando a produção final de CDW da cepa LUY27 (1,791 g.L^{-1}). Gráficos gerados pelo software OCHT.

Analisando o histograma dos valores obtidos para o CDW em 40 mM de HMF observamos uma distribuição fenotípica que se aproxima de uma função normal típica de características quantitativas[53], com valores variando de 0,18 g.L^{-1} a 3,81

g.L⁻¹ (**Figuras 7A e 7B**). Entre os 257 haploides analisados, 170 haploides apresentaram crescimento em HMF, dentre eles 133 produziram biomassa igual ou superior a 2,00 g.L⁻¹ na condição analisada, o que é fenotipicamente próximo ao parental FMY097. Fenótipos quantitativos, como tolerância a aldeídos, apresentam uma variação na proporção do fenótipo na população, ocasionado pela recombinação e segregação no processo de esporulação[54]. Neste caso, podendo ser gerado mais ou menos efeito de resistência a aldeídos. No estudo de mapeamento de *QTLs* realizado para identificar os genes que contribuem para a resistência a aldeídos na linhagem FMY097, foi indicado que esse fenótipo é resultado do intercâmbio de vários alelos, ao contrário de outras características fenotípicas que apresentam um gene causador principal para um determinado fenótipo em levedura[44].

Já o histograma de CDW dos segregantes crescendo em meio contendo xilose não se observou o mesmo padrão, pois o consumo de xilose está relacionado predominantemente a apenas um alelo - *xyIA*, responsável por permitir a assimilação de xilose (**Figuras 7C e 7D**). Nesse ensaio, somente 28 apresentaram crescimento em xilose, sendo que 19 haploides apresentaram biomassa próxima ou superior 1,791 g.L⁻¹, valor obtido pelo parental LVY27, que apresenta uma *xyIA* funcional de *Orpinomyces sp.* e outras modificações metabólicas para consumo de xilose.

Para identificar os melhores haploides em ambas as condições testadas (HMF e xilose), comparou-se os rendimentos finais de biomassa obtidos em ambos os experimentos - 133 haploides no ensaio em HMF e 19 identificados em xilose. A partir da análise desses dados, foi obtida uma intersecção dos resultados, representada por um diagrama de Venn apresentado na **Figura 8**, sugerindo-se que 11 candidatos apresentaram rendimento de biomassa superior em ambas as condições avaliadas.

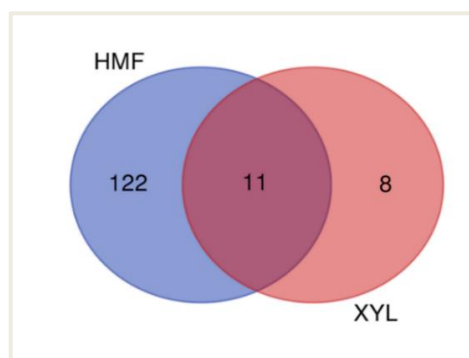


Figura 8. Diagrama de Venn mostrando sobreposições dos resultados de análises fenotípicas de haploides de BVY003. Na cor azul o número de candidatos selecionados em HMF 40 mM e em laranja os candidatos selecionados em YPX 2% xilose.

Os 11 candidatos passaram por um novo ensaio de fenotipagem para avaliar o rendimento final de biomassa em ambas as condições simultaneamente: xilose e HMF (YPX 2% xilose + HMF 40 mM). Logo, seria possível confirmar quais os haploides apresentaram um fenótipo de resistência a aldeídos superior e melhor consumo de xilose, afunilando ainda mais a seleção. O valor próximo ou superior à $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ foi definido como limiar de produção final de biomassa, considerando que a combinação de xilose e HMF é muito mais estressante. Definimos o parental LVY27 como controle, por possuir uma *xyIA* funcional de *Orpinomyces sp.*[29], logo, os haploides que apresentassem o crescimento próximo ou acima de seu rendimento de biomassa possivelmente teriam herdado um maior número de modificações genéticas de consumo de xilose durante o processo de segregação. Após as análises de rendimento final de biomassa, considerando o parâmetro estabelecido, foram selecionados 6 candidatos haploides: BVY003.326 ($1,76 \text{ g.L}^{-1}$), BVY003.366 ($1,67 \text{ g.L}^{-1}$), BVY003.286 ($1,79 \text{ g.L}^{-1}$), BVY003.374 ($1,53 \text{ g.L}^{-1}$), BVY003.351 ($1,42 \text{ g.L}^{-1}$), BVY003.350 ($1,07 \text{ g.L}^{-1}$) (**Figura 9**). O rendimento final de biomassa do parental LVY27 foi de $1,34 \text{ g.L}^{-1}$.

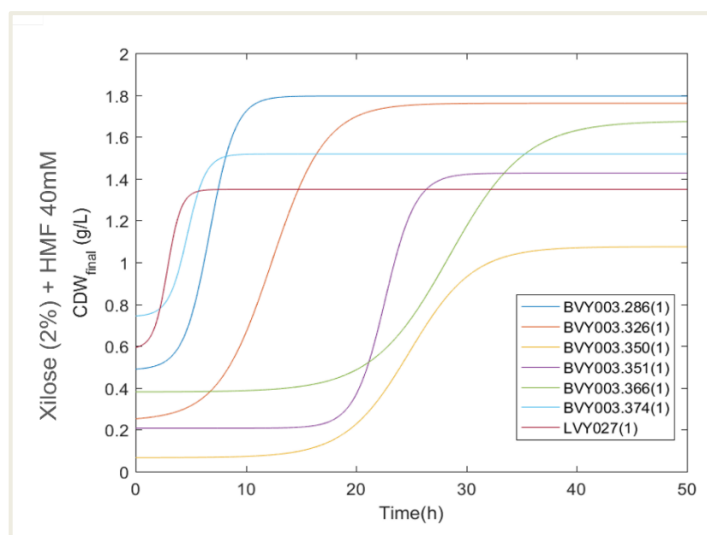


Figura 9. Análise fenotípica de haploides BVY003 (LVY27xFMY097). Curva de crescimento de haploides BVY003.286, BVY003.326, BVY003.350, BVY003.351, BVY003.366, BVY003.374 e parental LVY27 em YPX + HMF 40 mM.

4.5.2.2 Genotipagem de segregantes BVY003

Apesar da abordagem de fenotipagem *high throughput* ter contribuído significativamente para o afunilamento do número de candidatos haploides obtidos a partir da linhagem BVY003, uma etapa de genotipagem se mostrou necessária para

o rastreio e confirmação das modificações genéticas de consumo de xilose presentes em LVY27: deleção do *GRE3*, cópias de superexpressão do *XKS1* (CEN2 e CEN8), superexpressão dos genes *TAL1* e *RKI1* (CEN12) e *TKL1* e *RPE1* (CEN13). Após a análise por PCR, foi verificado que nenhum dos haploides apresentou todas as ampliações de fragmentos referentes aos genes de consumo de xilose do parental LVY27. Sendo assim, decidiu-se por selecionar o haploide que possuísse o maior número de modificações genéticas e utilizá-lo para novas abordagens de engenharia genética para desenvolver uma cepa robusta para produção de etanol 2G.

4.5.2.3 Caracterização do haploide selecionado

A abordagem de rastreio por genotipagem permitiu confirmar que o haploide BVY003.351 possui o maior número de modificações genéticas de consumo de xilose: superexpressão dos genes da PPP: *TAL1* e *RKI1*; *TKL1* e *RKE1* – apresentado na **Figura 10**. O haploide BVY003.351 não amplificou para o gene *xyIA* de *Orpinomyces sp.* sugerindo que seu *background* robusto pode ter contribuído para sua seleção através do consumo de xilose basal. No entanto, como a linhagem apresentou amplificação para o gene *GRE3*, responsável por codificar uma aldose redutase capaz de reduzir a xilose a xilitol, outra hipótese é que sua seleção possa ser atribuída ao consumo de xilose através dessa via alternativa.

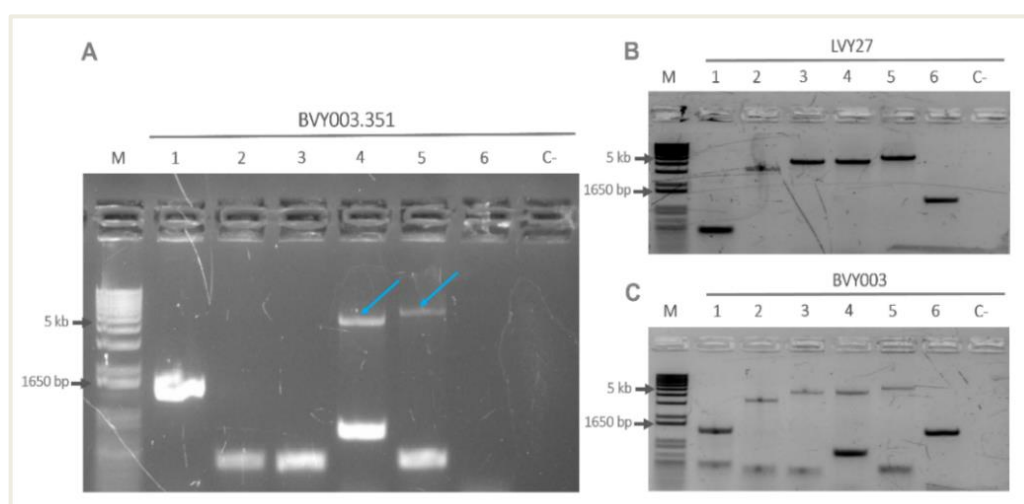


Figura 10. Géis de agarose mostrando os resultados obtidos por PCR de DNA genômico de leveduras. Cada reação de PCR foi realizada com primers externos para as mesmas regiões do genoma de *S. cerevisiae* nas linhagens. **A.** BVY003.351 (esporo haploide BVY003) - Setas em azul indicando os cassetes na linhagem; **B.** LVY27 (haploide parental de BVY003) e **C.** BVY003 (diploide LVY27/FMY097), apresentando produtos de PCR com e sem cassetes de expressão nas regiões do genoma. 1) *GRE3*; 2) CEN2 contendo cassete do *XKS1*; 3) CEN8 cassete do *XKS1*; 4) CEN12 cassetes do *TAL1* e *RKI1*; 5) CEN13 cassetes do *TKL1* e *RPE1* e 6) *xyIA* de *Orpinomyces sp.* integrado próximo ao CEN5; (M) Marcador Molecular 1 Kb; (C-) reação de controle sem DNA.

4.5.2.4 Fenotipagem do haploide BVY003.351

A fim de avaliar a resistência a HMF do segregante BVY003.351, foi realizado uma nova fenotipagem em 20 mM de HMF, juntamente aos parentais haploides LVY27 e FMY097 e o diploide BVY003 (FMY097/LVY27). O teste permitiu confirmar que o haploide selecionado possui a resistência a aldeído próxima a apresentada por FMY097 e pelo híbrido BVY003 (**Figura 11**).

