



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA DE
LEVEDURAS

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* CAPAZES DE FERMENTAR CELOBIOSE

Leonardo Gomes Kretzer

Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Florianópolis – SC

2023

Leonardo Gomes Kretzer

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* CAPAZES DE FERMENTAR CELOBIOSE

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kretzer, Leonardo Gomes
DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE
Saccharomyces cerevisiae CAPAZES DE FERMENTAR CELOBIOSE /
Leonardo Gomes Kretzer ; orientador, Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk, 2023.
106 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Endocitose. 3. Truncagem. 4. iSUCCELL.
5. Meyerozyma guilliermondii. I. Stambuk, Boris Juan
Carlos Ugarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Leonardo Gomes Kretzer

**Título: DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE
Saccharomyces cerevisiae CAPAZES DE FERMENTAR CELOBIOSE**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Sergio Luiz Alves Junior, Dr.
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Prof. Hernán Francisco Terenzi, Dr.
BQA/CCB/UFSC

Prof. Thiago Olitta Basso, Dr.
Departamento de Engenharia Química/USP

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão
que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Prof. Marcelo Farina, Dr.
Coordenador do PPGBQA

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma tornaram esse trabalho possível ou mais prazeroso, em especial:

O professor Boris J. C. U. Stambuk pelos dez anos de orientação, ensinamentos, oportunidades e paciência. Com ele eu aprendi a ser cientista.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao professor Kevin Verstrepen e todo o seu time, por me aceitarem temporariamente em seu laboratório e me acolherem tão bem em uma experiência profundamente transformadora, pessoal e profissionalmente, sem eles, com certeza esse trabalho não seria tão rico.

Ao professor Hernán Terenzi pela ótima tutoria ao longo dos estágios de docência, pelas ótimas conversas e discussões científicas, pelos equipamentos e reagentes compartilhados e pela amizade.

Professores Carlos Peres e Alcir Dafré, pelo espaço e equipamentos de laboratório compartilhados dos respectivos laboratórios (de Bioquímica de Insetos e de Defesas Celulares) ao longo de toda essa jornada, além das conversas e conselhos.

Ao Lucca Corrêa da Silva, aluno de iniciação científica e amigo que me acompanhou e ajudou durante boa parte do doutorado.

Aos parceiros de laboratório de mais longa data, Angela Alves dos Santos e Eduardo Zanella (Zaza) por todas as discussões, debates, conselhos, ajudas e risadas.

Às colegas de laboratório (e amigas) mais recentes, Cristina L. Rüntzel e Isadora Cernach por me receberem tão bem após meu retorno ao lab e por termos entrado em sintonia tão rápido.

À Marília M. Knychala, amiga e grande instrutora de bancada.

Aos alunos dos laboratórios de Bioquímica de Insetos e de Defesas Celulares, em especial a Cristina Rios (CRIIIXXX) pelo convívio e ótimas risadas e histórias.

Amigas que me acompanham desde a graduação e dividiram teto comigo, Gabriela Gubert (Gabi) e Fabiola Ekert (Fabi) que, dentre outras qualidades, emprestaram os ouvidos em discussões científicas de almoços e dividiram angústias durante todas as longas semanas (que se tornaram meses) de isolamento pandêmico. Além delas, destaco com carinho especial o Theo Brascher, Andre G. Parise, Maria Eduarda de Andrade Borges (Duda), Victor Coelho, Daniel Capella e Gabriel M. Cardoso (Buda) pelas discussões em mesa de bar, histórias e amor compartilhado.

À toda minha família, em especial meus pais, Maurício Kretzer e Ivete Gomes Kretzer por todo o amor, apoio, educação, suporte e por serem meu porto seguro em

todo e qualquer momento. Além de meus irmãos, Stéfano Gomes Kretzer e Isadora Gomes Kretzer pelo companheirismo, cumplicidade, conselhos e amor incondicional.

Ao PPG Bioquímica e à UFSC pela oportunidade.

À CAPES, FAPESC e CNPq pelo financiamento do projeto e bolsa de doutorado.

Muito obrigado!

RESUMO

O etanol utilizando biomassa vegetal, chamado de etanol de segunda geração (2G), é uma alternativa para aumentar a produção de biocombustíveis e diminuir a dependência de fontes fósseis. Para isso, são necessárias etapas de pré-tratamento da biomassa e hidrólise de polissacarídeos para liberação de açúcares que podem ser consumidos. A adição de enzimas β -glicosidasas no coquetel enzimático de hidrólise, para hidrólise de celobiose, é o que mais encarece essa etapa. O desenvolvimento de linhagens de leveduras capazes de transportar e hidrolisar intracelularmente celobiose seria interessante para diminuir os custos de obtenção do hidrolisado e ao mesmo tempo pode permitir a integração entre produção convencional (1G) e 2G. Com esse objetivo, o presente trabalho desenvolveu linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, tanto laboratoriais quanto industriais, expressando o transportador de celobiose MgCBT2 e a enzima SpBGL2, uma β -glicosidase intracelular, analisando suas capacidades de consumo de celobiose e produção de etanol. A enzima apresentou capacidade de hidrólise de celobiose e de p-nitrofenil- β -d-glicopiranosídeo (pN β G), um análogo à celobiose, e de p-nitrofenil- β -d-xilopiranosídeo (pN β X), análogo à xilobiose, com maior velocidade e afinidade para pN β G. O transportador MgCBT2 também apresentou capacidade de transporte tanto de pN β G quanto de pN β X, com maior desempenho sobre o primeiro. Foi observado um decréscimo na atividade de transporte de linhagens fermentando celobiose e conseqüente diminuição na velocidade fermentativa e se optou pela truncagem das extremidades N- e/ou C- terminais da proteína de forma a remover os resíduos de lisina que podem ser ubiquitinados e promover a endocitose e posterior degradação. Além da utilização correta de condições de cultivo, os resultados demonstram que a estratégia de truncagem foi eficiente para melhorar o consumo de celobiose, sendo que a versão do transportador truncado em ambas as extremidades permitiu consumo de toda a celobiose do meio fermentativo. Para testar a possibilidade de utilização de algumas linhagens desenvolvidas servirem como plataformas iSUCCELL (metabolizar sacarose e celobiose intracelularmente) e integrar a produção 1G e 2G, foram realizados ensaios de co-fermentação contendo sacarose e celobiose. As linhagens conseguiram consumir ambos os dissacarídeos, porém, o consumo de celobiose piorou em relação à fermentação contendo apenas celobiose. Quando se analisa esses resultados e se compara com outras evidências na literatura, pode-se concluir que plataformas iSUCCELL são interessantes, porém esbarram em características fisiológicas de *S. cerevisiae* que precisariam ser modificadas para permitir a fermentação de celobiose. Em suma, o estudo destaca a viabilidade do desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de consumir celobiose, o que pode representar um avanço na produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica, contribuindo para a busca de soluções mais sustentáveis no setor de biocombustíveis.

Palavras-chave: *Meyerozyma guilliermondii*; *Spathaspora passalidarum*; endocitose; iSUCCELL; β -glicosidase.

ABSTRACT

A second-generation ethanol derived from plant biomass, known as 2G ethanol, serves as an alternative to increase biofuel production and decrease reliance on fossil fuel sources. Achieving this involves several steps, including biomass pre-treatment and polysaccharide hydrolysis to release consumable sugars. The addition of β -glucosidase enzymes in the enzymatic hydrolysis cocktail, for cellobiose hydrolysis, significantly raises costs in this stage. Developing yeast strains capable of transporting and intracellularly hydrolyzing cellobiose could reduce the costs of obtaining the hydrolysate and potentially allow the integration between conventional (1G) and 2G production. This study aimed to develop recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, both in laboratory and industrial settings, expressing the cellobiose transporter MgCBT2 and the enzyme SpBGL2, an intracellular β -glucosidase. The analysis focused on their abilities to consume cellobiose and produce ethanol. The enzyme demonstrated the capacity to hydrolyze cellobiose and p-nitrophenyl- β -d-glucopyranoside (pN β G), an analogue of cellobiose, and p-nitrophenyl- β -d-xylopyranoside (pN β X), an analogue of xylotriose, with higher speed and affinity for pN β G. The transporter MgCBT2 also showed the ability to transport both pN β G and pN β X, performing better with the former. A decrease in transport activity was observed in strains fermenting cellobiose, resulting in a subsequent reduction in fermentation rate. Truncation of the N- and/or C-terminal ends of the protein was opted for to remove lysine residues that could be ubiquitinated, promoting endocytosis and subsequent degradation. Alongside appropriate cultivation conditions, the results demonstrate that the truncation strategy effectively improved cellobiose consumption. The version of the transporter truncated at both ends allowed for complete consumption of cellobiose from the fermentative medium. To explore the possibility of using developed strains as iSUCCELL platforms (metabolizing sucrose and cellobiose intracellularly) and integrating 1G and 2G production, co-fermentation assays containing sucrose and cellobiose were conducted. The strains managed to consume both disaccharides; however, cellobiose consumption worsened in comparison to fermentation containing only cellobiose. When analyzing these results and comparing them with other evidence in the literature, it can be inferred that iSUCCELL platforms are promising but face physiological characteristics of *S. cerevisiae* that would need modification to enable cellobiose fermentation. In summary, the study highlights the feasibility of developing *S. cerevisiae* strains capable of consuming cellobiose, potentially advancing second-generation ethanol production from lignocellulosic biomass. This contributes to the pursuit of more sustainable solutions in the biofuel sector.

Keywords: *Meyerozyma guilliermondii*; *Spathaspora passalidarum*; endocytosis; iSUCCELL; β -glucosidase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS	34
3.2. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES E FRAGMENTOS DE DNA	34
3.3. INICIADORES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS	34
3.4. CLONAGENS PARA SOBREXPRESSÃO COM PLASMÍDEOS	35
3.5. LINHAGENS UTILIZADAS.....	38
3.6. SISTEMA CRISPR-Cas9	41
3.7. GIBSON ASSEMBLY.....	43
3.8. TRANSFORMAÇÕES.....	45
3.9. PROPAGAÇÃO E EXTRAÇÕES DE PLASMÍDEOS	48
3.10. ANÁLISES DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	48
3.11. SEQUENCIAMENTOS.....	48
3.12. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	49
3.13. ENSAIOS DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO	50
3.14. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS.....	51
3.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	51
3.16. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ENZIMA SpBGL2.....	54
4.2. CARACTERIZAÇÃO COLORIMÉTRICA DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE β -GLUCOSÍDEOS PELA PERMEASE MgCBT2.....	55
4.3. ANÁLISES ESTRUTURAL DA PERMEASE MgCBT2.....	56
4.4. FERMENTAÇÃO DE CELOBIOSE E ANÁLISE TEMPORAL DE ATIVIDADES ENZIMÁTICA E DE TRANSPORTE NA LINHAGEM CENPK-B2-MgCBT2.....	61
4.5. INTEGRAÇÃO DO pAUR-XKXDHXR	69
4.6. TRUNCAGEM DO TRANSPORTADOR MgCBT2	70
4.7. FERMENTAÇÕES DE CELOBIOSE PELAS LINHAGENS LABORATORIAIS	

4.8. INTEGRAÇÃO GENÔMICA DOS GENES <i>SpBGL2</i> E/OU DAS DIFERENTES VERSÕES DO GENE <i>MgCBT2</i> NAS LINHAGENS INDUSTRIAIS	75
4.9. ENSAIOS DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO EM CELOBIOSE DAS LINHAGENS INDUSTRIAIS.....	78
5. CONCLUSÕES.....	90
6. REFERÊNCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática simplificada da biomassa lignocelulósica	18
Figura 2: Representação do processo de hidrólise enzimática da celulose	20
Figura 3: Representação do processo de hidrólise enzimática da hemicelulose.....	21
Figura 4: Representação gráfica simplificada de transportadores de açúcares da superfamília MFS (Major Facilitator Superfamily)	25
Figura 5: Estratégia de co-fermentação de celobiose com xilose ou de xilobiose e glicose, evitando o consumo sequencial dos açúcares	28
Figura 6: Plasmídeo p426-MgCBT2 e iniciadores utilizados para truncagem do gene	38
Figura 7: Mapa do plasmídeo pV1382	41
Figura 8: Esquema de clonagem do crRNA no pV1382	42
Figura 9: Mapa do plasmídeo pAUR-XKXDHXR.....	47
Figura 10: Ensaios de cinética enzimática da linhagem CENPK-B2-MgCBT2	54
Figura 11: Ensaios de atividade de transporte da linhagem CENPK-B2-MgCBT2	55
Figura 12: Alinhamento das duas versões do transportador MgCBT2, depositada no NCBI e clonada no plasmídeo p-426-GPD por Knychala (2017)	58
Figura 13: Árvore filogenética comparativa entre transportadores	60
Figura 14: Alinhamento das três versões do transportador MgCBT2 (selvagem e truncadas - tMgCBT2 Δ C e tMgCBT2 Δ N Δ C).....	63
Figura 15: Alinhamento das permeases CDT-1 e CDT-2 de <i>N. crassa</i> e da permease MgCBT2 de <i>M. guilliermondii</i>	64
Figura 16: Fermentação utilizando CENPK-B2-MgCBT2, em meio YP com ~20 g L ⁻¹ de celobiose e em meio Sc otimizado URA- TRP- com ~20 g L ⁻¹ celobiose	65
Figura 17: Fermentação de celobiose com a linhagem CENPK-B2-MgCBT2 e atividades de hidrólise e de transporte	66
Figura 18: Fermentação com linhagem CENPK-B2-MgCBT2 utilizando 10 g L ⁻¹ e 40 g L ⁻¹ de celobiose	67
Figura 19: Confirmação da inserção do plasmídeo pAUR-XKXDHXR no locus AUR1 das linhagens.....	69
Figura 20: Esquema para confirmação do desenvolvimento das versões truncadas do gene MgCBT2	71
Figura 21: Fermentação de celobiose utilizando a linhagem MGD-X-B2-MgCBT2 e atividades enzimáticas e de transporte.....	72
Figura 22: Fermentação de celobiose com as linhagens CENPK-X-B2-Mg CENPK-X-B2-tMg Δ C e CENPK-X-B2-tMg Δ N Δ C	73
Figura 23: Comparação entre atividade da β -glicosidase e de transporte das linhagens CENPK-X-B2-Mg, CENPK-X-B2-tMg Δ C e CENPK-X-B2-tMg Δ N Δ C.....	74
Figura 24: Módulo de reparo para sobreexpressão do gene MgCBT2 construído utilizando Gibson Assembly.....	76
Figura 25: Módulo de reparo para sobreexpressão do gene SpBGL2 construído utilizando Gibson Assembly.....	78
Figura 26: Crescimento em celobiose utilizando as linhagens GMY-X-B2, GMY-X-B2-Mg, GMY-X-B2-tMg Δ C e GMY-X-B2-tMg Δ N Δ C	80
Figura 27: Crescimento em celobiose utilizando as linhagens MPC5H1-B2, MPC5H1-B2-Mg, MPC5H1-B2-tMg Δ C e MPC5H1-B2-tMg Δ N Δ C	81
Figura 28: Comparação entre atividade da β -glicosidase e de transporte das linhagens MPC5H1-B2-Mg, MPC5H1-B2-tMg Δ C e MPC5H1-B2-tMg Δ N Δ C.....	83