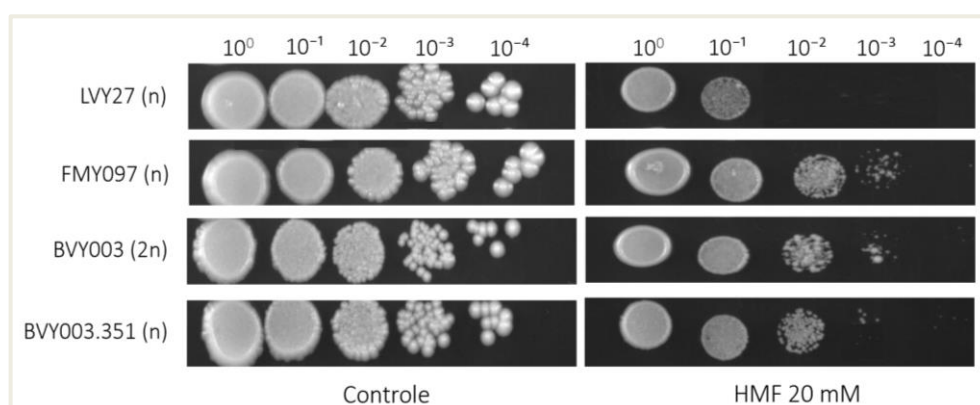


Figura 11. Teste Spot em 5-hidroximetilfurfural (HMF). Linhagens LVY27, FMY097, BVY003 (LVY27/FMY097) em YNB como controle e em 20 mM de HMF. A imagem mostra 5 diluições (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) após 72 horas de crescimento à 30°C.

A robustez ideal para processos fermentativos em larga escala é encontrada naturalmente em leveduras industriais de *S. cerevisiae*. Logo, a partir da esporulação de um híbrido derivado de cepas industriais foi possível obter um esporo haploide com resistência a aldeídos e modificações metabólicas para consumo de xilose, proporcionando um “chassi” interessante para as etapas subsequentes.

No desenvolvimento de linhagens para produção de etanol 2G o primeiro passo lógico é a seleção de um *background* robusto como plataforma. Contudo, para tornar viável a utilização de tal linhagem, se fez necessário novas modificações no metabolismo da levedura, a fim de permitir o consumo de xilose somado a um ajuste fino, através de deleções[55] e superexpressões[20], [56] de genes específicos relacionados a via de interesse. Logo, optamos por abrir duas frentes no projeto em paralelo: (i) construção de *background* robusto para metabolizar xilose (**Seção 4.5.3**) e (ii) identificação de novas XI funcionais (**Seção 4.5.4**).

4.5.3 Construção de *background* robusto para metabolizar xilose

Na construção de uma plataforma robusta, utilizou-se como base o haploide BVY003.351, derivado do diploide BVY003 (FMY097/LVY27), que possui a superexpressão dos genes *TAL1*, *RKI1*, *TKL1* e *RPE1* e, resistência a aldeídos, selecionado nos ensaios anteriores. A linhagem foi alvo de novas alterações genéticas para a melhora do fenótipo de consumo xilose através de abordagens de engenharia genética, sendo elas: (i) deleção do gene *GRE3* (**Seção 4.5.3.1**) e (ii) superexpressão do *XKS1* (**Seção 4.5.3.2**).

4.5.3.1 Deleção do gene *GRE3*

O gene *GRE3* codifica uma aldose redutase não específica que funciona como uma XR dependente de NADPH em *S. cerevisiae* capaz de converter xilose em xilitol, composto que será acumulado no interior celular levando a um desvio no fluxo de carbono. Portanto, sua deleção torna-se importante para reduzir o acúmulo de xilitol e evitar o desvio de carbono para produção de etanol[18]. Além disso, a maioria das xilose isomerases heterólogas expressas em cepas de *S. cerevisiae* se mostraram sensíveis à presença de xilitol, indicando este metabólito como um potente inibidor, sendo sugerido que sua exclusão é importante para uma produção de etanol eficiente pela via isomerase[22].

Para tanto, a deleção do *GRE3* na linhagem BVY003.351 foi realizada em um evento de edição por CRISPR-Cas9, utilizando o plasmídeo pGS004_*GRE3* da coleção LGE. A estratégia usada consistiu em um plasmídeo de sistema único, apresentando o arcabouço de sgRNA - contendo seus elementos reguladores; a ScCas9 – uma versão da enzima Cas9 otimizada para *S. cerevisiae* e os elementos necessários para sua expressão; o gene *KanR* para seleção de transformantes em genética; e um DNA doador integrado. O DNA doador de 90 bp apresenta um códon de parada e alteração da região PAM original (desativando a edição subsequente). Além disso, o DNA doador possui um sítio de restrição para a enzima de restrição BglII, permitindo a confirmação da edição através de uma PCR seguido de digestão do fragmento.

Na transformação foram obtidas apenas 2 colônias, estas tiveram o DNA extraído e foram analisadas por PCR seguido de digestão enzimática para confirmar a interrupção do gene. Amplificou-se o gene *GRE3* nos transformantes e a linhagem não transformada foi utilizada como controle, sendo observada a presença das

bandas através do gel de agarose dos dois transformantes (**Figura 12A**). Posteriormente, foi realizada a digestão enzimática do fragmento amplificado usando a enzima *BglI*, sendo formados dois fragmentos no gel de agarose (**Figura 12B**). Apesar do número reduzido de colônias transformadas, foi apresentado 100% de eficiência na edição. Sendo assim, confirmou-se a interrupção do gene *GRE3* em ambas as colônias transformadas. A baixa taxa de transformantes obtidos pode ser atribuída a diversos fatores como: método de transformação, baixa eficiência de edição do plasmídeo ou mesmo a particularidades da própria linhagem editada[48]. A colônia 2 foi selecionada e nomeada de BVY005 (BVY003.351*gre3Δ*).

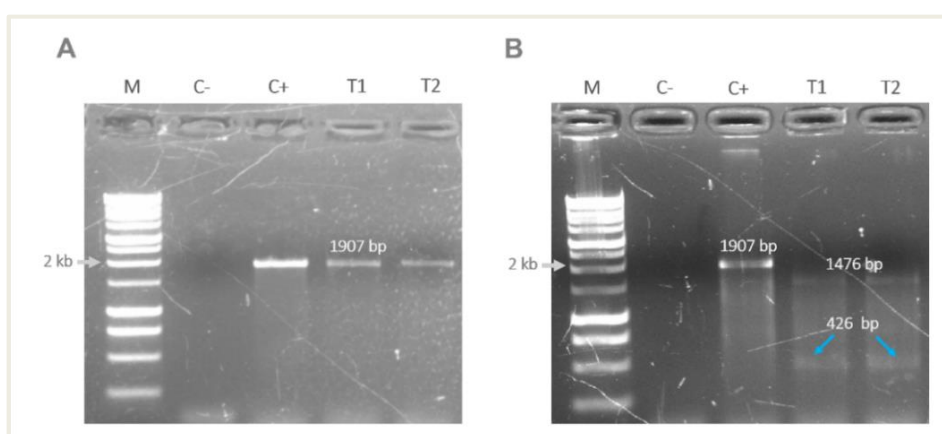


Figura 12. Géis de agarose mostrando a confirmação da deleção do *GRE3* no haploide BVY003.351. **A.** Amplificações de PCR mostrando fragmentos do *GRE3* na cepa BVY003.351: C+ (não transformada - controle positivo), T1 (transformante 1) e T2 (transformante 2). **B.** Fragmentos de amplificação após a digestão do sítio de restrição a enzima *BglI*. C+ (não transformada - controle positivo), T1 (transformante 1) e T2 (transformante 2). Em ambos (M) Marcador Molecular 1 Kb; (C-) reação de controle sem DNA. Setas em azul indicando os fragmentos digeridos no transformante 1 e transformante 2.

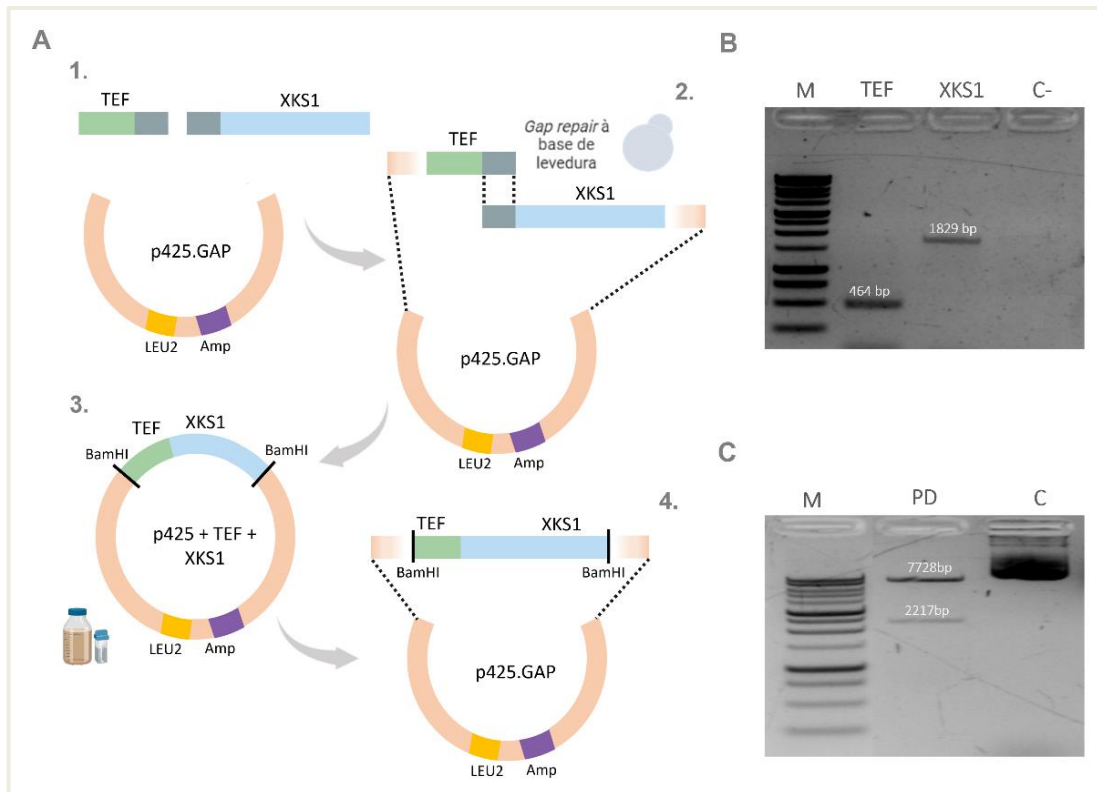
4.5.3.2 Superexpressão do gene *XKS1*

A xilulose, produto da isomerização da xilose, é lentamente convertida por uma XK endógena, tornando o gene *XKS1* um dos principais alvos de superexpressão para melhora no rendimento de etanol. Além disso, XK está presente em ambas as vias de assimilação da xilose, sendo responsável pela fosforilação da xilulose em xilulose-5-fosfato, que posteriormente é metabolizada pela via PPP[3], [57].

A fim de aumentar a fluidez do fluxo metabólico da via de consumo de xilose e, considerando a localização da enzima nessa via, bem como as modificações genéticas já presentes na linhagem desenvolvida, levantando a hipótese que o aumento da expressão do gene *XKS1* poderia ter um efeito benéfico para a melhora

do consumo de xilose na linhagem BVY005 (BVY003.351*gre3*Δ). Anteriormente, a otimização da expressão gênica de *XKS1* através promotores específicos se mostrou uma estratégia interessante para o ajuste fino desse gene[25]. Neste contexto, iniciou-se a busca por possíveis promotores para constituir um cassete de expressão de *XKS1* a ser integrado no genoma da cepa BVY005 (BVY003.351*gre3*Δ). Após a análise de dados de transcriptoma de fermentação industrial de segunda geração usando *S. cerevisiae* (dados internos não publicados), foi possível notar que *TEF1* está mais expresso durante o consumo de xilose que outros genes cujos promotores são geralmente utilizados para construção de cassetes de superexpressão – *ADH1*, *GAP1*, *TDH1* e *PGK1*. Paralelamente, encontramos trabalhos desenvolvidos utilizando o promotor *TEF1* superexpressando o gene *XKS1*, que mostraram resultados positivos nessa combinação para a obtenção de linhagem produtora de etanol[58].

Dessa forma, para superexpressão do gene *XKS1*, foi projetado um plasmídeo contendo o gene sob a expressão do promotor *TEF1p*. Resumidamente, o vetor p425-GAP linearizado através de digestão do sítio de restrição da enzima *BamHI* presente no plasmídeo, misturado aos fragmentos de *TEF1* e *XKS1* amplificados por PCR no genoma de *S. cerevisiae*, foram transformados em uma levedura sem o gene *Leu2* funcional. Posteriormente, o plasmídeo construído na levedura foi recuperado através de *E. coli* DH5α [37]. Confirmou-se a montagem do plasmídeo através de PCR de colônia de bactéria e pela digestão dos sítios de restrição presentes no plasmídeo. Esquema simplificado das etapas de montagem (**Figura 13A**) e fragmentos de DNA do *TEF1* e *XKS1* (**Figura 13B**). Esse processo levou à formação do plasmídeo p425.*TEF1_XKS1* (**Figura 13C**).



13. Montagem e confirmação do plasmídeo p425.*TEF1_XKS1*. **A** Esquema simplificado das etapas de montagem do plasmídeo p425.*TEF1_XKS1*. 1. Os fragmentos do *TEF1* e *XKS1* amplificados de *S. cerevisiae* com homologia flanqueadora ao vetor p425.*GAP* linearizado através da digestão do sítio de restrição da enzima *Bam*HI. 2. Os fragmentos amplificados e o vetor linearizado foram transformados por reparo de lacuna em *S. cerevisiae*. 3. O plasmídeo montado foi inserido em *Escherichia coli* para propagação. 4. Digestão dos sítios de restrição da enzima *Bam*HI para confirmar a inserção dos fragmentos no plasmídeo p425.*GAP*. **B** Gel apresentando os fragmentos de DNA de *TEF1* e *XKS1* amplificados de *S. cerevisiae*. **C** Digestão dos fragmentos inseridos no plasmídeo p425.*GAP*. PD (plasmídeo digerido); C (controle – plasmídeo não digerido); M (Marcador molecular), C- (controle negativo).

Após uma laboriosa etapa de transformações para inserção do cassete de superexpressão do *XKS1* sem sucesso na linhagem BVY005 (BVY003.351*gre3Δ*), em paralelo prosseguiu-se a transformação da linhagem GGY018 (BVY005*ura3Δ*) (informações adicionais sobre a cepa GGY018 se encontram na Seção 5.4.2), que apresenta o mesmo *background* da BVY005 (BVY003.351*greE3Δ*), porém com auxotrofia para uracila. Após algumas rodadas de transformação, o cassete foi inserido com êxito na cepa GGY018 (BVY005*ura3Δ*). Curiosamente, aplicou-se a mesma abordagem em ambos os eventos de transformação, uma estratégia de co-transformação, através de um sistema de plasmídeo combinado ao DNA doador. O plasmídeo pGS004.29 da coleção LGE, que possui o gene *Cas9* e o sgRNA com homologia ao locus *HO*, foi co-transformado com o DNA doador amplificado do plasmídeo p425.*TEF1_XKS1* com homologia de aproximadamente 40 bp (**Figura 14A**), segundo protocolo de transformação de acetato de lítio (LiAc)[38]. Os

transformantes foram selecionados em G418 e confirmação se deu através de extração de DNA genômico seguido de PCR – apresentado na **Figura 14B**. Foram obtidas duas colônias transformadas, selecionando-se a colônia 2 e a renomeando de BY0008 (GGY018 + HO::*TEF1_XKS1*). Não foram encontradas informações na literatura que associem limitações na edição de DNA em leveduras *URA3* positivas.

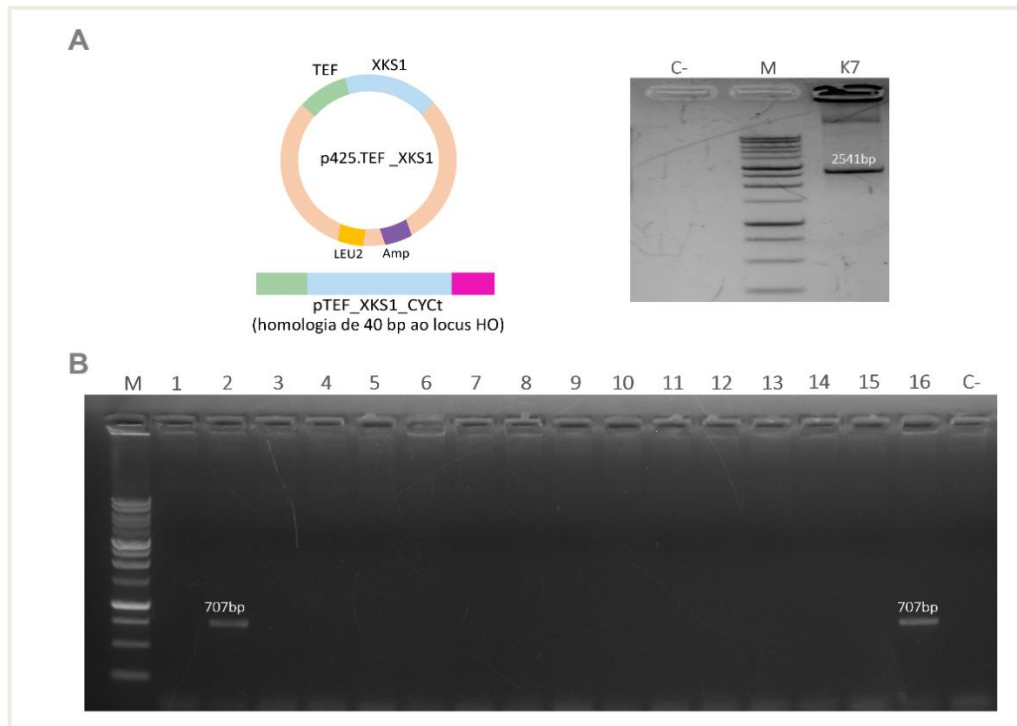


Figura 14. Inserção do cassete *pTEF1_XKS1_CYCt* amplificado do plasmídeo *p425.TEF1_XKS1* na linhagem GGY018. **A** Imagem ilustrando o cassete *pTEF1_XKS1_CYCt* e gel de agarose mostrando a amplificação do K7 (*pTEF1_XKS1_CYCt*). **B** Gel de agarose confirmando 2 transformantes com inserção do cassete *pTEF1_XKS1_CYCt* no locus *HO* na linhagem GGY018. Em ambas as figuras: (M) Marcador molecular, C- (controle negativo)

A fim de validar se o cassete *pTEF1_XKS1_CYCt* contribuiria para a melhora do consumo de xilose na linhagem BVY008 (GGY018 + HO::*TEF1_XKS1*), procedeu-se para um teste em fermentação. Para possibilitar esse experimento, inicialmente se fez necessário a inserção de uma XI funcional que permitiria o consumo de xilose na linhagem. Logo, como está cepa possui uma marca auxotrófica para uracila (*URA3*), optou-se pela expressão do gene através de um plasmídeo da coleção LGE - *p426.GPD_XIOrp* (marcador de seleção *URA3*) que apresenta uma *xylIA* derivada de *Orpinomyces sp.* Sendo assim, transformou-se a levedura BVY008 por protocolo de transformação de acetato de lítio (LiAc)[38] e a confirmação da inserção do plasmídeo ocorreu pelo crescimento em meio específico sem adição de uracila. A levedura obtida foi nomeada BVY008 + XIOrp (BVY008+*p426.GPD_XIOrp*).

A fermentação para a avaliação da superexpressão de *XKS1*, ocorreu em semi-anaerobiose, condição mais favorável para a fermentação etanólica. A cepa GGY018+XIOrp (**Tabela 1 - Seção 4.4.1**) foi utilizada como comparativo da levedura BVY008 + XIOrp, sendo a superexpressão do *XKS1* a única diferença entre as linhagens. Logo, BVY008 contendo a superexpressão de *XKS1* apresentou um maior consumo de xilose e produção de etanol significativamente superior que a cepa GGY018 expressando somente o *XKS1* endógeno, mostrado na **Figura 15**. Ambas as linhagens esgotaram completamente a glicose em 8 horas de fermentação, BVY008 consumiu 5,3 g.L⁻¹ de xilose em 120 horas e produziu 4,1 g.L de etanol total com rendimento de 0,38 g.L, enquanto GGY018 converteu 3,5 g.L de xilose e obteve 2,9 g.L de etanol com rendimento de 0,32 g/L (**Tabela 3**).