Figura 29: Fermentação de celobiose com as linhagens MPC5H1-B2, MPC5H1-B2-Mg, MPC5H1-B2-tMg Δ C e MPC5H1-B2-tMg Δ N Δ C.....	84
Figura 30: Fermentação de celobiose com as linhagens GMY-X-B2-Mg, GMY-X-B2-tMg Δ C e GMY-X-B2-tMg Δ N Δ C.....	84
Figura 31: Co-fermentação de celobiose e sacarose com as linhagens GMY-X-B2-Mg, GMY-X-B2-tMg Δ C e GMY-X-B2-tMg Δ N Δ C.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados	36
Tabela 2: Plasmídeos utilizados	37
Tabela 3: Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.	40
Tabela 4: Parâmetros cinéticos da enzima SpBGL2.....	55

1. INTRODUÇÃO

Nossa espécie atualmente enfrenta o que talvez seja seu maior desafio desde o surgimento das civilizações: as mudanças climáticas ocasionadas ou impulsionadas pelas ações humanas (IPCC, 2022). O desenvolvimento tecnológico, o aumento populacional e o conseqüente aumento da capacidade ou necessidade de consumo, que surgiram em decorrência das sucessivas revoluções industriais, só foram possíveis graças ao aumento progressivo na produção energética (STERN & KANDER, 2012).

O carvão mineral, o petróleo e o gás natural, por serem de relativa fácil extração e liberarem muita energia quando queimados, supriram o mundo energeticamente e foram a força motriz do desenvolvimento industrial e econômico durante os dois últimos séculos. A crescente expansão no consumo de fontes fósseis desde a primeira revolução industrial tem acarretado a liberação de quantidades imensas de carbono na atmosfera. Esse fenômeno tem levado a sérios problemas ambientais que se tornaram mais perceptíveis e estudados nas últimas décadas. Entre esses problemas, destacam-se o aumento da temperatura atmosférica e a acidificação dos oceanos, ambos com conseqüências globais. Tais questões não só ameaçam a economia das nações, mas também colocam em risco a própria existência das civilizações humanas modernas e a estabilidade dos ecossistemas atuais. Assim, as emissões de carbono têm se tornando pauta de discussão e intensa mobilização pública no mundo todo (BRASIL, 2021; IPCC, 2022). Além dos problemas ambientais, o fato de fontes fósseis de energia não serem renováveis (ou pelo menos não renováveis dentro de um período de tempo útil) e de que a capacidade mundial de produção/extração ser restrita a alguns poucos países, faz com que a exploração e o desenvolvimento de fontes alternativas às fósseis sejam cada vez mais impulsionados (BUŠIĆ *et al.*, 2018).

O território brasileiro é rico em recursos naturais propícios para o desenvolvimento de uma matriz energética renovável. O país possui um amplo potencial solar, eólico e hidráulico, sendo este último historicamente o mais explorado. Essa crescente exploração é essencial para garantir ao Brasil o segundo lugar do ranking mundial de países com maior proporção de fontes renováveis em sua matriz energética (WANG *et al.*, 2022). Apesar do status de exemplo em produção energética sustentável, o país enfrenta desafios significativos, especialmente relacionados ao desmatamento (em especial, na região amazônica). Esse problema faz com que o Brasil contribua de forma relevante para os níveis mundiais de emissões de carbono e mudanças climáticas. Essa contribuição se dá não apenas pela liberação direta de carbono decorrente do desmatamento, mas também pela influência da Amazônia no ciclo hídrico de regiões e biomas próximos (BRIENEN *et al.*, 2015; PHILLIPS & BRIENEN, 2017; HUBAU *et al.* 2020; GATTI *et al.*, 2021).

De 2004 a 2012, houve uma redução drástica nos níveis de desmatamento dentro da Amazônia legal, porém, na última década, os níveis voltaram a subir

(INPE, 2020). Esse aumento se deve em grande parte à ação de agentes políticos e implementação de políticas públicas nocivas, como o a redução do repasse de verbas para órgãos de fiscalização ambiental (FREITAS *et al.*, 2022), além da facilitação da expansão agrícola em biomas protegidos, como o decreto de 2019, retirando a proibição da expansão do plantio de cana-de-açúcar na Amazônia e Pantanal brasileiros (BRASIL, 2019).

Apesar de não ter sido motivado pelos problemas ambientais oriundos da utilização de combustíveis fósseis, diversos incentivos públicos para (1) implementação e desenvolvimento de uma indústria alcooleira competitiva, (2) diminuição no preço do etanol e (3) desenvolvimento e implementação de uma frota automotiva com a possibilidade de ser movida a etanol permitiram que o Brasil possuísse hoje estrutura suficiente para a utilização ampla de biocombustíveis, diminuindo nossa dependência e utilização de fontes fósseis (MICHELLON *et al.*, 2008; SORDA *et al.*, 2010; GOLDEMBERG & NOGUEIRA, 2014). Esse processo foi fundamental para que hoje o Brasil se tornasse o segundo maior produtor de biocombustíveis no mundo, com uma produção aproximada de 28 bilhões de litros de etanol, representando aproximadamente 27% de toda a produção mundial em 2021 (RFA, 2022).

A produção agrícola brasileira gera um grande volume de biomassa vegetal que é desperdiçada, subutilizada ou que poderia ser utilizada com propósitos economicamente mais rentáveis, como a produção do etanol de segunda geração (ou etanol 2G) ou compostos de maior valor agregado (SHARMA *et al.*, 2017). A utilização dessa biomassa para produção de etanol 2G é uma estratégia que possibilitaria tanto a diminuição do desmatamento quanto da utilização de combustíveis fósseis pois, caso produzido de forma eficiente, estima-se que apenas com a palha e o bagaço de cana-de-açúcar, seria possível aumentar em até 50% o volume de etanol produzido atualmente, sem que fosse necessário aumentar a área de cultivo (STAMBUK *et al.*, 2008). Além disso, a utilização de resíduos agrícolas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis também é interessante visando a não-competição entre fontes energéticas e fontes alimentares (VAN MARIS *et al.*, 2006). Mesmo com essas características, os incentivos para esse setor continuam sendo muito inferiores quando comparados aos incentivos às fontes fósseis. Por comparação, o subsídio para utilização do carvão mineral, em 2021, foi de R\$ 749 milhões, um valor cerca de três vezes maior do que o destinado aos biocombustíveis (INESC, 2022). É possível que com a redistribuição de recursos e incentivos, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção competitiva de etanol 2G seja acelerado.

A biomassa vegetal é interessante como matéria-prima em bioprocessos (produção de etanol 2G ou outros compostos de maior valor agregado) devido à sua composição. Dependendo de sua origem, as proporções entre lignina, celulose, hemicelulose e cinzas (que são os constituintes da biomassa vegetal seca) podem variar de forma significativa: no bagaço de cana-de-açúcar, essas proporções são de aproximadamente 38,4 a 45,5% de celulose, 22,7 a 27,0% de hemicelulose, 19,1 a 32,4% de lignina, e 1,0 a 2,8% de cinzas; enquanto que para a palha é de

aproximadamente 33,3 a 36,1% de celulose, 18,4 a 28,9% de hemicelulose, 25,8 a 40,7% de lignina e 2,1 a 11,7% de cinzas (CANILHA *et al.*, 2012).

A lignina é uma macromolécula complexa e amorfa, composta em maior parte por fenilpropano, estruturada tridimensionalmente de forma a interagir com a celulose e se ligando à hemicelulose, recobrando ambos e dando rigidez para toda a estrutura da parede celular vegetal (PÉREZ *et al.*, 2002; SARKAR *et al.*, 2012). A principal e mais tradicional utilidade industrial da lignina é sua queima para produção de calor e energia, porém, seu potencial de aplicações é diverso devido à sua complexidade estrutural, sendo alvo de estudos para a produção de compostos de alto valor agregado (CHIO *et al.*, 2019).

As porções celulósicas e hemicelulósicas são constituídas por carboidratos e, por sua vez, podem ser decompostas e utilizadas como fonte de carbono para diversos bioprocessos. A celulose é um homopolímero composto única e exclusivamente por monômeros de glicose unidos linearmente entre si através de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ (ZHANG *et al.*, 2012). A hemicelulose, por sua vez, tem uma estrutura ramificada, mais complexa, e composição diversa dentre as diferentes espécies vegetais, sendo que, na cana-de-açúcar, é composta por diferentes monossacarídeos como xilose, arabinose, manose, glicose, galactose, além de ácido glicurônico e ácido galacturônico. De forma simplificada, sua estrutura contém longas cadeias de xilana, que são polímeros lineares compostos por monômeros de xilose unidos por ligações $\beta(1-4)$ e, ao seu redor, ramificações diversas e heterogêneas dos outros constituintes. Devido à presença da xilana, o principal monossacarídeo que compõem a hemicelulose é a pentose xilose (ARO *et al.*, 2005; JEFFRIES, 2006; GÍRIO *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012). Apesar de ser rica em carboidratos, essas porções da biomassa vegetal estão inacessíveis à grande maioria dos organismos devido à sua estrutura extremamente recalcitrante, sendo necessário desestruturar e decompor seus constituintes, através de etapas de pré-tratamento e hidrólise, para que essas fontes de carbono possam ser utilizadas em bioprocessos (**Figura 1**) (DEN *et al.*, 2018).

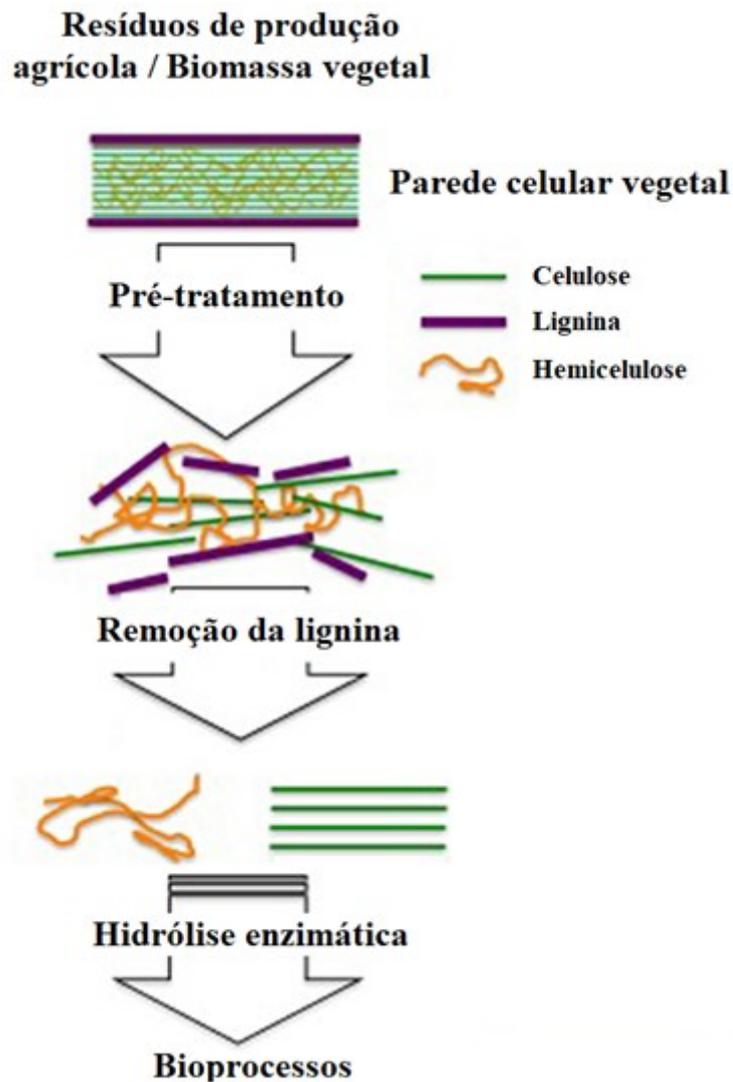
A etapa inicial, que visa a desestruturação dos componentes da parede celular vegetal, é chamada de pré-tratamento. Existem vários tipos diferentes de pré-tratamentos (químicos, físicos e biológicos), podendo ser utilizados solventes orgânicos, líquidos iônicos, soluções ácidas ou alcalinas, explosão a vapor, tratamentos hidrotermais, emprego de micro-ondas, tratamentos biológicos usando fungos e/ou bactérias, ou diferentes combinações entre eles (REZANIA *et al.*, 2020).

Atualmente, as abordagens mais promissoras para serem utilizadas em larga escala na indústria (para produção de etanol 2G) são as termoquímicas que utilizam soluções alcalinas ou ácidas e explosão à vapor (TANG *et al.*, 2021). A ação físico-química do pré-tratamento acaba gerando subprodutos indesejáveis que atuam como inibidores das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise enzimática ou de inibidores microbianos que prejudicam a etapa de fermentação dos carboidratos liberados (JÖNSSON & MARTÍN, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2021).