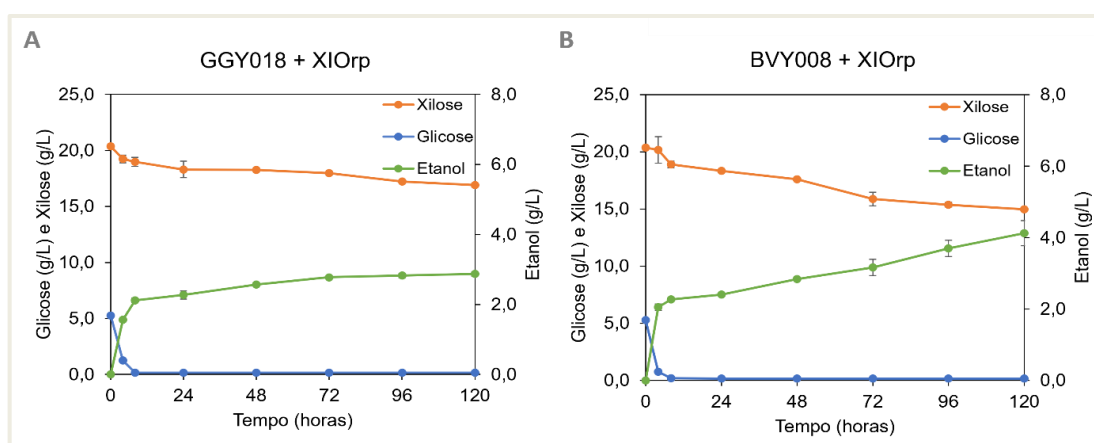


Figura 15. Fermentação em semi-anaerobiose por *S. cerevisiae* com superexpressão do gene *XKS1* (A) GGY018 com *XKS1* endógeno (B) BVY008 com superexpressão do *XKS1* sob o promotor *TEF1*. As concentrações de glicose e xilose estão indicadas no eixo esquerdo e as concentrações de etanol estão indicadas no eixo direito em ambos os gráficos. As fermentações foram realizadas em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão da média dos valores.

Tabela 3. Comparação do desempenho de fermentação entre cepas de *S. cerevisiae*

Linhagem	Açúcar inicial (g.L ⁻¹)		Consumo total de xilose (g.L ⁻¹)	Consumo total de açúcar (g.L ⁻¹)	Produção de etanol (g.L)	Produtividade volumétrica global (g.L ⁻¹)	Rendimento (Etanol / Açúcar (g/L))
	Glicose	Xilose					
GGY018 + XIOrp	5,3	20,4	3,5	8,8	2,9	0,024	0,32
BVY008 + XIOrp	5,3	20,4	5,4	10,7	4,1	0,034	0,38

Estudos que avaliaram a superexpressão de *XKS1*, indicaram que sua presença contribuiu para uma melhora significativa na fermentação da xilose[3], [57]. Porém, em alguns trabalhos é sugerido que a alta expressão da enzima XK pode ser prejudicial ao metabolismo da xilose, inibindo e reduzindo o consumo de xilose mesmo nos casos em que houve aumento nas taxas de rendimento de etanol[23], [24]. Além disso, foi apontada a necessidade da expressão modulada de XK para uma

fermentação de xilose eficiente, considerando as características intrínsecas da cepa hospedeira e alterações genéticas presentes em sua engenharia metabólica[23]. Tais efeitos negativos da superexpressão de *XKS1* não foram observados nos dados obtidos no presente trabalho.

Através deste estudo foi possível confirmar o efeito positivo do aumento da expressão do *XKS1* e que o nível de expressão do gene, e consequentemente da enzima XK, é crucial para aumentar a taxa de absorção de xilose e melhorar a fermentação para produção de etanol. Indicando que a melhora geral da linhagem BVY008, têm uma relação sinérgica com as modificações genéticas presentes associadas ao fundo industrial robusto, levando a uma maior fluidez da via de consumo de xilose e consequentemente em sua performance no processo fermentativo para produção de etanol.

4.5.4 Prospecção de novas xiloses isomerases funcionais

Apesar dos avanços na identificação de XI a partir de diferentes fontes, muitos estudos têm focado na descoberta de novas XI para aplicações biotecnológicas utilizando a xilose como fonte de carbono, sendo a expressão de XI com alta atividade catalítica imprescindível para a produção eficiente e viável de bioetanol a partir de biomassa celulósica[59]. Para tanto, a prospecção de novas XI foi dividida em quatro etapas: (i) Identificação de novas XI potencialmente funcionais por análises *in silico*; (ii) Síntese dos genes que codificam as XI identificadas, montagem de plasmídeos e expressão em uma linhagem selecionada; (iii) Avaliação e seleção de genes que codificam XI potencialmente funcionais; (iv) integração dos genes das XI selecionadas ao genoma da linhagem desenvolvida (BVY008) (**Seção 4.5.3**).

4.5.4.1 Identificação de XI funcionais por análise *in silico*

Novas XI funcionais foram prospectadas *in silico* no banco de dados biológicos públicos NCBI (genes e proteínas - cerca de 180 milhões de proteínas) e em um banco de dados públicos de DNA - *JGI Integrated Microbial Genomes & Microbiomes* (IMG/M) - (metagenomas e metatranscriptomas - cerca de 26 milhões de transcritos), combinando uma estratégia de algoritmos de análise genômica

comparativa e inteligência artificial treinados implementados no software XIMMER2, desenvolvido pelo laboratório LGE.

Na primeira análise no Banco de dados NCBI, foram selecionados cinco genes que codificam XI a partir de diferentes bactérias e outros dois genes de fungos basais, totalizando sete XI potencialmente funcionais. Na segunda abordagem selecionaram-se mais sete genes de XI, através da análise de metagenomas e metatranscriptomas sequenciados do rúmen de mamíferos: quatro metatranscriptomas de *Bos taurus* e *Ovis aries* e, cinco metagenomas de *Capra aegagrus hircus*, *Alces alces gigas* e *Trichechus inunguis*. O foco em microbiota de ruminantes se deve ao sucesso dos trabalhos anteriores que obtiveram XI funcionais em leveduras a partir de prospecção nesses ambientes que possuem como característica uma elevada taxa de degradação e consumo de biomassa em ambiente semi-anaeróbico[17], [60]. No total, foram selecionadas 14 XI candidatas.

4.5.4.2 Síntese, montagem e inserção de plasmídeos das XI

Os 14 genes *xyIA* que codificam as XI candidatas foram sintetizados e passaram por uma etapa de otimização de códons realizados pela empresa Fastbio. A fim avaliar os 14 genes de xilose isomerase, construiu-se uma cepa testadora auxotrófica para a expressão episomal de plasmídeos com o marcador de seleção URA3. Para isso, a cepa BVY005 (BVY003.351*gre3*Δ) foi transformada com um sistema CRISPR-Cas9 e um DNA doador com homologia com o locus URA3 e um códon de parada. Nomeou-se a levedura de GGY018 (BVY005 *ura3*Δ). Após a confirmação da edição, as células auxotróficas foram transformadas com plasmídeos contendo cada um dos 14 genes de xilose isomerase e os respectivos controles (plasmídeo vazio para controle negativo e xilose isomerase funcional derivada do fungo *Orpinomyces sp.*, como controle positivo). Informações sobre as linhagens obtidas na **Tabela 1 (Seção 4.4.1)**.

4.5.4.3 Avaliação e seleção das XI

A fim de selecionar as melhores XIs entre as 14 identificadas, foram realizadas duas etapas de testes utilizando as cepas GGY018 expressando os vetores de xilose isomerase: (i) crescimento em aerobiose e (ii) fermentação em semi-anaerobiose. A descrição das linhagens utilizadas está na **Tabela 1 (Seção 4.4.1)**.

Primeiramente as cepas foram avaliadas em condições aeróbicas (meio YNB URA- contendo 20 g/L de xilose) em dois experimentos utilizando os mesmos parâmetros, sendo a OD quantificada em 48, 96 e 144 horas. Logo, foi possível observar o crescimento da cepa GGY018 com o gene da XI derivado do fungo *Orpinomyces sp.*, conhecido como um gene funcional na levedura *S. cerevisiae*[17], apresentado na **Figura 16** (curva identificado como “XI”). Como esperado, a cepa sem expressão do gene de xilose isomerase (plasmídeo vazio - VZ) não apresentou crescimento em xilose.

Em relação as 14 XI identificadas na prospecção *in silico*, três conferiram às células de levedura a capacidade de crescer em meio contendo xilose como única fonte de carbono. As três XI que permitiram um melhor crescimento em xilose foram: XI-05 (**Figura 16.A**), XI-11 e XI-12 (**Figura 16.B**). A XI-05 foi prospectada no banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI. Já a XI-11 e XI-12 foram prospectados nos dados do metatranscriptoma e metagenoma extraídos de microrganismos presentes no trato digestivo de ruminantes. Curiosamente, a XI-11 apresentou um padrão de crescimento parecido ao da XI derivada de *Orpinomyces sp.* (**Figura 16.B**). Enquanto isso, a XI-12 apresentou uma OD de 3.075, um valor superior ao obtido pela XI de referência.

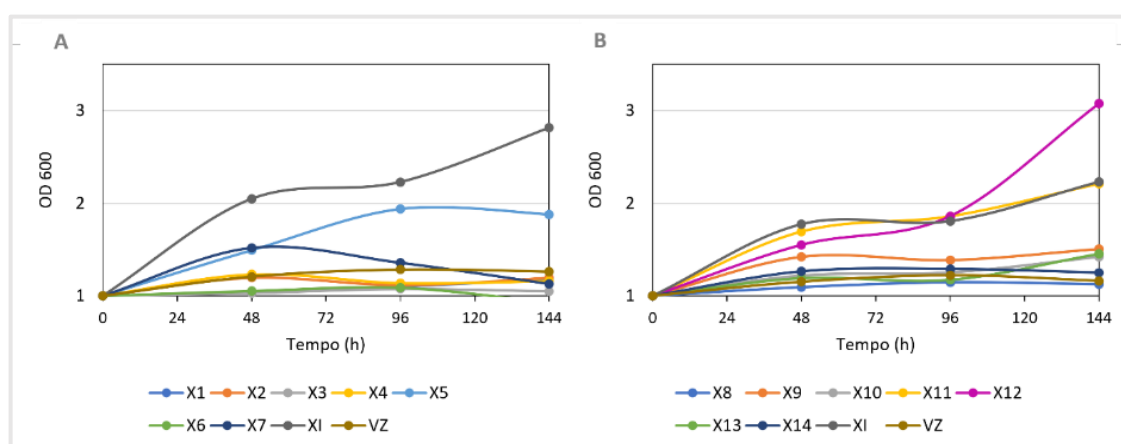


Figura 16: Perfis de crescimento da cepa GGY018 expressando diferentes xilose isomerases em condições aeróbicas. VZ = vetor vazio (controle negativo); XI = xilose isomerase derivada de *Orpinomyces sp.* (controle positivo). **A.** Curvas de X1 a X7. **B.** Curvas de X8 a X14.

Essa análise, se mostrou extremamente importante, pois se as xiloses isomerases prospectadas não possibilitassem o crescimento em xilose na cepa testadora, logo, seriam incapazes de fermentar esse açúcar. No entanto, apesar das três selecionadas terem apresentado crescimento em xilose como única fonte de

carbono em aerobiose, era necessário avaliar a capacidade de fermentar xilose e produzir etanol. Com esse intuito, realizou-se um ensaio em semi-anaerobiose com a linhagem GGY018 expressando os vetores de XI de XI-05, XI-11 e XI-12 em meio YNB (URA- 5 g/L glicose e 20 g/L xilose) sob condições limitadas de oxigênio. Esperava-se que essas condições fossem mais favoráveis para a fermentação do etanol e resultariam em uma melhor performance das XI. A partir desse experimento foi possível observar que especialmente XI-11 e XI-12 apresentaram capacidade de consumir xilose e produzir mais etanol do que o controle negativo (VZ) (**Figura 17**). Por outro lado, os resultados de XI-05 foram semelhantes ao controle VZ. As três xiloses isomerases selecionadas não se mostraram tão eficientes quanto o controle positivo representado pelo gene derivado de *Orpinomyces sp.*.

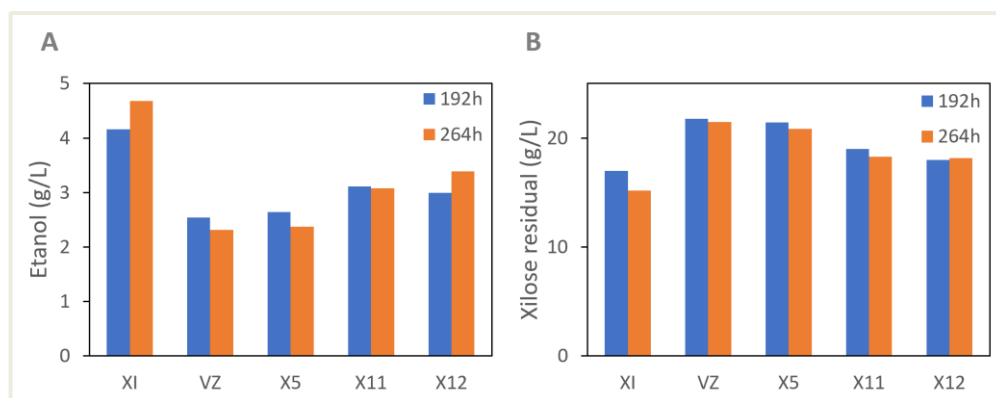


Figura 17. Fermentação em semi-anaerobiose pela cepa GGY018 expressando diferentes xilose isomerases (5, 11 e 12). **A.** Produção de etanol **B.** xilose residual (direita). VZ = vetor vazio (controle negativo); XI = xilose isomerase derivada de *Orpinomyces sp.* (controle positivo).

Apesar de algumas XI terem sido relatadas como funcionais em *S. cerevisiae*: *Piromyces sp.* E2[61], *Orpinomyces sp.*[17], *Lachnoclostridium phytofermentans* (anteriormente conhecido como *Clostridium phytofermentans*)[15], *Prevotella ruminicola*[62] e *Streptomyces rubiginosus*[63]; os primeiros estudos que tentaram identificar XI bacterianos não foram bem sucedidas em *S. cerevisiae*, este fato sendo atribuído ao dobramento inadequado da enzima e a sua insolubilidade citoplasmática[59]. Sarthy *et al.*, 1987[10], citou que o pH interno das células de levedura, modificações pós-traducionais da proteína e formação de ponte dissulfeto inter - ou intramolecular também podem afetar a atividade da enzima. Logo, sugere-se que estes são fatores que podem estar afetando o desempenho de XI-05, XI-11 e XI-12.

Contudo, diferentes estratégias para transformar XI não funcionais em funcionais de forma bem sucedida foram descritas anteriormente. Aeling *et al.*, 2012[64], utilizou uma abordagem de mutagênese sítio-dirigida para melhorar a expressão e a atividade da enzima XI de *Ruminococcus flavefaciens*. Temer *et al.*, 2017[13], demonstrou ser possível tornar a XI de *Propionibacterium acidipropionici* funcional em *S. cerevisiae*, através de uma coexpressão com o complexo de chaperonina *GroEL-GroES* de *Escherichia coli*. Tal feito foi associado a um dobramento correto promovido pelo complexo *GroEL-GroES*. Já a XI do fungo anaeróbico *Piromyces sp. E2* – primeira XI que apresentou funcionalidade ao ser expressa em *S. cerevisiae* recombinante – apresentou um consumo de xilose lento[61]. Visando melhorar essa de conversão, foram aplicadas três rodadas de evolução direcionada, gerando mutantes de XI contendo seis mutações (E15D, E114G, E129D, T142S, A177T e V433I) responsáveis por aumentar as taxas de consumo de xilose e a produção de etanol[65].

4.5.5 Engenharia evolutiva

A fim de melhorar a metabolização de xilose, prosseguiu-se para uma abordagem de evolução adaptativa para tornar a XI-05 funcional e melhorar as taxas de consumo de xilose da XI-11 e XI-12. Logo, iniciou-se um processo de integração das XI (XI-05, XI-11 e XI-12) no genoma da linhagem construída BVY008 (**Seção 5.3**). As sequências dos cassetes *pGPD-XyIA-CY1t* foram amplificadas dos vetores construídos de XI-05, XI-11 e XI-12. Para edição genômica, aplicou-se uma estratégia de DNA doador e sequência de gRNA com homologia ao elemento delta δ do retrotransposon Ty. As sequências δ são repetições terminais longas (*Long Terminal Repeats – LTRs*) do retrotransposão Ty de *S. cerevisiae*[66]–[68]. No genoma de levedura, há centenas dessas sequências, podendo ocorrer isoladas ou associadas aos elementos de retrotransposão[66]. Esta abordagem possibilita integrar um elevado número de cópias de genes heterólogos nos cromossomos de levedura[69] em apenas um evento de transformação. A mesma estratégia foi utilizada no estudo desenvolvido por Santos *et al.*, 2016[29]. Desta forma, foram confirmadas as integrações genômicas de XI-05 e XI-11 na linhagem BVY008. Contudo, ainda não se obteve sucesso na integração do cassete de expressão da XI-12. As leveduras obtidas foram nomeadas BVY008-X5 e BVY008-X11.

Sendo assim, iniciou-se a evolução adaptativa nas leveduras BVY008-X5 e BVY008-X11. Para a fermentação da xilose, é necessário o crescimento anaeróbico das linhagens para produção de etanol. Logo, na engenharia evolutiva das leveduras expressando as XI utilizou-se em frascos selados proporcionando um ambiente semi-anaeróbico. Inicialmente, foi utilizado o meio YP (15 g/L glicose e 15 g/L xilose), de forma que a divisão celular resultante do consumo de glicose fosse capaz de induzir mutações. O critério definido para alterar as proporções de açúcares, seria estabilizar a OD entre os cultivos. As leveduras BVY008-X5 (310 gerações) e BVY008-X11 (260 gerações) atingiram estabilização na OD após 26 e 31 dias, respectivamente, apresentado na **Figura 18**.

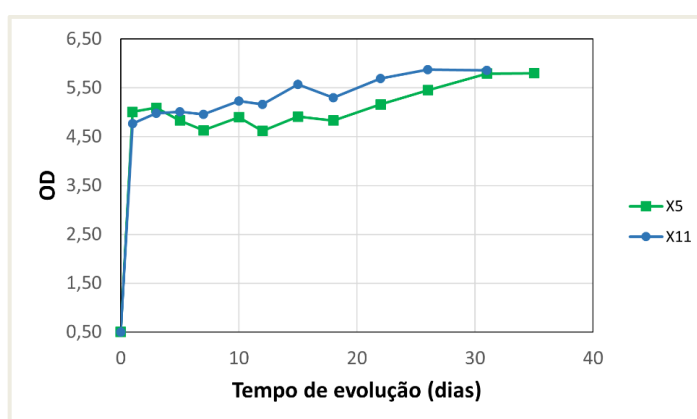


Figura 18. Evolução adaptativa das leveduras BVY008-X5 e BVY008-X11 em meio YPDX (1.5 g/L glicose e 1.5 g/L xilose).

A engenharia evolutiva é uma das principais abordagens que possibilitam gerar diversidade no desempenho de leveduras sob condições não ideais de crescimento[70]. Diversos estudos já obtiveram sucesso nessa abordagem melhorando diversos fenótipos[29], [71], [72]. Neste contexto, é sugerido que tal abordagem poderá contribuir para uma melhora significativa na atividade específica das XI identificadas, refletindo em uma melhora no crescimento celular, nas taxas de assimilação de xilose e produção de etanol em linhagens de *S. cerevisiae* utilizando xilose como fonte de carbono. Na literatura alguns estudos obtiveram resultados rápidos para obtenção do fenótipo desejado: três a doze ciclos[29]; enquanto outros demoraram longos períodos de 460 gerações (266 dias) de seleção[72]. Sendo assim, a obtenção do fenótipo melhorado para metabolização dessa pentose não pode ser precisada, pelas questões intrínsecas do *background* e do metabolismo da levedura.

Por fim, após não ter sido notada variação da OD entre os repiques, iniciou-se o processo de transição de alteração do meio de cultivo das leveduras em evolução. Para tanto, foram realizados inóculos a partir dos frascos de BVY008-X5 (310 gerações) e BVY008-X11 (260 gerações), iniciando na OD 0,5 em meio YP (10 g/L glicose e 20 g/L xilose) e definiu-se que o espaço de tempo entre os cultivos seria mais longo entre 5-7 dias. Tais alterações tem como objetivo gerar uma maior pressão evolutiva na linhagem visando acelerar o processo de evolução para melhora do consumo de xilose.

4.6 CONCLUSÃO

Neste estudo, utilizou-se os segregantes FMY097 e LUY27 das leveduras industriais SA-1 e PE-2 - amplamente usadas na indústria de etanol 1G - para desenvolver uma linhagem com potencial produção de etanol de segunda geração. Por meio de cruzamento dos parentais e esporulação do híbrido, sendo obtido um segregante haploide altamente resistente a HMF e apresentando a via da pentose fosfato engenheirada através de superexpressão dos genes *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1*. A fim de melhorar ainda mais o metabolismo de pentose da cepa, o gene *GRE3* foi interrompido e o gene *XKS1* superexpresso. A superexpressão do *XKS1* sob o promotor *TEF1* proporcionou uma melhora significativa no consumo de xilose e produção de etanol, confirmando que este ajuste fino é importante para a metabolização eficiente de xilose. Por fim, foi possível obter uma levedura com potencial biotecnológico tolerante até 40 mM (5.0 g/L) do aldeído HMF e com as principais modificações metabólicas para o consumo de xilose.