O grau de solubilização e/ou hidrólise da porção celulósica, hemicelulósica e lignina da biomassa depende muito do tipo e intensidade do pré-tratamento utilizado

(LYND *et al.*, 2002). Uma das formas de pré-tratamento que podem ser destacadas é a que utiliza soluções alcalinas, que é um método eficiente na remoção de lignina sem que ocorra a perda de carboidratos. Essa técnica promove o aumento na área superficial tanto da celulose quanto da hemicelulose, deixando essas porções mais expostas à ação de enzimas hidrolíticas (KIM *et al.*, 2016).

Figura 1: Representação esquemática simplificada da biomassa lignocelulósica. Estrutura, composição (celulose, hemicelulose e lignina) e etapas necessárias para que ela possa ser utilizada como matéria-prima em bioprocessos. Adaptado de Den *et al.*, 2018.



A utilização de enzimas (normalmente empregadas na forma de coquetéis enzimáticos) é a segunda etapa do processamento da biomassa e tem por objetivo a liberação dos açúcares que se pretende utilizar como substrato para os bioprocessos, ou seja, tanto a porção de pentoses (C5) quanto a de hexoses (C6).

Diversos fungos filamentosos são utilizados para produção das enzimas utilizadas nos coquetéis enzimáticos. Dentre elas, destacam-se linhagens de

Trichoderma spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Os fungos filamentosos dessas espécies são utilizados para esse fim em virtude da alta produção e secreção de enzimas (GUSAKOV, 2011; CHANDEL *et al.*, 2012; BISCHOF *et al.*, 2016; ADSUL *et al.*, 2020; ØSTBY *et al.*, 2020). A utilização de duas ou mais linhagens produtoras de enzimas é comum pois são raras as espécies/linhagens capazes de produzir todas as enzimas necessárias no coquetel em quantidades suficientes (ADSUL *et al.*, 2020).

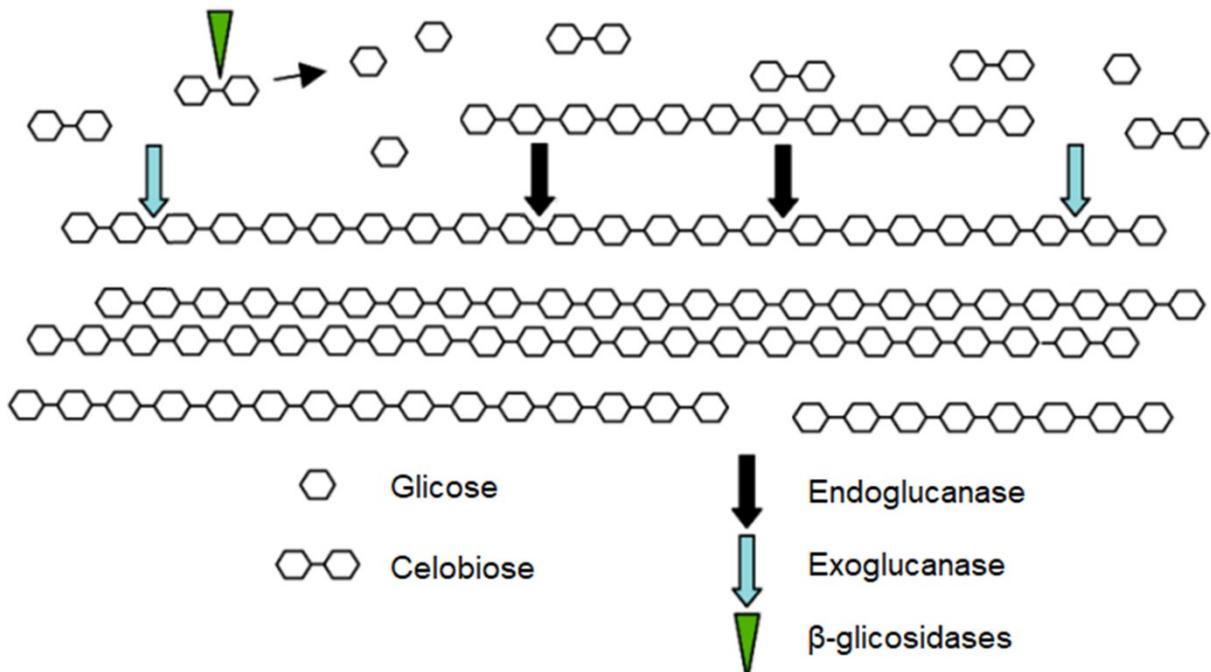
O processo de hidrólise enzimática é o mais custoso de todo o processamento da biomassa lignocelulósica (ADSUL & GOKHALE, 2012; JIN *et al.*, 2016; ADSUL *et al.*, 2020), com um custo variando de 0,23 a 2,00 dólares para cada galão (3,79 L) de etanol produzido, a depender dos microrganismos utilizados para produção do coquetel, dos substratos utilizados, do país onde o coquetel é produzido e do tipo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (JOHNSON, 2016; ADSUL *et al.*, 2020).

As enzimas responsáveis pela hidrólise da porção celulósica (**Figura 2**) são chamadas de “celulases” e são todas pertencentes ao grupo das glicosil-hidrolases – enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas (HENRISSAT & DAVIES, 1997). Esse grupo engloba: (1) endoglucanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas entre monômeros de glicose localizados na parte mais interna das longas cadeias de celulose, aumentando o número de extremidades livres do polissacarídeo; (2) exoglucanases (EC 3.2.1.176), que hidrolisam as ligações glicosídicas entre monômeros de glicose localizados na parte mais externa da celulose, produzindo majoritariamente dissacarídeos (celobiose); e (3) β -glicosidases (EC 3.2.1.21), normalmente presentes em maior abundância no coquetel enzimático quando comparada com as outras celulases, que são responsáveis pela hidrólise da celobiose e, conseqüentemente, pela liberação de moléculas de glicose (LYND *et al.*, 2002; XIAO *et al.*, 2004; MAKI *et al.*, 2009; DASHTBAN *et al.*, 2010; SINGHANIA *et al.*, 2013; SRIVASTAVA *et al.*, 2017). Dentre essas enzimas, as β -glicosidases são consideradas as limitantes no processo de hidrólise pois seu substrato (celobiose) é capaz de inibir significativamente a atividade das endo e exoglucanases. Além disso, a inibição pelo produto (glicose) costuma ser forte nessas enzimas (SHEWALE, 1982; XIAO *et al.*, 2004; MURPHY *et al.*, 2013). Isso demanda que os coquetéis enzimáticos possuam altas quantidades de β -glicosidases de alta eficiência e tolerantes à altas concentrações de glicose (SØRENSEN *et al.*, 2013; ØSTBY *et al.*, 2020), aumentando os custos do coquetel enzimático.

As enzimas que hidrolisam a porção hemicelulósica (**Figura 3**), por sua vez, são denominadas “hemicelulases” e, uma vez que a xilana é o maior constituinte da hemicelulose, sua hidrólise demanda a maior quantidade de enzimas no processo de sacarificação da hemicelulose. Essa hidrólise é realizada por endo-1,4- β -xilanas (EC 3.2.1.8) e por β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) (SWEENEY & XU, 2012). As endo-1,4- β -xilanas catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β (1-4) intramoleculares da xilana, gerando xilooligossacarídeos (POLIZELI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2015). Já as β -D-xilosidases são as hemicelulases empregadas em maior quantidade no coquetel enzimático e hidrolisam xilooligossacarídeos de cadeia

curta, preferencialmente xilobiose, liberando monômeros de xilose (POLIZELI *et al.*, 2005). Essas duas enzimas também são pertencentes ao grande grupo das glicosil-hidrolases, porém devido à maior complexidade presente na estrutura da hemicelulose, a diversidade de enzimas necessárias para sua hidrólise é maior, contando também com enzimas pertencentes ao grupo das carboidrato-esterases e das carboidrato-liases (HERPOEL-GIMBERT *et al.*, 2008; SIPOS *et al.*, 2009; CHUNDAWAT *et al.*, 2011; SWEENEY & XU, 2012). Dessa forma, as β -xilosidases são as enzimas que mais contribuem para o elevado preço do coquetel hemicelulósico devido a necessidade de altas concentrações de versões eficientes dessa enzima para diminuir a inibição que a xilobiose (seu substrato) causa sob as outras xilanases (ADELSBERGER *et al.*, 2004; JORDAN & WAGSCHAL, 2010).

Figura 2: Representação do processo de hidrólise enzimática da celulose. Destacados os sítios de ação das três glicosil-hidrolases: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, produzindo glicose livre. Adaptado de Aro *et al.*, 2005.

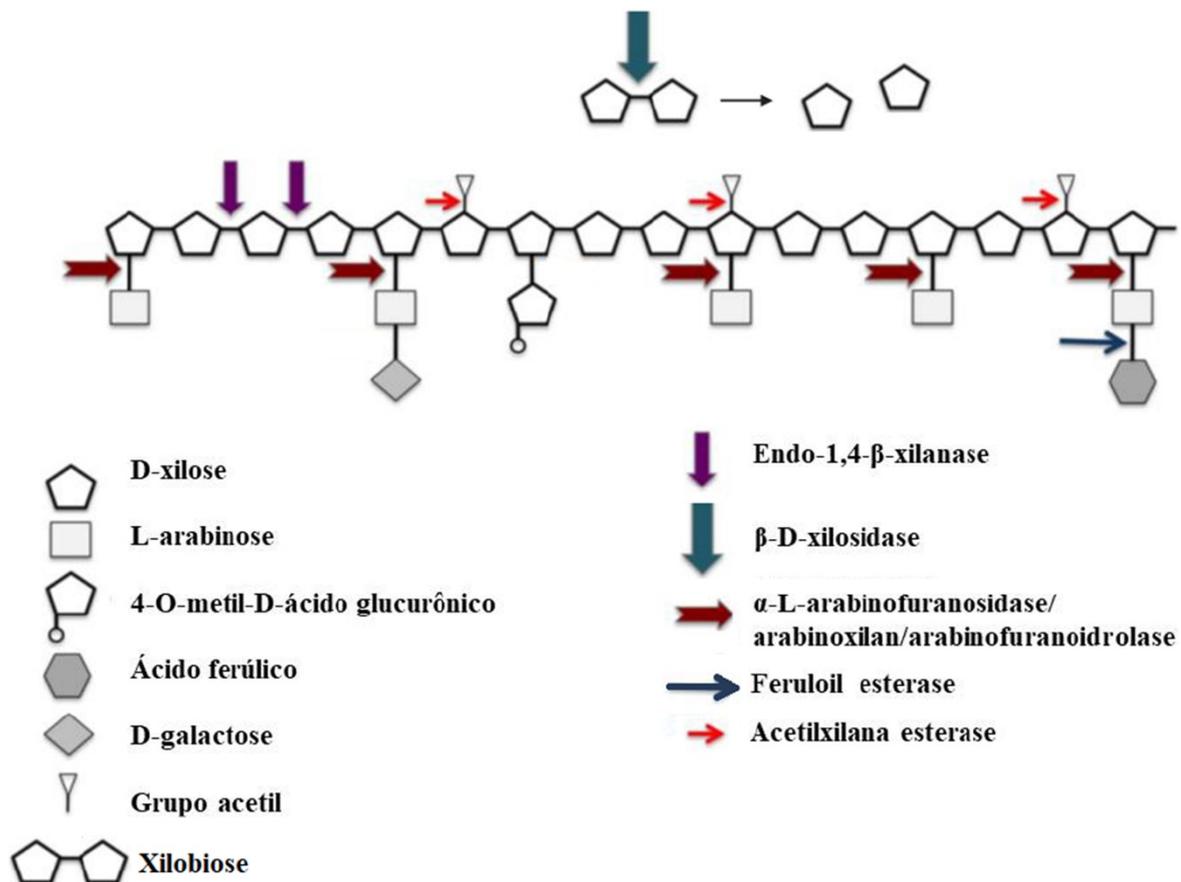


Na tentativa de diminuir ou anular a necessidade de se utilizar em coquetéis enzimáticos para hidrólise da biomassa lignocelulósica, tem-se buscado o desenvolvimento de linhagens que possibilitem o bioprocessamento Consolidado (CBP – do inglês *Consolidated Bioprocessing*), em que o uso comercial de coquetéis enzimáticos para sacarificação da biomassa lignocelulósica é completamente substituído pela utilização de leveduras que secretam todas as enzimas necessárias, permitindo que os processos de produção enzimática, hidrólise e fermentação dos substratos resultantes do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica sejam realizados na mesma etapa (OLSON *et al.*, 2012; SCHUSTER & CHINN, 2012).

Além de abolir a utilização de coquetéis enzimáticos para sacarificação dos substratos lignocelulósicos, o CBP permite o consumo imediato dos açúcares

liberados na hidrólise, mantendo uma concentração baixa dos mesmos, diminuindo inibições enzimáticas pelos produtos das hidrólises ao mesmo tempo que diminui problemas com contaminações (QING *et al.*, 2010; TEUGJAS & VÄLJAMÄE, 2013). Porém, como no CBP a sacarificação precisa ocorrer na mesma temperatura que a fermentação, em torno de 35° C, as enzimas lignocelulolíticas atuam em temperaturas muito inferiores à sua temperatura ótima, em torno de 55° C (CLAES *et al.*, 2020). Além disso, já foi descrito que a secreção de altos níveis de proteínas heterólogas pode fazer com que as leveduras entrem em estresse metabólico e percam produtividade (VAN RENSBURG *et al.*, 2012; KAFRI *et al.*, 2016).

Figura 3: Representação do processo de hidrólise enzimática da hemicelulose. Estão ilustrados os sítios de ação/hidrólise das enzimas: endo-1-4- β -xilanase (glicosil-hidrolase que atua dentro da cadeia de xilana), β -D-xilosidase (glicosil-hidrolase que atua na hidrólise de xilobiose e outros xilooligossacarídeos), α -L-arabinofuranosidase/arabinoxilana/arabinofuranoidrolase (glicosil-hidrolase que atua entre os resíduos laterais de L-arabinose e a xilana, desramificando-a), feruloil esterase (carboidrato esterase responsável pela liberação de ácido ferúlicos) e acetilxilana esterase (carboidrato esterase responsável pela liberação de grupos acetil ligados à xilana). Adaptado de De Souza *et al.*, (2013).