Além disso, a partir de banco de dados públicos associados a inteligência artificial identificou-se três xilose isomerases potencialmente funcionais (XI-05, XI-11, XI-12) que apresentaram crescimento aeróbio em xilose como única fonte de carbono. Duas dessas enzimas – XI-11 e XI-12 – possuem a capacidade de fermentar xilose e produzir etanol, porém em baixas taxas. A identificação dessas XI funcionais em *S. cerevisiae* fornece um excelente ponto de partida para obtenção de novas linhagens fermentadoras de xilose para produção de etanol. Contudo, o processo de evolução adaptativa, em andamento, é uma estratégia imprescindível para melhorar o consumo de xilose e identificar novos alvos gênicos relacionados com este fenótipo.

4.7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A identificação de XI funcionais em *S. cerevisiae* e a inserção no *background* robusto construído foi um ponto de partida importante. No entanto, mais esforços devem ser depositados na evolução das linhagens desenvolvidas para melhorar o fenótipo de consumo de xilose e produção de etanol. Após a etapa de evolução, será realizado o sequenciamento das linhagens evoluídas e os genes que contribuíram para tal fenótipo identificados, testados e validados. Além disso, as leveduras evoluídas devem ser submetidas em fermentação em hidrolisado hemicelulósico a fim de avaliar seus desempenhos.

4.8 REFERÊNCIAS

- [1] Z. Cai, B. Zhang, e Y. Li, “Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation : Reflections and perspectives”, p. 34–46, 2012, doi: 10.1002/biot.201100053.
- [2] J. T. Cunha, P. O. Soares, A. Romani, J. M. Thevelein, e L. Domingues, “Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, nº 1, p. 1–14, 2019, doi: 10.1186/s13068-019-1360-8.
- [3] N. W. Y. Ho, Z. Chen, e A. P. Brainard, “Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Effective Cofermentation of Glucose and Xylose”, 1998.
- [4] D. Brat, E. Boles, e B. Wiedemann, “Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, nº 8, p. 2304–2311, abr. 2009, doi: 10.1128/AEM.02522-08.
- [5] M. Kuyper *et al.*, “Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, nº 4–5, p. 399–409, fev. 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.010.
- [6] A. Eliasson, C. Christensson, C. Fredrik Wahlbom, B. Ba, B. Hahn-Ha,gerdal, e H. Ha,gerdal, “Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures”, 2000.
- [7] P. Kötter, R. Amore, C. P. Hollenberg, e M. Ciriacy, “Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant”,

- Curr. Genet.*, vol. 18, nº 6, p. 493–500, 1990, doi: 10.1007/BF00327019.
- [8] M. Walfridsson *et al.*, “Xylose-Metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressing the TKL1 and TAL1 Genes Encoding the Pentose Phosphate Pathway Enzymes Transketolase and Transaldolase”, 1995.
- [9] S. Kwak e Y. S. Jin, “Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective”, *Microbial Cell Factories*, vol. 16, nº 1. BioMed Central Ltd., 11 de maio de 2017. doi: 10.1186/s12934-017-0694-9.
- [10] A. V Sarthy, B. L. McConaughy, Z. Lobo, J. A. Sundstrom, C. E. Furlong, e B. D. Hall, “Expression of the *Escherichia coli* Xylose Isomerase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 53, nº 9, p. 1996–2000, 1987.
- [11] H. Zhou, J. sheng Cheng, B. L. Wang, G. R. Fink, e G. Stephanopoulos, “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.*, vol. 14, nº 6, p. 611–622, 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.07.011.
- [12] M. Kuyper, M. J. Toirkens, J. A. Diderich, A. A. Winkler, J. P. Van Dijken, e J. T. Pronk, “Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain”, vol. 5, p. 925–934, 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2005.04.004.
- [13] B. Temer *et al.*, “Conversion of an inactive xylose isomerase into a functional enzyme by co-expression of GroEL-GroES chaperonins in *Saccharomyces cerevisiae*”, *BMC Biotechnol.*, vol. 17, nº 1, set. 2017, doi: 10.1186/s12896-017-0389-7.
- [14] © Springer-Verlag, R. Amore, M. Wilhelm, e C. P. Hollenberg, “Applied AFwrobiology Biotechnology The fermentation of xylose-an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast*”, 1989.
- [15] C. J. Moes, I. S. Pretorius, e W. H. Van Zyl, “Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (XYK4) in *Saccharomyces cerevisiae*.”, 1996.
- [16] M. Kuyper *et al.*, “High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 4, nº 1, p. 69–78, out. 2003, doi: 10.1016/S1567-1356(03)00141-7.
- [17] A. Madhavan *et al.*, “Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: Gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, nº 6, p. 1067–1078, abr. 2009, doi: 10.1007/s00253-008-1794-6.

- [18] K. L. Träff, R. R. O. Cordero, W. H. Van Zyl, e B. Hahn-Hägerdal, “Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 12, p. 5668–5674, dez. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.12.5668-5674.2001.
- [19] T. K. Sato *et al.*, “Directed Evolution Reveals Unexpected Epistatic Interactions That Alter Metabolic Regulation and Enable Anaerobic Xylose Use by *Saccharomyces cerevisiae*”, *PLoS Genet.*, vol. 12, n° 10, out. 2016, doi:10.1371/journal.pgen.1006372.
- [20] K. Karhumaa, R. Fromanger, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, “High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 73, n° 5, p. 1039–1046, jan. 2007, doi: 10.1007/s00253-006-0575-3.
- [21] A. Kuhn, C. Van Zyl, A. Van Tonder, e B. A. Prior, “Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, n° 4, p. 1580–1585, 1995, doi: 10.1128/aem.61.4.1580-1585.1995.
- [22] A. Kovalevsky *et al.*, “Inhibition of d-xylose isomerase by polyols: Atomic details by joint X-ray/neutron crystallography”, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 68, n° 9, p. 1201–1206, 2012, doi: 10.1107/S0907444912024808.
- [23] B. Johansson, C. Christensson, T. Hogley, e B. Hahn-Hägerdal, “Xylulokinase Overexpression in Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Also Expressing Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase and Its Effect on Fermentation of Xylose and Lignocellulosic Hydrolysate”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 9, p. 4249–4255, set. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.9.4249-4255.2001.
- [24] Y. S. Jin, H. Ni, J. M. Laplaza, e T. W. Jeffries, “Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 1, p. 495–503, jan. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.1.495-503.2003.
- [25] G. Hubmann, J. M. Thevelein, e E. Nevoigt, “Natural and modified promoters for tailored metabolic engineering of the yeast *saccharomyces cerevisiae*”, *Methods Mol. Biol.*, vol. 1152, p. 17–42, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0563-8_2.
- [26] T. Bamba, T. Hasunuma, e A. Kondo, “Disruption of PHO13 improves ethanol production via the xylose isomerase pathway”, *AMB Express*, vol. 6, n° 1, p. 1–10, dez. 2016, doi: 10.1186/s13568-015-0175-7.
- [27] B. Peng, Y. Shen, X. Li, X. Chen, J. Hou, e X. Bao, “Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces*

- cerevisiae”, *Metab. Eng.*, vol. 14, n° 1, p. 9–18, jan. 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2011.12.001.
- [28] M. L. A. Jansen *et al.*, “Saccharomyces cerevisiae strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 17, n° 5, p. 1–20, 2017, doi: 10.1093/femsyr/fox044.
- [29] L. V. Dos Santos *et al.*, “Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered Saccharomyces cerevisiae strains”, *Sci. Rep.*, vol. 6, dez. 2016, doi: 10.1038/srep38676.
- [30] U. Sauer, “Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes.”, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 73, p. 129–169, 2001, doi: 10.1007/3-540-45300-8_7.
- [31] J. M. Guillamón e E. Barrio, “Genetic polymorphism in wine yeasts: Mechanisms and methods for its detection”, *Front. Microbiol.*, vol. 8, n° MAY, p. 1–20, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00806.
- [32] Z. E. Sauna e C. Kimchi-Sarfaty, “Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease”, *Nat. Rev. Genet.*, vol. 12, n° 10, p. 683–691, 2011, doi: 10.1038/nrg3051.
- [33] C. M. Yates e M. J. E. Sternberg, “The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) on protein-protein interactions”, *J. Mol. Biol.*, vol. 425, n° 21, p. 3949–3963, 2013, doi: 10.1016/j.jmb.2013.07.012.
- [34] K. J. DUDLEY, Joel T.; KARCZEWSKI, *Exploring personal genomics*, First edit. Oxford University Press, 2013.
- [35] L. C. Basso, H. V. De Amorim, A. J. De Oliveira, e M. L. Lopes, “Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, n° 7, p. 1155–1163, 2008, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.
- [36] F. da S. B. de Mello, A. L. V. Coradini, P. A. G. Tizei, M. F. Carazzolle, G. A. G. Pereira, e G. S. Teixeira, “Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant Saccharomyces cerevisiae strain”, *Biomass and Bioenergy*, vol. 120, n° October 2018, p. 49–58, 2019, doi: 10.1016/j.biombioe.2018.10.019.
- [37] H. Ma, S. Kunes, P. J. Schatz, e D. Botstein, “Plasmid construction by homologous recombination in yeast (Saccharomyces cerevisiae; transformation; plasmid recombination; YCpSO derivatives; YEp420 [previously called 8721 derivatives)”, *Gene*, vol. 58, n° 617, p. 253–3623, 1987.
- [38] R. D. Gietz e R. H. Schiestl, “High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method”, *Nat. Protoc.*, vol. 2, n° 1, p. 31–34, 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.13.