Apesar dos esforços para aumentar a competitividade econômica do etanol 2G produzido com resíduos da produção de cana-de-açúcar, diversos trabalhos têm apontado que a maneira mais viável de o fazer é de forma acoplada à produção de etanol 1G (DIAS *et al.* 2012; ERDEI *et al.* 2013; LOSORDO *et al.* 2016). Como é

típico de tecnologias experimentais, essa combinação entre as formas de produção (etanol 1G e 2G) pode acontecer de diversas maneiras, porém, as que prometem maiores rendimentos são justamente aquelas em que a fermentação das porções C5 e C6 ocorre simultaneamente (DIAS *et al.* 2013; LOSORDO *et al.* 2016). Inclusive, têm-se proposto que, no Brasil, a integração entre a produção de etanol 1G e 2G, em que o hidrolisado lignocelulósico é enriquecido com melação de cana-de-açúcar (rico em sacarose), seria uma melhor forma de produção, com melhores resultados econômicos (DIAS *et al.*, 2012, BERMEJO *et al.*, 2020). Assim sendo, tem-se buscado o desenvolvimento de organismos que consigam fermentar de forma eficiente tanto hexoses quanto pentoses presentes em hidrolisados lignocelulósicos (GRAY *et al.*, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 2016).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo majoritariamente empregado para a produção de etanol, seja combustível ou para bebidas. Essa espécie é extremamente útil não apenas no âmbito industrial, mas também no mundo científico, sendo amplamente utilizada como modelo de estudo em diversas áreas das ciências biológicas por ser um modelo celular eucarioto de fácil manipulação e com diversas ferramentas bioquímicas, moleculares e celulares disponíveis (DUINA *et al.*, 2014). Os motivos para sua utilização na indústria incluem sua robustez frente às condições fermentativas industriais, como o baixo pH, elevadas concentrações de etanol e ambiente hipertônico, além de ser um organismo *Crabtree* positivo, fermentando mesmo na presença de oxigênio (LANDRY *et al.*, 2006; MERICCO *et al.*, 2007; STAMBUK, 2019). Além disso, *S. cerevisiae* apresenta alta produtividade de etanol, resultado de milênios de seleções sucessivas em tanques fermentativos (DELLA-BIANCA *et al.*, 2014).

Contudo, linhagens naturais dessa levedura não conseguem metabolizar eficientemente pentoses, como a xilose (segundo monossacarídeo em concentração no hidrolisado lignocelulósico), uma vez que não expressam as enzimas necessárias para sua metabolização (BATT *et al.*, 1986; PITKÄNEN *et al.*, 2003; PATIÑO *et al.*, 2019). Sendo assim, tem-se buscado em outros organismos genes que permitam a utilização eficiente dos carboidratos resultantes da hidrólise da biomassa lignocelulósica (KUYPER *et al.*, 2003; JEFFRIES, 2006; BRAT *et al.*, 2009; LEANDRO *et al.*, 2009; MADHAVAN *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2010) e favorecer economicamente a produção de etanol 2G.

Para que um organismo consiga metabolizar xilose, é necessário que o mesmo tenha capacidade de isomerizar essa pentose em xilulose, posteriormente fosforilado-a em xilulose-5-fosfato, que, por sua vez, é um intermediário da via das pentoses fosfato (VPF). A D-xilose pode ser isomerizada diretamente a D-xilulose através da ação da enzima xilose isomerase (XI, codificada normalmente pelo gene *XylA*) (ZHOU *et al.*, 2012; KWAK & JIN, 2017). Alternativamente, a D-xilose pode ser inicialmente reduzida à D-xilitol pela ação da xilose redutase (XR, codificada pelo gene *XYL1*), oxidando NADH a NAD⁺ ou, preferencialmente, NADPH a NADP⁺, em sequência, o D-xilitol é oxidado à D-xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase (XDH, codificado pelo gene *XYL2*), reduzindo-se um NAD⁺ à NADH no processo (JEFFRIES, 2006; PENG *et al.*, 2012). Independente da via utilizada, a

D-xilulose precisa ser fosforilada a D-xilulose-5-fosfato, um intermediário da VPF, pela ação da enzima xilucinaase (XK, codificada pelo gene *XYL3* ou *XKS1*).

Nas leveduras que metabolizam xilose, as vias predominantes são a oxirredutora (LEE, 1998; JEPPSSON et al., 2003; KARHUMAA et al., 2007; MATSUSHIKA et al., 2008; KWAK & JIN, 2017; MILESSI et al., 2018; CUNHA et al., 2019; NIU et al., 2019; MOURO et al., 2020; SILVA et al., 2021), caracterizada por estudos em leveduras não convencionais, como espécies pertencentes aos gêneros *Blastobotrys*, *Candida*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, dentre outros (SCHNEIDER et al., 1981; 1983; JEFFRIES, 1981; DEBUS et al., 1983; DU PREEZ et al., 1983; HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; TAVARES et al., 2000; SÁNCHEZ et al., 2002; GÁRDONYI et al., 2003; STAMBUK et al., 2003; NGUYEN et al., 2006; CADETE et al., 2009, 2012, 2013; FERREIRA et al., 2011; BARRETTO et al., 2018; LOPES et al., 2018; BARROS et al., 2021). Embora eficientes no consumo de xilose, essas leveduras geralmente enfrentam limitações de tolerância ao etanol, pressão osmótica e pH baixo, exigindo condições controladas de oxigenação para uma fermentação eficaz (LANDRY, et al., 2006; SLININGER et al., 2014; KWAK et al., 2017).

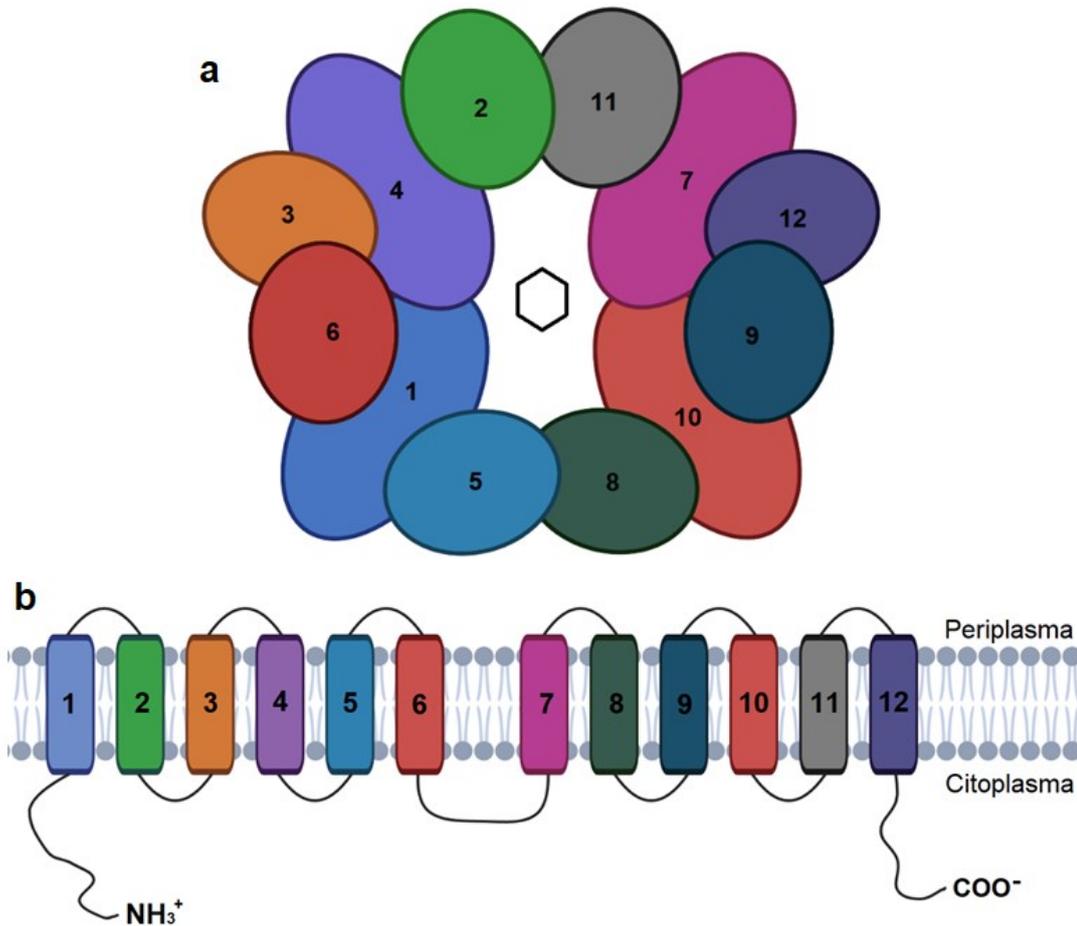
Para superar esses desafios, tem havido esforços para desenvolver linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que expressam as vias oxirredutora ou isomérica, sobreexpressando xilucinaase. Estudos comparativos revelaram que linhagens expressando a via XR/XDH demonstraram um melhor consumo de xilose e produção de etanol em comparação com a via XI, apesar de desafios, como o desequilíbrio dos cofatores NADPH e NAD⁺ (BETTIGA et al., 2008). Outros estudos também contrastaram o desempenho das vias, mostrando resultados variados. Enquanto a via XR/XDH se mostrou mais produtiva, a via XI gerou maiores rendimentos em algumas situações (LI et al., 2016b). Recentemente, pesquisas apontaram que a expressão simultânea de ambas as vias pode oferecer um melhor desempenho em meios contendo inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos (CUNHA et al., 2019).

Para que a metabolização de xilose (ou qualquer outro monossacarídeo) ocorra, além das vias metabólicas intracelulares é necessário que o açúcar consiga atravessar a membrana plasmática e acessar o interior da célula. Esse processo ocorre mediado por proteínas integrais de membrana, os transportadores (ou permeases), que permitem o transporte para o citosol de duas maneiras distintas: (1) passivamente, de acordo com o gradiente de concentração, denominada difusão facilitada, ou (2) de forma ativa, através de co-transporte com próton (H⁺-simporte), utilizando o gradiente eletroquímico de H⁺ para realizar o transporte do açúcar, mesmo contra o gradiente de concentração (WEUSTHUIS et al., 1994; STAMBUK et al., 1996; HORÁK, 1997). Apesar de *S. cerevisiae* não conseguir metabolizar xilose, essa espécie possui capacidade de internalizar essa pentose utilizando alguns de seus transportadores de hexoses (*HXT1* a *HXT17* e *GAL2*) endógenos (SEDLAK & HO, 2004; GONÇALVES et al., 2014). Isso ocorre mediado por permeases que tem atividade preferencial por glicose, frutose ou galactose, porém são relativamente promíscuas e permitem o transporte de xilose, porém, com uma afinidade muito

menor (KOTTER & CIRIACY, 1993; LEE *et al.*, 2002; SUBTIL & BOLES, 2012, GONÇALVES *et al.*, 2014; PATIÑO *et al.*, 2019).

Esses transportadores, assim como o restante dos transportadores de açúcares de *S. cerevisiae*, são membros da mesma família de proteínas, denominada *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Dentre as características comuns à essas permeases, destacam-se a presença de doze segmentos transmembranares (TMs 1-12), que formam estruturas secundárias do tipo α -hélice, ricas em resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. Também estão presentes regiões citoplasmáticas amino-terminal (N-terminal) e carboxi-terminal (C-terminal) (HENDERSON, 1993; PAO *et al.*, 1998; SAIER, 2000). Apesar da escassa quantidade de dados tridimensionais disponível sobre essas permeases, em especial das oriundas de eucariotos (KASAHARA & KASAHARA, 2003; KASAHARA *et al.*, 2004), de acordo com modelagens de transportadores de bactérias, acredita-se que eles tenham estruturas semelhantes ao ilustrado na **Figura 4**, com os 12 TMs se organizando espacialmente de modo a formarem um poro dinâmico que atravessa a bicamada lipídica que compõem a membrana plasmática. O poro em si é estruturado de modo que apenas os TMs 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 e 11 participem da interação com o substrato (**Figura 4a**). Como ilustrado na **Figura 4b**, as regiões N- e C-terminais são longas e voltadas ao citoplasma, e o *loop* que liga o TM-6 ao TM-7 também é citoplasmático e mais longo do que o restante dos *loops* entre os outros TMs (SORGEN *et al.*, 2002; ABRAMSON *et al.*, 2003; TRICHEZ, 2012).

Figura 4: Representação gráfica simplificada de transportadores de açúcares da superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*), com seus 12 segmentos transmembranares (TMs 1-12) em α -hélice. (a) Posição relativa dos 12 TMs para a formação do poro dinâmico pelo qual o substrato (hexágono central) será transportado. (b) Distribuição dos 12 TMs (estruturas secundárias em α -hélices hidrofóbicas) na membrana plasmática da célula, ligados entre si por porções (ou *loops*) hidrofílicos e com regiões amino-terminal e carboxi-terminal voltadas ao citoplasma. Adaptado de Sorgen *et al.* (2002); Abramson *et al.* (2003) e Trichez (2012).



Guan & Kaback (2006) e de Mirza e colaboradores (2006), trabalhando com a permease LacY, de *Escherichia coli*, propuseram que o transportador sofre modificações conformacionais quando entra em contato com lactose e H^+ (seus substratos), o que permite o transporte. De modo geral, essa permease possui duas conformações possíveis e intercambiáveis. Uma seria aberta ao meio extracelular, em que o poro contendo os sítios de interação com o açúcar e com o H^+ ficam acessíveis para interação com os substratos presentes no lado de fora da célula e, após contato com os substratos, os sítios de interação no interior do poro promovem a alteração na estrutura do transportador, fechando-o para a face externa ao mesmo tempo que abre o poro para o meio intracelular, liberando tanto açúcar quanto H^+ no citoplasma.

A menor afinidade que a maioria dos transportadores testados apresenta por xilose, quando em comparação com glicose, que levando a um co-consumo desses monossacarídeos de forma sequencial, com a xilose sendo consumida apenas quando a glicose foi depletada. Essa característica faz com que a etapa de transporte de xilose seja um dos principais desafios da produção de etanol 2G

utilizando *S. cerevisiae* (YOUNG *et al.*, 2010; HA *et al.*, 2011). Visando superar estas limitações, diversos pesquisadores caracterizaram transportadores de xilose de outras espécies de leveduras. Alguns exemplos são: Leandro e colaboradores (2006), que identificaram o transportador GXF1 e GXS1, de *Candida intermedia*, o primeiro sendo um transportador que promove difusão facilitada de glicose e xilose, com baixa afinidade e alta capacidade para xilose, e o segundo sendo um transportador que promove co-transporte de xilose ou glicose com H⁺, com alta afinidade; Du e colaboradores (2010), que identificaram os transportadores An29-2 e An25, de *Neurospora crassa*, ambos com baixa atividade de transporte quando expressos em linhagens de *S. cerevisiae*; De Sales e colaboradores (2015), que identificaram os transportadores SsXUT1, SsQUP2 e SsHXT2.6 de *Sc. stipitis*, todos permitindo crescimento de linhagem de *S. cerevisiae* deficiente nos transportadores de hexose (*hxt*-null) em meios contendo glicose e/ou xilose; Knoshaug e colaboradores (2015) identificaram os transportadores KmAXT1, de *Kluyveromyces marxianus*, e PgAXT1, de *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*, ambos com capacidade de transportar tanto arabinose quanto xilose. Os K_m para xilose desses transportadores são, respectivamente 27 mM e 65 mM; e Knychala e colaboradores (2021), identificaram os transportadores SpXUT1 e SaXUT1 de *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*, respectivamente, que, quando modificados para ter maior estabilidade na membrana plasmática, permitiram consumo, crescimento e fermentação em meios contendo glicose ou xilose. Um problema comum de transportadores de xilose heterólogos expressos em *S. cerevisiae* é que os mesmos se mostram inespecíficos ou ineficientes, inclusive sempre transportando preferencialmente a glicose (DU *et al.*, 2010; RUNQUIST *et al.*, 2010; YOUNG *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2013).

A expressão heteróloga de transportadores em *S. cerevisiae* que visam o melhor consumo de xilose também enfrenta problemas relacionados à regulação da manutenção dos transportadores na membrana plasmática, sendo que alguns resíduos de lisina, localizados na porção citoplasmática da permease, podem servir como sítios de ubiquitinação e posterior endocitose e degradação vacuolar da proteína (STAMBUK, 2002; HORÁK, 2003).

Já foi demonstrado que a inativação por glicose envolve etapas de alterações pós-traducionais nas porções citoplasmáticas de permeases que transportam outras fontes de carbono. Essas modificações são do tipo fosforilação e ubiquitinação e promovem a endocitose das proteínas integrais de membrana e sua posterior degradação (HORÁK & WOLF, 1997; PAIVA *et al.*, 2002). A ubiquitina se liga covalentemente às porções citoplasmáticas do transportador que será endocitado. Essas ligações ocorrem entre a extremidade C-terminal da ubiquitina e cadeias laterais de resíduos de lisina específicos no transportador (LIN *et al.*, 2008; BECUWE *et al.*, 2012). Esse processo de ubiquitinação pode ocorrer de duas formas. (1) Por meio da ação direta da proteína ubiquitina ligase Rsp5 sobre a proteína a ser ubiquitinada (FINLEY *et al.*, 2012) ou (2) com α -arrestinas agindo como intermediárias na interação entre a Rsp5 e a proteína que deve ser ubiquitinada (LÉON & HAGUENAUER-TSAPIS, 2009; LIN *et al.*, 2008).

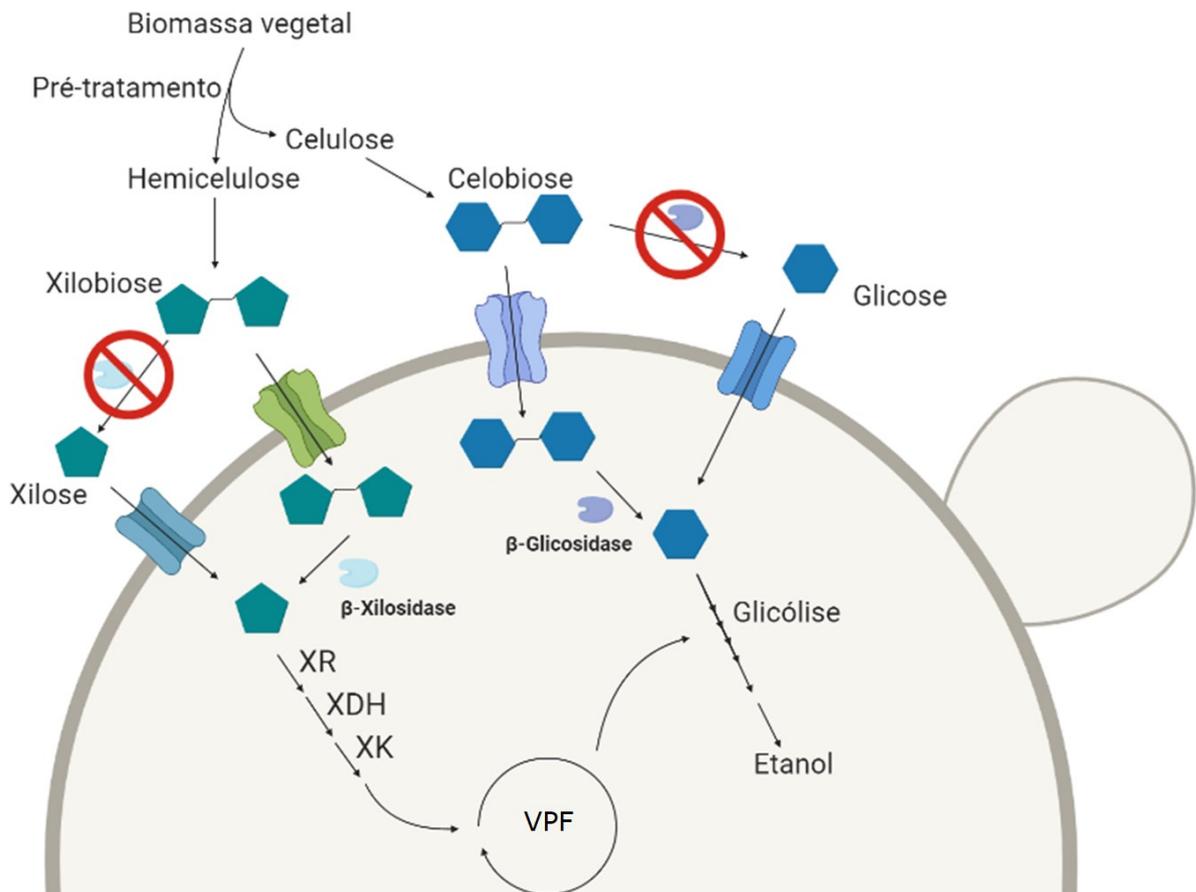
A Rsp5 é uma proteína com papel abrangente na endocitose de diversas proteínas integrais de membrana de *S. cerevisiae* (FINLEY *et al.*, 2012; NIKKO & PELHAM, 2009), através do reconhecimento e ligação específica de seu domínio conservado WW com o motivo PPXY na proteína que deve ser ubiquitinada (DUNN & HICKE, 2001; GAJEWSKA *et al.*, 2001). Entretanto, muitas proteínas de membrana (como transportadores de açúcares) não possuem o motivo PPXY, sendo necessário que α -arrestinas ajam como intermediárias (LÉON & HAGUENAUER-TSAPIS, 2009; LIN *et al.*, 2008).

Leveduras possuem ao total 14 α -arrestinas, cada qual sendo responsável pelo recrutamento da Rsp5 para ubiquitinação de um grupo específico de proteínas integrais de membrana (LAUWERS *et al.*, 2010). Dentre essas, é proposto que as α -arrestinas Art4 (codificada pelo gene *ROD1*), Art7 (codificada pelo gene *ROG3*) e Art8 (codificada pelo gene *Csr2*) sejam responsáveis pelo recrutamento da Rsp5 e posterior ubiquitinação de transportadores de açúcares. Já foi descrito que a Art4 é necessária para ubiquitinação e endocitose da permease Hxt6 (NIKKO & PELHAM, 2009; LLOPIS-TORREGROSA *et al.*, 2016) e das permeases Hxt1 e Hxt3 (O'DONNELL *et al.*, 2015). A Art7 também é necessária para endocitose do Hxt3 (O'DONNELL *et al.*, 2015). A Art8 é necessária para endocitose do Hxt6 e Hxt7 (HOVSEPIAN *et al.*, 2017). Além disso, transportadores heterólogos expressos em *S. cerevisiae* já foram descritos como sendo endocitados em processos que envolvem α -arrestinas, como o caso dos transportadores de CDT-1 e CDT-2 de *N. crassa*, que são endocitados em processos envolvendo a Art4 e Art7, respectivamente (SEN, *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos já se propuseram a remover os resíduos de lisina passíveis de ubiquitinação presentes nas regiões N- e C-terminais de transportadores e, como resultado, as linhagens contendo as permeases modificadas foram mais estáveis na membrana e demonstraram uma melhora na capacidade de consumo dos açúcares, quando em comparação com as linhagens que expressavam as versões não modificadas dos transportadores (ROY *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016b; SEN *et al.*, 2016; NIJLAND *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2021; KNYCHALA *et al.*, 2022).

Outra estratégia que visa contornar os problemas de transporte de xilose por *S. cerevisiae* (principalmente quando glicose está presente no meio) é, como ilustrado na **Figura 5**, o desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* aptas a transportar celobiose (e/ou xilobiose) e hidrolisá-la(s) intracelularmente. Dessa forma, o problema do consumo sequencial de glicose e xilose (devido à competição desses monossacarídeos pelos transportadores) seria contornado, aumentando os rendimentos de etanol. Essa estratégia também permitiria diminuir os custos de hidrólise da biomassa lignocelulósica, uma vez que seria desnecessária a adição de β -glicosidases e β -xilosidases nos coquetéis enzimáticos (HA *et al.*, 2011; VINUSELVI & LEE, 2011, 2012). Linhagens expressando β -glicosidases e/ou β -xilosidases extracelulares já foram desenvolvidas e permitem o consumo dos dois dissacarídeos em questão (FUJII *et al.*, 2011; GURGU *et al.*, 2011), porém, os problemas decorrentes da presença (simultânea ou não) de glicose e xilose no meio extracelular permanecem.

Figura 5: Estratégia de co-fermentação de celobiose com xilose ou de xilobiose e glicose, evitando o consumo sequencial dos açúcares. Através da não adição de β -glicosidases e β -xilosidases no coquetel de hidrólise enzimática, aumenta-se a concentração de celobiose e xilobiose (respectivamente) no meio fermentativo e, através da expressão intracelular de enzimas β -glicosidase ou β -xilosidase e de transportadores com capacidade de internalizar celobiose e xilobiose, com formação intracelular de glicose e xilose. Através da expressão da via heteróloga de oxirredução de xilose – xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), além da expressão da xilucinase (XK) endógena, torna-se possível o consumo da xilose presente no meio intracelular. Fonte: autoria própria.



Para superar essas barreiras, alguns trabalhos expressando via intracelular de hidrólise de celobiose já demonstraram que essa estratégia é promissora. São duas as vias de metabolização intracelular de celobiose: a via hidrolítica, através da expressão de um transportador de celobiose e uma β -glicosidase intracelular; e uma via fosforolítica, através da expressão de um transportador de celobiose e uma celobiose-fosforilase intracelular. Na via hidrolítica, cada molécula de celobiose internalizada é hidrolisada, formando duas moléculas de glicose pela ação da β -glicosidase intracelular. Em seguida, cada molécula de glicose é transformada em glicose-6-fosfato por ação de hexocinases, cada qual demandando uma molécula de ATP no processo, sendo necessárias duas moléculas de ATP ao todo. Já na via fosforolítica, ocorre a quebra da celobiose dentro da célula por ação de uma celobiose-fosforilase (EC 2.4.1.20), resultando em uma molécula de glicose e outra molécula de glicose-1-fosfato. A glicose-1-fosfato gerada é transformada em glicose-6-fosfato pela ação da fosfoglucomutase, sem a necessidade de utilizar ATP,

enquanto a glicose é convertida normalmente à glicose-6-fosfato por ação de hexocinases, gastando apenas uma molécula de ATP no processo. Isso resulta na economia de uma molécula de ATP quando comparado com a via hidrolítica (HA *et al.*, 2013a; KIM *et al.*, 2018).

Os pioneiros em expressar transportadores funcionais de celobiose em *S. cerevisiae* foram Galazka e colaboradores (2010) e Ha e colaboradores (2011), trabalhando com os transportadores CDT-1 e CDT-2 e uma β -glicosidase GH1-1 de *N. crassa*. Eles identificaram que ambos os transportadores têm alta afinidade para celobiose (com K_m em torno de 3-4 μ M), sendo que a velocidade máxima de transporte do CDT-1 é em torno de duas vezes superior do que a apresentada pelo CDT-2. Posteriormente esses transportadores foram analisados quanto ao tipo de transporte que realizam e se constatou que o transportador CDT-1 realiza simporte com H^+ , enquanto o CDT-2 promove difusão facilitada (KIM *et al.*, 2014).

Eriksen e colaboradores (2013) realizaram evoluções direcionadas em linhagens expressando uma β -glicosidase (GH1-1) e o transportador CDT-1, ambos de *N. crassa* e identificaram que as substituições C82S e D433G no transportador são capazes de aumentar em cerca de 60% a atividade de transporte de celobiose.