- [39] H.C. Birnboim and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucleic Acids Res.*, vol. Volume 7.
- [40] The dunham Lab, "Yeast mating type halo assay".
dunham.gs.washington.edu/protocols.shtml
- [41] S. Treusch, F. W. Albert, J. S. Bloom, I. E. Kotenko, e L. Kruglyak, "Genetic Mapping of MAPK-Mediated Complex Traits Across *S. cerevisiae*", vol. 11, n° 1, 2015, doi: 10.5061/dryad.j20f0.
- [42] J. L. Argueso *et al.*, "Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production", *Genome Res.*, vol. 19, n° 12, p. 2258–2270, 2009, doi: 10.1101/gr.091777.109.
- [43] Z. L. Liu, P. J. Slininger, B. S. Dien, M. A. Berhow, C. P. Kurtzman, e S. W. Gorsich, "Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, n° 8, p. 345–352, 2004, doi: 10.1007/s10295-004-0148-3.
- [44] F. da S. B. de Mello *et al.*, "Genetic mapping of a bioethanol yeast strain reveals new targets for aldehyde- and thermotolerance", *bioRxiv*, p. 2021.11.23.469769, 2021.
- [45] D. A. Costa *et al.*, "Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, n° 8, p. 3829–3840, 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5580-3.
- [46] B. E. Della-Bianca e A. K. Gombert, "Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry", *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 104, n° 6, p. 1083–1095, 2013, doi: 10.1007/s10482-013-0030-2.
- [47] K. Karhumaa, B. Hahn-Hägerdal, e M. F. Gorwa-Grauslund, "Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering", *Yeast*, vol. 22, n° 5, p. 359–368, 2005, doi: 10.1002/yea.1216.
- [48] S. Le Borgne, "Genetic Engineering of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae*", *Methods Mol. Biol.*, vol. 824, p. 451–465, doi: 10.1007/978-1-61779-433-9.
- [49] D. A. Marad, S. W. Buskirk, e G. I. Lang, "Altered access to beneficial mutations slows adaptation and biases fixed mutations in diploids", *Nat. Ecol. Evol.*, vol. 2, n° 5, p. 882–889, 2018, doi: 10.1038/s41559-018-0503-9.
- [50] A. C. Gerstein, "Mutational effects depend on ploidy level: All else is not equal", *Biol. Lett.*, vol. 9, n° 1, p. 0–3, 2013, doi: 10.1098/rsbl.2012.0614.
- [51] D. A. Thompson, M. M. Desai, e A. W. Murray, "Ploidy Controls the Success of Mutators and Nature of Mutations during Budding Yeast Evolution", *Curr. Biol.*,

- vol. 16, nº 16, p. 1581–1590, 2006, doi: 10.1016/j.cub.2006.06.070.
- [52] M. L. Lopes, S. C. L. Paulillo, A. Cherubin, A. Godoy, A. H. B. N, e H. V. De Amorim, “Tailored Yeast Strains for Ethanol Production: Process-Driven Selection”, *Fermentec*, 2015.
- [53] A. Weiss, J. Delproposto, e C. N. Giroux, “High-throughput phenotypic profiling of gene – environment interactions by quantitative growth curve analysis in *Saccharomyces cerevisiae*”, vol. 327, p. 23–34, 2004, doi: 10.1016/j.ab.2003.12.020.
- [54] J. Bernardes, R. B. Stelkens, e D. Greig, “Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study”, *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 38, nº 1, p. 42–49, 2016, doi: 10.1111/ijlh.12426.
- [55] K. L. Träff, R. R. O. Cordero, W. H. V Zyl, e B. Hahn-Hägerdal, “Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, nº 12, p. 5668–5674, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.12.5668.
- [56] A. Matsushika, T. Goshima, T. Fujii, H. Inoue, S. Sawayama, e S. Yano, “Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, nº 1, p. 16–25, jun. 2012, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.03.008.
- [57] M. H. Toivari, A. Aristidou, L. Ruohonen, e M. Penttilä, “Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability”, *Metab. Eng.*, vol. 3, nº 3, p. 236–249, 2001, doi: 10.1006/mben.2000.0191.
- [58] P. Tran Nguyen Hoang, J. K. Ko, G. Gong, Y. Um, e S. M. Lee, “Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, nº 1, set. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1269-7.
- [59] T. Seike, Y. Kobayashi, T. Sahara, S. Ohgiya, Y. Kamagata, e K. E. Fujimori, “Molecular evolutionary engineering of xylose isomerase to improve its catalytic activity and performance of micro-aerobic glucose/xylose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, nº 1, p. 1–16, 2019, doi: 10.1186/s13068-019-1474-z.
- [60] J. Hou, Y. Shen, C. Jiao, R. Ge, X. Zhang, e X. Bao, “Characterization and evolution of xylose isomerase screened from the bovine rumen metagenome in *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 121, nº 2, p. 160–165, fev. 2016, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.05.014.
- [61] M. Kuyper *et al.*, “High-level functional expression of a fungal xylose

- isomerase : the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae* ?”, vol. 4, 2003, doi: 10.1016/S1567-1356(03)00141-7.
- [62] R. E. Hector, B. S. Dien, M. A. Cotta, e J. A. Mertens, “Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, nº 1, 2013, doi: 10.1186/1754-6834-6-84.
- [63] M. Gárdonyi e B. Hahn-Hägerdal, “The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*”, 2003.
- [64] K. A. Aeling *et al.*, “Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *saccharomyces cerevisiae*”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, nº 11, p. 1597–1604, 2012, doi: 10.1007/s10295-012-1169-y.
- [65] S. M. Lee, T. Jellison, e H. S. Alper, “Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, nº 16, p. 5708–5716, 2012, doi: 10.1128/AEM.01419-12.
- [66] B. Dujon, “The yeast genome project: What did we learn?”, *Trends Genet.*, vol. 12, nº 7, p. 263–270, 1996, doi: 10.1016/0168-9525(96)10027-5.
- [67] J. D. Boeke, *Transposable elements in Saccharomyces cerevisiae*. 1989.
- [68] N. A. Da Silva e S. Srikrishnan, “Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS Yeast Research*, vol. 12, nº 2, p. 197–214, março de 2012. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00769.x.
- [69] Y. Shiba, E. M. Paradise, J. Kirby, D. K. Ro, e J. D. Keasling, “Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids”, *Metab. Eng.*, vol. 9, nº 2, p. 160–168, 2007, doi: 10.1016/j.ymben.2006.10.005.
- [70] Z. P. Çakar, B. Turanli-Yildiz, C. Alkim, e Ü. Yilmaz, “Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 12, nº 2, p. 171–182, 2012, doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00775.x.
- [71] M. Kuyper *et al.*, “Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation”, vol. 5, p. 399–409, 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.010.
- [72] O. Bengtsson *et al.*, “Identification of common traits in improved xylose-growing *Saccharomyces cerevisiae* for inverse metabolic engineering”, *Yeast*, vol. 25, nº 11, p. 835–847, 2008, doi: 10.1002/yea.1638.

5 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de um manuscrito sobre os principais avanços na engenharia genética de *S. cerevisiae* para metabolização de xilose, sendo constatada a notável contribuição de tais abordagens para compreender o metabolismo dessa pentose em leveduras bem como, na identificação de diversos alvos gênicos que podem possibilitar a obtenção de linhagens melhoradas para a produção de etanol celulósico.

Além disso, foi desenvolvida uma plataforma biotecnológica para teste e expressão de novas xilose isomerases a partir do cruzamento de leveduras industriais. A levedura obtida - BVY008 - apresenta fenótipo de resistência à até 40 mM de HMF e alterações genéticas em sua engenharia metabólica - superexpressão de genes da via da pentose fosfato não oxidativa (*TAL1*, *RKI1*, *TKL1* e *RPE1*), do gene *XKS1* e a deleção do *GRE3*.

Novas XI funcionais em *S. cerevisiae* também foram identificadas no presente estudo, três XI permitindo o crescimento aeróbio em xilose e duas possibilitando a capacidade de fermentar xilose e produzir etanol. A identificação de novas XI funcionais em *S. cerevisiae* é uma importante descoberta para produção de novas linhagens fermentadoras de xilose utilizando o *background* robusto de cepas industriais.

6 REFERÊNCIAS

- [1] E. M. Aro, “From first generation biofuels to advanced solar biofuels”, *Ambio*, vol. 45, nº 1, p. 24–31, 2016, doi: 10.1007/s13280-015-0730-0.
- [2] S. Soltanian *et al.*, “A critical review of the effects of pretreatment methods on the exergetic aspects of lignocellulosic biofuels”, *Energy Convers. Manag.*, vol. 212, nº February, p. 112792, 2020, doi: 10.1016/j.enconman.2020.112792.
- [3] T. J. Tse, D. J. Wiens, e M. J. T. Reaney, “Production of bioethanol—a review of factors affecting ethanol yield”, *Fermentation*, vol. 7, nº 4, p. 1–18, 2021, doi: 10.3390/fermentation7040268.
- [4] Sönnichsen N., “No TitleFuel ethanol production worldwide in 2021, by country”, *Statista*, 2021. <https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/> (acessado 5 de junho de 2022).
- [5] W. Zhao, F. Zhao, S. Zhang, Q. Gong, e G. Chen, “Ethanol production by simultaneous saccharification and cofermentation of pretreated corn stalk”, *J. Basic Microbiol.*, vol. 59, nº 7, p. 744–753, jul. 2019, doi: 10.1002/jobm.201900117.
- [6] R. Bechara, A. Gomez, V. Saint-Antonin, J. M. Schweitzer, F. Maréchal, e A. Ensinas, “Review of design works for the conversion of sugarcane to first and second-generation ethanol and electricity”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 91, nº September 2017, p. 152–164, 2018, doi: 10.1016/j.rser.2018.02.020.
- [7] J. Zhuang, R. W. Gentry, G. R. Yu, G. S. Saylor, e J. W. Bickham, “Bioenergy sustainability in China: Potential and impacts”, *Environ. Manage.*, vol. 46, nº 4, p. 525–530, 2010, doi: 10.1007/s00267-010-9555-6.
- [8] J. Huang, M. T. Khan, D. Perecin, S. T. Coelho, e M. Zhang, “Sugarcane for bioethanol production: Potential of bagasse in Chinese perspective”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 133, nº August, p. 110296, 2020, doi: 10.1016/j.rser.2020.110296.
- [9] R. Rathmann, A. Szklo, e R. Schaeffer, “Land use competition for production of food and liquid biofuels: An analysis of the arguments in the current debate”, *Renew. Energy*, vol. 35, nº 1, p. 14–22, 2010, doi: 10.1016/j.renene.2009.02.025.
- [10] A. Ajanovic, “Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices?”, *Energy*, vol. 36, nº 4, p. 2070–2076, 2011, doi: 10.1016/j.energy.2010.05.019.
- [11] J. K. Saini, R. Saini, e L. Tewari, “Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments”, *3 Biotech*, vol. 5, nº 4, p. 337–353, 2015, doi: 10.1007/s13205-

- 014-0246-5.
- [12] V. Godbole, M. K. Pal, e P. Gautam, “A critical perspective on the scope of interdisciplinary approaches used in fourth-generation biofuel production”, *Algal Res.*, vol. 58, n° June, p. 102436, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102436.
- [13] H. Zabed, J. N. Sahu, A. N. Boyce, e G. Faruq, “Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 66, p. 751–774, 2016, doi: 10.1016/j.rser.2016.08.038.
- [14] S. Achinas e G. J. W. Euverink, “Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass”, *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 23, p. 44–53, 2016, doi: 10.1016/j.ejbt.2016.07.006.
- [15] R. T. Hilares *et al.*, *Production of Top 12 Biochemicals Selected by USDOE from Renewable Resources*. Elsevier, 2022. doi: 10.1016/C2020-0-00357-9.
- [16] G. M. Zanin *et al.*, “Brazilian Bioethanol Program”, *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.*, vol. 84–86, p. 1147–1161, 2000, doi: 10.1007/978-1-4612-1392-5_90.
- [17] Federative Republic of Brazil, “Federative Republic of Brazil Paris Agreement Nationally Determined Contribution (NDC)”. [https://unfccc.int/sites/default/files/NDC/2022-06/Updated - First NDC - FINAL - PDF.pdf](https://unfccc.int/sites/default/files/NDC/2022-06/Updated%20-%20First%20NDC%20-%20FINAL%20-%20PDF.pdf) (acessado 29 de junho de 2022).
- [18] Brasil, “Lei N° 13.576 de 26 de dezembro de 2017”, 2017. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/l13576.htm (acessado 29 de junho de 2022).
- [19] S. Barros, “Report Name: Biofuels Annual - Country: Brazil”, Sao Paulo, 2021.
- [20] C. T. Eckert *et al.*, “Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 82, n° October 2017, p. 3907–3912, 2018, doi: 10.1016/j.rser.2017.10.082.
- [21] W. A. Pippo, C. A. Luengo, L. A. M. Alberteris, P. Garzone, e G. Cornacchia, “Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects”, *Waste and Biomass Valorization*, vol. 2, n° 1, p. 1–16, 2011, doi: 10.1007/s12649-010-9048-0.
- [22] M. O. S. Dias, T. L. Junqueira, C. D. F. Jesus, C. E. V. Rossell, R. Maciel Filho, e A. Bonomi, “Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane”, *Energy*, vol. 43, n° 1, p. 246–252, 2012, doi: 10.1016/j.energy.2012.04.034.
- [23] K. Robak e M. Balcerek, “Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks”, *Microbiol. Res.*, vol. 240, n° June, p. 126534, 2020, doi: 10.1016/j.micres.2020.126534.