Yuan & Zhao (2013), também trabalhando com GH1-1 e CDT-1 de *N. crassa*, desenvolveram bibliotecas de promotores com intensidades regulando a expressão dos genes que codificam ambas as proteínas e, após ensaios evolutivos conseguiram identificar uma linhagem com taxa de consumo de celobiose seis vezes superior à linhagem parental, indicando que, para a regulação no nível de expressão dos genes que codificam a via de metabolização de celobiose, é importante otimizar a fermentação de celobiose. Também investigando níveis de expressão dos genes responsáveis pela internalização e hidrólise de celobiose em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, Oh e colaboradores (2016), após ensaios de engenharia evolutiva de linhagens contendo genes que codificam a enzima GH1-1 e o transportador CDT-1 de *N. crassa* integrados em seu genoma, identificaram que o aumento no número de cópias, além de sua proporção de 2:1 no genoma, são importantes para melhoria na fermentação de celobiose.

Utilizando a via fosforolítica, tanto o trabalho desenvolvido por Ha e colaboradores (2013a) quanto o desenvolvido por Kim e colaboradores (2018) utilizaram linhagens de *S. cerevisiae* expressando uma celobiose-fosforilase de *Saccharophagus degradans* junto de uma versão mutante do transportador CDT-1 de *N. crassa*. Ambos os trabalhos conseguiram níveis de produtividade e concentrações de etanol similares, porém de forma mais lenta quando comparados com os trabalhos utilizando a via hidrolítica.

Ao analisar o perfil transcricional de linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas em celobiose, Lin e colaboradores (2014) identificaram dois genes de interesse (*SUT1* e *HAP4*). Tanto a deleção do *HAP4* quanto a sobreexpressão *SUT1* levaram a aumentos em torno de 30% no consumo de celobiose das linhagens, indicando que a presença de celobiose é capaz de regular genes e afetar a fisiologia de *S. cerevisiae*. Também analisando o perfil metabólico de *S. cerevisiae* na presença de celobiose, Chomvong e colaboradores (2017) e Yun e colaboradores (2018)

identificaram o papel importante que a concentração de ATP possui no consumo de celobiose. Eles identificaram que o descompasso entre as formas de sinalização da presença de glicose intra e extracelular leva a alterações fisiológicas que resultam, dentre outros efeitos, na inatividade da ATPase de membrana. Essa enzima, que normalmente consome de 25% a 40% de todo o ATP produzido pela célula na presença de glicose, permanece inativa quando a célula está exposta exclusivamente à celobiose. Isso provavelmente contribui para os elevados níveis de ATP dentro da célula e a consequente diminuição na atividade da via glicolítica, observadas em células cultivadas em celobiose.

Visando o desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de consumir celobiose utilizando a via interna hidrolítica, Knychala (2017) identificou no genoma de *Spathaspora passalidarum* (NCBI:txid619300) – uma levedura isolada em intestino de besouros que se alimentam de madeira e já foi caracterizada como sendo capaz de consumir celobiose (Nguyen *et al.*, 2006) – a presença de dois genes com similaridade à β -glicosidase TtBG de *Thielavia terrestres* descrita por Bae e colaboradores (2014) e as nomeou *SpBGL1* e *SpBGL2*. Dos dois genes identificados, apenas o *SpBGL2* conseguiu ser corretamente amplificado e clonado para sobreexpressão em *S. cerevisiae*. A *SpBGL2* é uma β -glicosidase da família GH3. Enzimas dessa família comumente apresentam funcionalidade múltipla, sendo capazes de hidrolisar mais de um substrato (LEE *et al.*, 2003; MAYER *et al.*, 2006; MACDONALD *et al.*, 2015) e, por sua vez, a *SpBGL2* apresenta similaridade com a já descrita *KmBgli*, de *Kluyveromyces marxianus*, que já foi descrita possuindo atividade de hidrólise de *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*-N β X), que é uma molécula sintética análoga à xilobiose (YOSHIDA *et al.*, 2010), fazendo dessa enzima uma candidata promissora para se testar frente tanto à celobiose quanto à xilobiose.

Knychala (2017) também clonou e sobreexpressou em *S. cerevisiae* os genes *CtCBT1* de *Candida tropicalis* (NCBI:txid5482), *MgCBT2* de *M. guilliermondii* (NCBI:txid4929) e *HXT2.4* de *Scheffersomyces stipitis* (NCBI:txid4924), todas espécies descritas como sendo capazes de consumir celobiose (SCHLITZER & AHEARN, 1982; DU PREEZ *et al.*, 1986; FREER, 1991). Esses genes foram selecionados por possuírem similaridade tanto ao *CDT-1* quanto ao *CDT-2* de *Neurospora crassa* (NCBI:txid5141). Das linhagens desenvolvidas por Knychala (2017), todas que sobreexpressavam a β -glicosidase *SpBGL2* em conjunto de algum dos três transportadores citados foram capazes de crescer utilizando celobiose. Dessas, apenas aquela contendo o transportador *MgBGL2* foi capaz de produzir etanol.

Recentemente, Bermejo e colaboradores (2020) propuseram uma alternativa à produção de etanol exclusivamente 2G no Brasil, através da implementação da estratégia iSUCCELL. Essa estratégia consiste em integrar a produção de etanol 1G brasileiro com a produção de etanol 2G através da fermentação simultânea de substratos ricos em sacarose (porção 1G) com substratos lignocelulósicos parcialmente hidrolisados, ricos em celobiose (porção 2G), utilizando leveduras capazes de internalizar, hidrolisar intracelularmente e fermentar sacarose e celobiose.

A sacarose (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranoside) é ao mesmo tempo um α -glucosídeo e um β -frutosídeo, portanto ela pode ser hidrolisada tanto por β -D-frutosidasas, como a invertase (SUC2), como por α -D-glucosídases, como maltases (MALx2) (STAMBUK *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2005; BADOTTI *et al.*, 2008).

Normalmente, a fermentação de sacarose por *S. cerevisiae* inicia com a hidrólise extracelular realizada pela versão extracelular da enzima SUC2. Esse processo resulta na liberação de glicose e frutose no meio de cultivo que, em seguida são internalizadas pela célula através de um mecanismo de difusão facilitada proporcionada por transportadores específicos, como HXT1-17 e GAL2. A partir desse ponto, tanto glicose quanto frutose são fosforiladas e seguem a via glicolítica.

Alternativamente, a sacarose pode ser internalizada via permease AGT1, que promove co-transporte com H⁺, e hidrolisada pela versão intracelular da invertase (iSUC) ou por MALx2, liberando glicose e frutose já no meio intracelular (STAMBUK *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2005; BADOTTI *et al.*, 2008). Essa via de consumo é interessante pois, ao mesmo tempo que não depende da formação extracelular de glicose e frutose, que podem ser utilizadas por contaminantes (GORE *et al.*, 2009), o consumo de ATP decorrente do co-transporte com H⁺ é capaz de diminuir o crescimento celular e aumentar o consumo de açúcar, aumentando o rendimento de etanol produzido (BASSO *et al.*, 2011; GOMBERT & VAN MARIS, 2015; MÜLLER *et al.*, 2023).

Visando o desenvolvimento de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* capaz de consumir sacarose utilizando a via de internalização desse dissacarídeo, MÜLLER e colaboradores (2023) desenvolveram uma linhagem com deleção da enzima SUC2 e a sobreexpressão de sua versão intracelular (iSUC2), em conjunto da sobreexpressão da permease AGT1. Quando em meio fermentativo contendo sacarose, a linhagem resultante não produziu glicose extracelular e foi capaz de produzir aproximadamente 11% mais etanol quando comparada com a linhagem parental.

Uma vez desenvolvida a linhagem capaz de internalizar sacarose e fermentá-la, para que a estratégia iSUCCELL se torne efetiva, teoricamente seria necessário apenas a modificação dessa linhagem para que expresse a via de consumo de celobiose intracelular, com transportador que promova transporte eficiente desse dissacarídeo e β -glicosidase ativa intracelularmente.

Buscando o desenvolvimento de linhagens capazes de fermentar celobiose ao mesmo tempo que tornam possível a integração eficiente de etanol 1G com o 2G, o presente trabalho se propôs a dar continuidade aos trabalhos iniciados por Knychala (2017), através da caracterização das duas proteínas que permitiram os resultados de consumo de celobiose mais interessantes, a β -glicosidase SpBGL2 e o transportador MgCBT2, e do desenvolvimento de linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae* com capacidade de transporte e metabolização intracelular de celobiose, analisando seus desempenhos fermentativos em meios contendo substratos de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, tanto laboratoriais quanto industriais, capazes de transportar e hidrolisar intracelularmente celobiose visando diminuir os custos de obtenção do hidrolisado lignocelulósico e otimizar a produção de etanol de segunda geração.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as propriedades cinéticas de hidrólise de celobiose, *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-N β G) e *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*-N β X) pela enzima SpBGL2 expressa em *S. cerevisiae*;
- Analisar o transporte de pN β G e pN β X por *S. cerevisiae* expressando a enzima SpBGL2 e o transportador MgCBT2;
- Avaliar o crescimento e a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* expressando a enzima SpBGL2 e o transportador MgCBT2 em meios contendo celobiose;
- Desenvolver diferentes versões do transportador MgCBT2 sem lisinas nas extremidades amino- ou carboxi-terminal;
- Desenvolver estratégias para integrar no genoma de leveduras industriais a enzima SpBGL2 e o transportador MgCBT2
- Analisar a capacidade de crescimento e fermentação de celobiose, ou misturas de celobiose com sacarose, pelas linhagens industriais desenvolvidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS

O programa ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) foi utilizado para fazer alinhamento múltiplo entre diversas sequências de transportadores e, em seguida, o alinhamento foi utilizado para construir a árvore de similaridade entre os transportadores utilizando o programa MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>), através do método *Neighbour-Joining* com 1000 replicatas em bootstrap. Para busca de proteínas com as quais fazer correlações de similaridade com a permease MgCBT2, foi utilizada a ferramenta BLASTp da NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*).

As ferramentas utilizadas para prever quais seriam os possíveis domínios transmembrana (TMs) do transportador foram: PRALINE, com os métodos PSIPRED e HMMTOP, disponíveis no servidor IBIVU (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) (TUSNADY, 2001; SIMOSSIS *et al.*, 2005; PIROVANO *et al.*, 2008; PIROVANO & HERINGA, 2010); Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (KELLEY *et al.*, 2015); TMHMM - 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) (KROGH *et al.*, 2001); e SWISS-MODEL (BIASINI *et al.* 2014), utilizando a estrutura aberta para o lado interno do transportador XylE de *E. coli* (PDB ID: 4QIQ, WISEDCHAISRI *et al.* 2014) como molde.

Para predição dos resíduos de lisina que podem ser possíveis sítios de ubiquitinação nas regiões N- e C-terminais, utilizou-se o programa BDM-PUB (<http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php>) (LI *et al.*, 2009).

3.2. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES E FRAGMENTOS DE DNA

Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando técnicas padrão de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando as seguintes enzimas DNA polimerase: Sapphire (Takara) e/ou GoTaq[®] (Promega) para PCRs de confirmação, ou Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher) e/ou PrimeSTAR[®] GXL (Takara) para PCRs que serviriam para clonagens, sequenciamentos ou transformações, todas seguindo as especificações do fabricante.

Como DNA molde para as PCR, foram utilizados plasmídeos purificados, produtos de Gibson Assembly ou células lisadas por incubação à 99° C, em 20 mM de NaOH, por 10 min (PCR de colônia).

3.3. INICIADORES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Cada uma das reações de PCR foi conduzida utilizando iniciadores especificamente desenhados, sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*) (www.idtdna.com), listados na **Tabela 1**. Destaca-se aqui que ambos os iniciadores (*forward* – F e *reverse* - R) utilizados para clonagem das versões truncadas do

transportador apresentam sítios para as enzimas de restrição BamHI e HindIII, respectivamente, em suas extremidades 5' (devidamente destacadas na **Tabela 1**), para permitir a clonagem no plasmídeo de interesse. Os iniciadores utilizados para os sequenciamentos foram desenhados com o auxílio da ferramenta online de desenhos de iniciadores EUROFINS (<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/sequencing-primer-design/>). Os iniciadores utilizados para a técnica de *Gibson Assembly* foram desenhados com auxílio da ferramenta online NEBuilder® Assembly Tool (NEB – *New England Biolabs* - disponível em <https://nebuilder.neb.com/>).

Além dos plasmídeos contendo (1) o gene que codifica o transportador MgCBT2 e (2) o gene que codifica a enzima SpBGL2, desenvolvidos por Knychala (2017), o presente trabalho também utilizou e desenvolveu uma série de outros plasmídeos, conforme listado na **Tabela 2**. Destaca-se aqui o plasmídeo pMV, utilizado para facilitar as construções com os ensaios de *Gibson Assembly* e seleção em *E. coli*, que foi obtido através da empresa chinesa Qinglan Biotech.

3.4. CLONAGENS PARA SOBREXPRESSÃO COM PLASMÍDEOS

Para clonagem e sobreexpressão das versões modificadas do gene que codifica o transportador MgCBT2, o gene *MgCBT2* foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo p426-MgCBT2 (**Figura 6a**) utilizando-se os iniciadores MgCDT2.2-F e tMgCDT2_R para criar a versão do gene que codifica a permease truncada na região C-terminal e tMgCDT2_F e tMgCDT2_R para criar a versão que codifica a permease truncada nas regiões N- e C-terminal (**Tabela 1**), conforme ilustrado na **Figura 6b**, amplificando genes que mantêm o códon ATG que codifica o resíduo de metionina (M) inicial e o códon final TGA, para finalização da síntese proteica. Dessa forma, o gene que codifica o transportador truncado em C- não possui os pares de base que estão da posição 4 a 60 no gene original, resultando em uma proteína que não possui os 19 primeiros resíduos de aminoácido que se encontram após a metionina original. Já o gene que codifica o transportador truncado em N- e C-terminal, além de não possuir a mesma modificação descrita no gene que codifica o transportador truncado em C-terminal, não possui os últimos 36 pares de base codificantes encontrados no gene original, o que resulta em uma proteína que não possui os últimos 12 resíduos de aminoácidos e os primeiros 19 que se encontram após a metionina original.

Cada uma das versões dos genes amplificados, bem como o plasmídeo p426-GPD, foram então tratados com as enzimas de restrição previamente selecionadas (BamHI e HindIII - NEB), por 60 min a 37°C. Os resultados das digestões foram então purificados (*QIAquick PCR Purification Kit*) e em seguida incubados a 15° C por 16 h na presença de T4 DNA ligase e seu respectivo tampão (ThermoFisher). Dessa forma, os plasmídeos resultantes possuem uma das versões modificadas do gene, flanqueada pelo promotor *GPDp* e terminador *CYC1t*.

A descrição do processo de clonagem das porções de DNA responsáveis pela transcrição do RNA CRISPR (crRNA), que é a parte do RNA guia único (sgRNA – do

inglês *single guide RNA*) responsável pelo reconhecimento da sequência de DNA alvo utilizados nos sistemas CRISPR-Cas9, está descrita no tópico “3.6. SISTEMA CRISPR-Cas9”.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência ^a (5'-3')
Clonagem:	
MgCDT2.2-F	CAT ggatcc ATGGGTTTCCATTTCGTCTTC
tMgCDT2_F	CAT ggatcc ATGCACCAGGATATCGCTACTCA
tMgCDT2_R	TGA aagctt TCACGGAGTGGCAAGAATATGGA
sgRNA.ARS1309_F	/5Phos/GATCGCCTGTGGTGACTACGTATCCG
sgRNA.ARS1309_R	/5Phos/AAAACGGATACGTAGTCACCACAGGC
sgRNA.ARS208_F	/5Phos/GATCGGTCCGCTAAACAAAAGATCTG
sgRNA.ARS208_R	/5Phos/AAAACAGATCTTTTGTTTAGCGGACC
Gibson Assembly:	
ARS1309_F	AGGTTCTCATTCCCGTTGTT
Mg-01	ATCCCTGTGGTGACTACGTAATCATTATCAATACTCGCCA
Mg-02	TGGCGAGTATTGATAATGATTACGTAGTCACCACAGGGAT
Mg-03	GCTCGAAGGCTTTAATTTGCTCTACTACTCCATCGTAAAGCC
Mg-04	CTTTACGATGGAGTAGTAGAGCAAATTAAGCCTTCGAGC
ARS1309a_R	TTGTCAACCCTAGCTAAGCCA
ARS208_F	CCGCAGTGTCTTGCCTCTCTGATCTTACCTGGTGAATTGG
Sp-01	CACGTCCGCTAAACAAAAGAACCCAACCTTTGGCTGATAATA
Sp-02	TATTATCAGCCAAAGTTGGGTTCTTTTGTGTTAGCGGACGTG
Sp-03	ATCTAAGTTTTAATTACAAAATGACCGTGTCTGATTTCGA
Sp-04	TCGAAATCAGACACGGTCATTTTGAATTAATAACTTAGATTAGATT GCT
Sp-05	TCTTCTGGAAAGGTAATTAGATTGAATTGAATTGAAATCGATAGA
Sp-06	CGATTTCAATTCAATTCAATCTAATTACCTTTCCAGAAGAACT
Sp-07	TCATCCCACTTGCAACAAAAGCATTCTTAACTTGTAGTTTATG
Sp-08	CATAAACTACAAGTTTAGAAAATGCTTTTGTGCAAGTGGGATGA
ARS208_R	TTGGCAGTGACTCCGTCTCTAGTAGGTGCCAGTTGAATAG
pMV_F	AGAGACGGAGTCACTGCCAA
pMV_R	AGAGACGCAAGACACTGCCG
Sequenciamentos:	
seq.p1382.sgRNA_F	GCTGTAGAAGTGAAAGTTGG
seq.p1382.sgRNA_R	CAAGTTGATAACGGACTAGC
seq.ARS1309-Mg-1_F	TCTGCTTAATAGCTTCATACCG
seq.ARS1309-Mg-2_F	GGTGAACAGTTTATTCCTGGC
seq.MgCDT2-begin-R	TGAGTAGCGATATCCTGGTG
seq.ARS1309-Mg-3_F	CACCAGGATATCGCTACTCAAG
seq.ARS1309-Mg-4_F	TTTGTGTGCCAAGAATCCAAAG
seq.ARS1309-Mg-5_F	TTTACAACACCTGCTGGTACTTGG
seq.MgCDT2-F2	CAAGCCGCTTTGCCTGCTAT
seq.MgCDT2-R2	GCATGATGGTGGGGACGAAC
seq.ARS1309-Mg-6_F	TGGTCATTGCCATGACGGTTGC
seq.MgCDT2-end-F	TTTGGCGACGATCCGGATAC
seq.ARS1309-Mg-7_R	CCCTTTAACCTTTATTCTTGAGC
seq.ARS1309-Mg-8_R	ACATAGTTTAGTGACGCAATGC
seqARS209-B2-1_F	AGGGTTCTGTTACTTGTCCAG
seqARS209-B2-2_F	ACATATCACATAGGAAGCAACAGG
seqARS209-B2-3_R	GGGATTGGGTGTGATGTAAG
seqARS209-B2-4_F	CCGGTGTGTTGATGGGTGAAGAAG
seq_SpBGL2-1_F	CAAGGTACCGTCATGTCCGA
seqARS209-B2-5_F	TTGCTCTCCAATCCGGTATTC

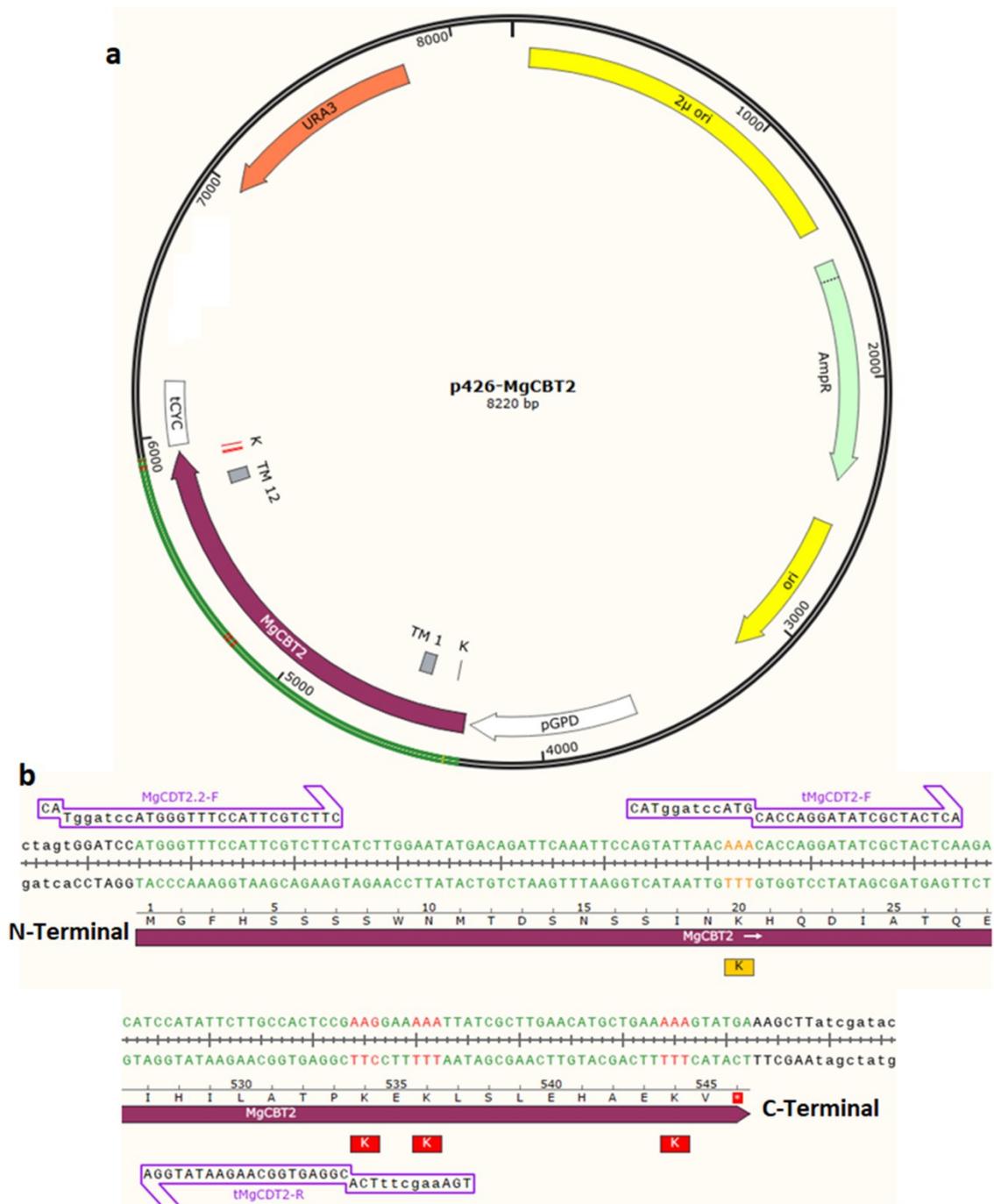
seq.SpBGL2-2_F	ACTTCACTCCTGAAGAATCA
seqARS209-B2-6_F	AGGTTAGAGTTGAATTTGGATCGG
seq.SpBGL2-3_R	CCACGGTATTAGGATTAGCT
seqARS209-B2-7_F	GTCCAAGTGTATATCTCCAAAGAC
seqARS209-B2-8_R	ATTGATCCTCTTGGGAAATGGG
seq.pAUR-AUR.beg_R	TGTAATGCACCCAGTCGCTTAAAG
seq.AurR.end_F	GATATCGAAAGTGTCCCTTTGTCC
seq.5'MCSpAUR_R	CCCGTGTATAAGATCATCCATCG
seq.5'MCSpAUR_F	TTTGCTTCCAACCTTTGGCGCATTG
seq.5'XKS1_F	GTGTTTCAGTAATTCAGAGACAGAC
seq.5'XKS1_R	TTTAGGTCCTGGTTAATGGCG
seq.meioXKS1_F	GGCAGATGCCTGTGGTATGAAC
seq.3'XKS1_F	TGGCATGTAATGGAAAGCATATCC
seq.3'XKS1_R	GGGACAATCTTGGGAATTATAGCG
seq.5'XYL2_F	ATGACTGCTAACCCCTTCCTTG
seq.5'XYL2_R	ATGGGCGTAGAAGTGGATGTCC
seq.3'XYL2_F	GACTTTGAACAATTGATCACCC
seq.3'XYL2_R	TTACTCAGGGCCGTCAATGAGAC
seq.3'XYL1_R	TAGACGAAGATAGGAATCTTGTCC
seq.3'XYL1_F	AAGTCCAACACTGTCCCAAG
seq.5'XYL1_R	GTTGGCGTAATCTTCGGCAC
seq.5'XYL1_F	GCCTTCTATTAAGTTGAACTCTGG
seq.3'MCSpAUR_R	TGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAG
Confirmações:	
GPD.2-F	CGGCCGAAATCATTATCAATACTCGCCATTTCC
CYC.2-R	CGGCCGAAAGCAAATTAAGCCTTCGAGC
pAUR-AurR-fim_F	ATTGGCTGCAGATTCAAACG
pAUR-XKS1-inicio_R	ACCTCTCTTGTCTGTCTCTG
XKS1-fim_F	CCAAGATTGTCCCCTTAAGC
XYL2-begin_R	GGCATCGTAAGTTTCGAACG
pAUR-XDH_F	CACCGTTTTCGCCATGAAGG
XYL1-meio_R	GCGAATTCGATCAATCTTGG

^aSequências em minúsculo e negrito correspondem aos sítios de restrição BamHI e HindIII.

Tabela 2: Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Descrição	Referência
Sobreexpressão:		
p426-GPD	<i>Amp^R ori URA3 GPDp-CYC1t</i>	ATCC® 87361™
p424-SpBGL2	<i>Amp^R ori TRP1 P_{GPD}-SpBGL2-T_{CYC1}</i>	KNYCHALA, 2017.
p426-MgCBT2	<i>Amp^R ori URA3 P_{GPD}-MgCBT2-T_{CYC1}</i>	KNYCHALA, 2017.
p426-tMgCBT2ΔC	<i>Amp^R ori URA3 P_{GPD}-tMgCBT2ΔC-T_{CYC1}</i>	Este trabalho.
p426-tMgCBT2ΔNΔC	<i>Amp^R ori URA3 P_{GPD}-tMgCBT2ΔNΔC-T_{CYC1}</i>	Este trabalho.
pAUR-XKXDHXR	<i>Amp^R ori AUR1-C [P_{PGK1}-ScXKS1-T_{PGK1}, P_{PGK1}-SsXYL2-T_{PGK1}, P_{ADH1}-SsXYL1-T_{ADH1}]</i>	MATSUSHIKA <i>et al.</i> , 2008.
Gibson Assembly:		
pMV-seq1	<i>Amp^R ori Sp.arb-Seq1opt.</i>	BGI
pMV	<i>Amp^R ori</i>	BGI
pMV-pTEF1-SpBGL2-tPGK1	<i>Amp^R ori [5'ARS208-P_{TEF1}-SpBGL2-T_{PGK1}-3'ARS208]</i>	Este trabalho.
Sistema CRISPR-Cas9:		
pV1382	<i>Amp^R ori CaNAT^R URA3 P_{TEF1}-CaCas9-T_{CYC1} P_{SNR52}-T_{SNR52}</i>	VYAS <i>et al.</i> , 2018.
pV1382-ARS208	<i>Amp^R ori CaNAT^R URA3 P_{TEF1}-CaCas9-T_{CYC1} P_{SNR52}-sgRNA(ARS208)-T_{SNR52}</i>	Este trabalho.
pV1382-ARS1309	<i>Amp^R ori CaNAT^R URA3 P_{TEF1}-CaCas9-T_{CYC1} P_{SNR52}-sgRNA(ARS1309)-T_{SNR52}</i>	Este trabalho.