- [24] S. Haghghi Mood *et al.*, “Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 27, p. 77–93, 2013, doi: 10.1016/j.rser.2013.06.033.
- [25] M. H. L. Silveira *et al.*, “Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries”, *ChemSusChem*, vol. 8, n° 20, p. 3366–3390, 2015, doi: 10.1002/cssc.201500282.
- [26] F. M. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, e R. Bogel-Łukasik, “Hemicelluloses for fuel ethanol: A review”, *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 13, p. 4775–4800, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- [27] R. H. R. Branco, L. S. Serafim, e A. M. R. B. Xavier, “Second generation bioethanol production: On the use of pulp and paper industry wastes as feedstock”, *Fermentation*, vol. 5, n° 1, p. 1–30, 2019, doi: 10.3390/fermentation5010004.
- [28] Y. Y. Tye, K. T. Lee, W. N. Wan Abdullah, e C. P. Leh, “The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 60, p. 155–172, 2016, doi: 10.1016/j.rser.2016.01.072.
- [29] F. Peng, P. Peng, F. Xu, e R. Sun, “Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses”, vol. 30, p. 879–903, 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.018.
- [30] L. T. Fan, Y.-H. Lee, e M. M. Gharpuray, “The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis”, p. 157–187, 1982, doi: 10.1007/3540116982_4.
- [31] Y. Sun e J. Cheng, “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review”, *Bioresour. Technol.*, vol. 83, n° 1, p. 1–11, 2002, doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- [32] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, e M. J. Negro, “Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review”, *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 13, p. 4851–4861, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- [33] D. Chiaramonti *et al.*, “Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method”, *Biomass and Bioenergy*, vol. 46, p. 25–35, 2012, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.04.020.
- [34] R. M. Almeida, T. Modig, e A. Petersson, “Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*”, vol. 349, n° December 2006, p. 340–349, 2007, doi: 10.1002/jctb.
- [35] R. J. Ulbricht, S. J. Northuo, e J. A. Thomas, “A Review of 5Hydroxymethylfurfural Solutions”, *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 4, p. 843–853,

1984.

- [36] S. Ostergaard, L. Olsson, e J. Nielsen, “Artigo recombinação de leveduras”, vol. 64, nº 1, p. 34–50, 2000.
- [37] L. J. Jönsson e C. Martín, “Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects”, *Bioresour. Technol.*, vol. 199, p. 103–112, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.
- [38] G. Vanmarcke, M. M. Demeke, M. R. Foulquié-Moreno, e J. M. Thevelein, “Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysates”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 14, nº 1, p. 1–15, 2021, doi: 10.1186/s13068-021-01935-9.
- [39] Z. L. Liu, P. J. Slininger, e S. W. Gorsich, “Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanologenic Yeast Strains”, *Applied Biochem. Biotechnol.*, vol. 121–124, p. 451–460, 2005.
- [40] A. Weiss, J. Delproposto, e C. N. Giroux, “High-throughput phenotypic profiling of gene – environment interactions by quantitative growth curve analysis in *Saccharomyces cerevisiae*”, vol. 327, p. 23–34, 2004, doi: 10.1016/j.ab.2003.12.020.
- [41] F. da S. B. de Mello, A. L. V. Coradini, P. A. G. Tizei, M. F. Carazzolle, G. A. G. Pereira, e G. S. Teixeira, “Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain”, *Biomass and Bioenergy*, vol. 120, nº October 2018, p. 49–58, 2019, doi: 10.1016/j.biombioe.2018.10.019.
- [42] Z. L. Liu e M. Ma, “Pathway-based signature transcriptional profiles as tolerance phenotypes for the adapted industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistant to furfural and HMF”, *Applied Biochem. Biotechnol.*, vol. 12632, 2020.
- [43] P. E. McGovern *et al.*, “Fermented beverages of pre- and proto-historic China”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, nº 51, p. 17593–17598, 2004, doi: 10.1073/pnas.0407921102.
- [44] D. Cavalieri, P. E. McGovern, D. L. Hartl, R. Mortimer, e M. Polsinelli, “Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine”, *J. Mol. Evol.*, vol. 57, nº SUPPL. 1, p. 226–232, 2003, doi: 10.1007/s00239-003-0031-2.
- [45] J. L. Legras, D. Merdinoglu, J. M. Cornuet, e F. Karst, “Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history”, *Mol. Ecol.*, vol. 16, nº 10, p. 2091–2102, 2007, doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x.
- [46] M. Börlin, O. Claisse, W. Albertin, F. Salin, J. L. Legras, e I. Masneuf-Pomarede, “Quantifying the effect of human practices on *S. cerevisiae* vineyard metapopulation diversity”, *Sci. Rep.*, vol. 10, nº 1, p. 1–14, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73279-7.

- [47] P. M. L., “FERMENTATION APPELÉE LACTIQUE”, *Pap. Knowl. . Towar. a Media Hist. Doc.*, vol. 7, n° 2, p. 107–15, 1858.
- [48] A. Goffeau *et al.*, “Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- cerevisiae has been completely sequenced Schizosaccharomyces pombe indicate”, *Science (80- .)*, vol. 274, n° October, p. 546–567, 1996.
- [49] A. A. Duina, M. E. Miller, e J. B. Keeney, “Budding yeast for budding geneticists: A primer on the Saccharomyces cerevisiae model system”, *Genetics*, vol. 197, n° 1, p. 33–48, 2014, doi: 10.1534/genetics.114.163188.
- [50] J. Van Den Brink *et al.*, “Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of Saccharomyces cerevisiae to fermentative metabolism”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, n° 18, p. 5710–5723, 2008, doi: 10.1128/AEM.01121-08.
- [51] E. Nevoigt, “ Progress in Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae ”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, n° 3, p. 379–412, 2008, doi: 10.1128/membr.00025-07.
- [52] G. G. Stewart, *Saccharomyces: Saccharomyces cerevisiae*, Second Edi., vol. 3. Elsevier, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5.
- [53] J. T. Cunha, P. O. Soares, A. Romani, J. M. Thevelein, e L. Domingues, “Xylose fermentation efficiency of industrial Saccharomyces cerevisiae yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, n° 1, p. 1–14, 2019, doi: 10.1186/s13068-019-1360-8.
- [54] L. C. Basso, H. V. De Amorim, A. J. De Oliveira, e M. L. Lopes, “Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, n° 7, p. 1155–1163, 2008, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.
- [55] Z. Cai, B. Zhang, e Y. Li, “Engineering Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation : Reflections and perspectives”, p. 34–46, 2012, doi: 10.1002/biot.201100053.
- [56] L. J. Jönsson, B. Alriksson, e N. Nilvebrant, “Bioconversion of lignocellulose : inhibitors and detoxification”, p. 1–10, 2013.
- [57] T. M. Long, Y. Su, J. Headman, A. Higbee, L. B. Willis, e T. W. Jeffries, “Associated Yeast Spathaspora passalidarum”, vol. 78, n° 16, p. 5492–5500, 2012, doi: 10.1128/AEM.00374-12.
- [58] B. Hahn-h, H. Jeppsson, L. Olsson, e A. Mohagheghi, “App // ed Microbiology Biotechnology An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing micro-organisms in a xylose-rich acid hydrolysate”, p. 62–72, 1994.

- [59] D. Brat, E. Boles, e B. Wiedemann, “Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, n° 8, p. 2304–2311, abr. 2009, doi: 10.1128/AEM.02522-08.
- [60] E. Young, S. M. Lee, e H. Alper, “Optimizing pentose utilization in yeast: The need for novel tools and approaches”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, 2010, doi: 10.1186/1754-6834-3-24.
- [61] M. Kuyper *et al.*, “Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation”, *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, n° 4–5, p. 399–409, fev. 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.010.
- [62] A. Matsushika, T. Goshima, T. Fujii, H. Inoue, S. Sawayama, e S. Yano, “Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, n° 1, p. 16–25, jun. 2012, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.03.008.
- [63] K. L. Träff, R. R. O. Cordero, W. H. Van Zyl, e B. Hahn-Hägerdal, “Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 12, p. 5668–5674, dez. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.12.5668-5674.2001.
- [64] T. K. Sato *et al.*, “Directed Evolution Reveals Unexpected Epistatic Interactions That Alter Metabolic Regulation and Enable Anaerobic Xylose Use by *Saccharomyces cerevisiae*”, *PLoS Genet.*, vol. 12, n° 10, out. 2016, doi:10.1371/journal.pgen.1006372.
- [65] Y. Wang *et al.*, “Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*”, 2004.

7 Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética

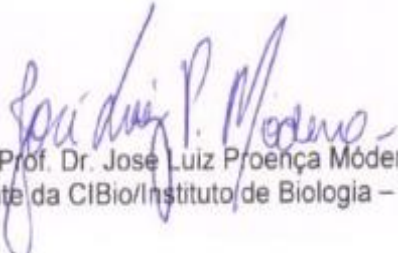


INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **CIBio/IB No. 3/2011 – “Genômica e Biotecnologia”**, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, sub-projeto “Engenharia evolutiva de leveduras industriais para produção de etanol de segunda geração”, da pós-graduanda Beatriz de Oliveira Vargas, RA 263156, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,

09 de novembro de 2020.



Prof. Dr. José Luiz Proença Modena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia – UNICAMP