Figura 6: Plasmídeo p426-MgCBT2 e iniciadores utilizados para truncagem do gene. **(a)** mapa do plasmídeo p426-MgCBT2 com o gene *MgCBT2*, salientando os resíduos de lisina (K) presentes nas porções N- e C- terminais do transportador, bem como as porções que codificam os TMs 1 e 12. Também estão visíveis o gene *URA3* e *AmpR*, para seleção de leveduras e bactérias transformantes, respectivamente, além da região em amarelo, 2 μ ori e ori, sendo as origens de replicação plasmidial de levedura e de bactéria, respectivamente. **(b)** Representações das porções inicial e final da região codificante do gene *MgCBT2* clonado no plasmídeo p426-MgCBT2 e respectivas sequências proteicas codificadas por ambas as regiões. Na porção inicial do gene, destacado em amarelo, encontra-se o único códon que codifica um resíduo de lisina (K). Na porção final do gene, destacados em vermelho, encontram-se os três códon que codificam K que foram preditos como possíveis sítios de ubiquitinação. Na imagem também é possível observar (localizados em paralelo aos seus sítios de anelamento) os iniciadores desenhados para amplificar as versões truncadas do transportador MgCBT2. Imagens construídas utilizando programa SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>).



3.5. LINHAGENS UTILIZADAS

Como plataforma para propagação de plasmídeos, foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH5 α (F' *endA1hsdR17* (rK-mK+) *glnV44* *thi-1* *recA1* *gyrA* (Nalr) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* Φ 80*dlac* Δ (*LacZ*) M15), não patogênica e propícia para métodos de biologia molecular (MESELSON & YUAN, 1968). As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas estão listadas na **Tabela 3**. Dessas, CEN.PK2-1C (ENTIAN & KÖTTER, 1998), MGD01 (DÁRIO, 2011), GMY08 (MÜLLER *et al.*, 2023) e MP-C5H1 (PEREIRA *et al.*, 2021) foram utilizadas como linhagens parentais para o desenvolvimento do trabalho.

A CEN.PK2-1C foi selecionada por ser uma linhagem laboratorial haploide amplamente utilizada em diversas linhas de pesquisa, possuindo facilidade de manipulação genética e auxotrofia à uracila, histidina, triptofano e leucina, permitindo a utilização de plasmídeos com seleção via auxotrofia para expressão de genes de interesse. Além disso, essa foi a mesma linhagem parental utilizada por Knychala (2017) para desenvolver a linhagem CENPK-B2-MgCBT2.

A linhagem MGD01, por sua vez, é derivada da CEN.PK2-1C, com o mesmo padrão auxotrófico, porém possui deleção da versão extracelular da enzima invertase e, portanto, não hidrolisando sacarose extracelularmente. Dario (2011) caracterizou a capacidade de consumo de sacarose dessa linhagem e identificou uma produtividade para etanol de aproximadamente 4,83 g L⁻¹ h⁻¹, com fator de rendimento de aproximadamente 0,38 g de etanol produzidos por g de sacarose consumida em meio fermentativo contendo aproximadamente 100 g L⁻¹ de sacarose. Essa característica é interessante pensando em futuramente integrar a produção de etanol 2G com a produção de etanol 1G brasileiro.

A linhagem GMY08 é uma linhagem derivada da levedura industrial CAT-1 (BASSO *et al.*, 2008), ótima fermentadora e isolada de usina alcooleira brasileira. A GMY08 também possui deleção da versão extracelular da enzima invertase e, além disso, possui sobreexpressão da versão intracelular dessa enzima e do transportador AGT1, o que confere à essa linhagem uma capacidade excepcional de fermentação de sacarose, apresentando uma produção de aproximadamente 11% mais etanol em relação à CAT-1, quando fermentando 200 g L⁻¹ de sacarose (MÜLLER, 2013; MÜLLER *et al.*, 2023), fazendo dessa, uma ótima candidata para o desenvolvimento de uma linhagem iSUCCELL robusta.

Já a linhagem MP-C5H1, também derivada da CAT-1, sofreu modificações voltadas à utilização de xilose, como a integração genômica da via oxirredutora de utilização de xilose (com sobreexpressão dos genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*), além da sobreexpressão do transportador endógeno HXT1, modificado de forma a não possuir seus 56 primeiros resíduos de aminoácidos, estando aí inclusos os resíduos de lisina (K) que podem sofrer ubiquitinação e permitir a endocitose do transportador. Já foi demonstrado que o conjunto dessas modificações realmente melhora o perfil fermentativo de xilose por essa linhagem (PEREIRA *et al.*, 2021).

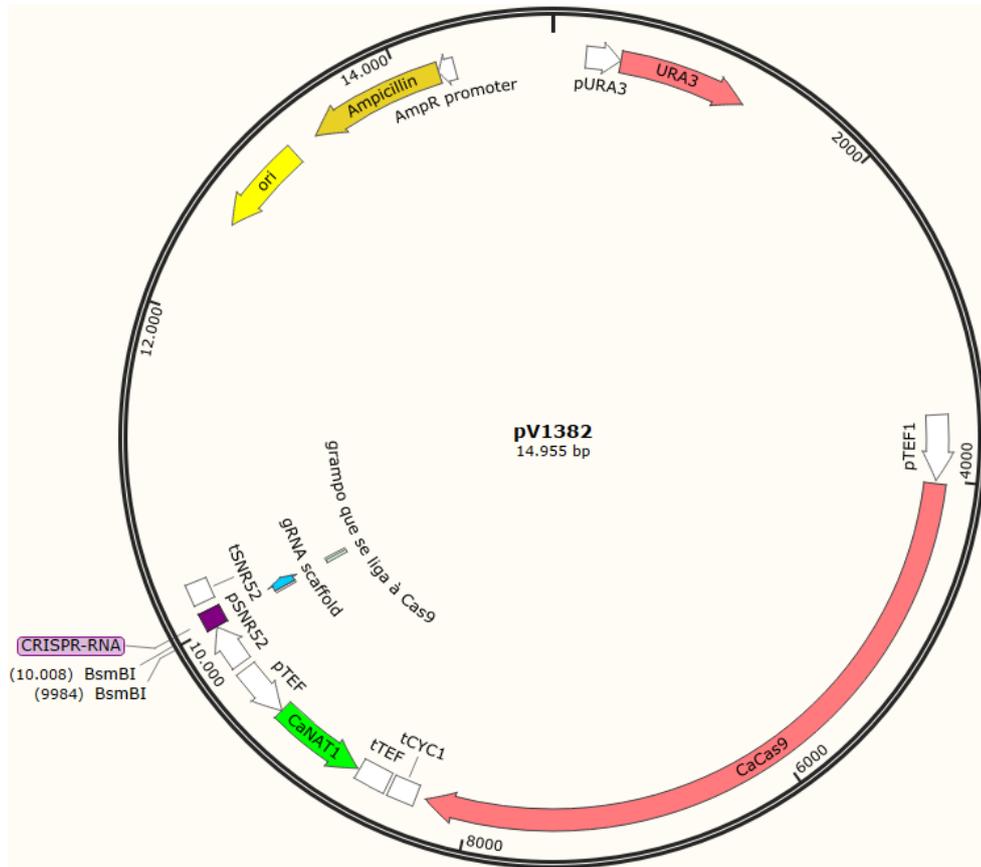
Tabela 3: Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, tanto laboratoriais quanto industriais, utilizadas.

LINHAGEM	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
Laboratoriais		
CEN.PK2-1C	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2	ENTIAN & KÖTTER, 1998.
CENPK-B2-MgCBT2	Isogênica à CEN.PK2-1C, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-MgCBT2	KNYCHALA, 2017.
CENPK-X-RDK	Isogênica à CEN.PK2-1C, mas AUR::pAUR-XKXDHXR::AUR	Este trabalho.
CENPK-X-B2	Isogênica à CENPK-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2	Este trabalho.
CENPK-X-Mg	Isogênica à CENPK-X-RDK, mas p426-GPD-MgCBT2	Este trabalho.
CENPK-X-B2-Mg	Isogênica à CENPK-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-MgCBT2	Este trabalho.
CENPK-X-B2-tMgΔC	Isogênica à CENPK-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-tMgCBT2ΔC	Este trabalho.
CENPK-X-B2-tMgΔNΔC	Isogênica à CENPK-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-tMgCBT2ΔNΔC	Este trabalho.
MGD-01	Isogênica à CEN.PK2-1C, mas suc2Δ::Kan ^R	DÁRIO, 2011.
MGD-B2-Mg	Isogênica à MGD-01, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-MgCBT2	Este trabalho.
MGD-X-RDK	Isogênica à MGD-01, mas AUR::pAUR-XKXDHXR::AUR	Este trabalho.
MGD-X-B2	Isogênica à MGD-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2	Este trabalho.
MGD-X-Mg	Isogênica à MGD-X-RDK, mas p426-GPD-MgCBT2	Este trabalho.
MGD-X-B2-Mg	Isogênica à MGD-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-MgCBT2	Este trabalho.
MGD-X-B2-tMgΔC	Isogênica à MGD-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-tMgCBT2ΔC	Este trabalho.
MGD-X-B2-tMgΔNΔC	Isogênica à MGD-X-RDK, mas p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-tMgCBT2ΔNΔC	Este trabalho.
Industriais		
CAT-1	Diplóide, isolada na Usina VO Catanduva, SP, 1998/1999	Este trabalho.
GMY08	Diplóide, isolada na Usina VO Catanduva, SP, 1998/1999	BASSO <i>et al.</i> , 2008.
GMY08	Isogênica à CAT-1, mas loxP-KanMX-loxP-P _{ADH1} ::iSUC2 / suc2::loxP-Ble ^r -loxP P _{GPD1} ::AGT1 / AGT1	MÜLLER <i>et al.</i> , 2023.
GMY-X-RDK	Isogênica à GMY08, mas AUR::pAUR-XKXDHXR::AUR	Este trabalho.
GMY-X-B2	Isogênica à GMY-X-RDK, mas ARS208a::P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1}	Este trabalho.
GMY-X-Mg	Isogênica à GMY-X-RDK, mas ARS1309a::P _{GPD1} -MgCBT2-T _{CYC1}	Este trabalho.
GMY-X-B2-Mg	Isogênica à GMY-X-RDK, mas ARS208a::P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1} e ARS1309a:: P _{GPD1} -MgCBT2-T _{CYC1}	Este trabalho.
GMY-X-B2-tMgΔC	Isogênica à GMY-X-RDK, mas ARS208a:: P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1} e ARS1309a:: P _{GPD1} -tMgCBT2ΔC-T _{CYC1}	Este trabalho.
GMY-X-B2-tMgΔNΔC	Isogênica à GMY-X-RDK, mas ARS208a:: P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1} e ARS1309a:: P _{GPD1} -tMgCBT2ΔNΔC-T _{CYC1}	Este trabalho.
MP-C5H1	Isogênica à CAT-1, mas AUR::pAUR-XKXDHXR::AUR loxP-KanMX-loxP-P _{ADH1} ::[4-59Δ]HXT1	PEREIRA <i>et al.</i> , 2021.
MPC5H1-B2	Isogênica à MP-C5H1, mas ARS208a:: P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1}	Este trabalho.
MPC5H1-Mg	Isogênica à MP-C5H1, mas ARS1309a:: P _{GPD1} -MgCBT2-T _{CYC1}	Este trabalho.
MPC5H1-B2-Mg	Isogênica à MP-C5H1, mas ARS208a:: P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1} e ARS1309a:: P _{GPD1} -MgCBT2-T _{CYC1}	Este trabalho.
MPC5H1-B2-tMgΔC	Isogênica à MP-C5H1, mas ARS208a:: P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1} e ARS1309a:: P _{GPD1} -tMgCBT2ΔC-T _{CYC1}	Este trabalho.
MPC5H1-B2-tMgΔNΔC	Isogênica à MP-C5H1, mas ARS208a:: P _{TEF1} -SpBGL2-T _{PGK1} e ARS1309a:: P _{GPD1} -tMgCBT2ΔNΔC-T _{CYC1}	Este trabalho.

3.6. SISTEMA CRISPR-Cas9

O plasmídeo pV1382 (**Figura 7**) foi utilizado para expressar o sistema CRISPR-Cas9 em *S. cerevisiae*, servindo como plataforma para as edições genômicas. Esse plasmídeo foi desenvolvido inicialmente como plataforma para edições genéticas em *Candida albicans* (VYAS *et al.*, 2015) e posteriormente modificado para servir como vetor-plataforma para modificações genômicas em *S. cerevisiae* com sistema CRISPR, com expressão constitutiva da Cas9 e do sgRNA, sob regência dos promotores TEF1p e SNR52p, respectivamente (VYAS *et al.*, 2018).

Figura 7: Mapa do plasmídeo pV1382, desenvolvido por Vyas e colaboradores, 2018. Em destaque (ordem horária, iniciando pela parte superior), encontra-se as regiões: (URA3) codificante do gene *URA3* sob influência de seu promotor; (CaCas9) codificante do gene *Cas9*, inicialmente desenvolvido para *C. albicans* e posteriormente otimizado para *S. cerevisiae*, sob influência do promotor *TEF1p* e do terminador *CYC1t*; (CaNAT1) codificante do gene *NAT1*, inicialmente desenvolvido para *C. albicans* (VYAS *et al.*, 2015) e posteriormente otimizado para *S. cerevisiae*, sob influência do promotor *TEF1p* e do terminador *TEF1t*, que garante resistência à nourseotricina; (CRISPR-RNA) que possui a sequência necessária para a produção do sgRNA, responsável por localizar o alvo do sistema CRISPR-Cas9, com o sítio para inserção da porção crRNA flanqueado por dois sítios de corte da enzima BsmBI, e sob influência do promotor *SNR52p* e terminador *SNR52t*; (ori) origem de replicação em bactéria, permitindo a propagação do plasmídeo em *E. coli*; e (Ampicillin) codificante do gene *AmpR* que garante resistência ao antibiótico ampicilina, para seleção em *E. coli*. Imagem construída utilizando programa SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>).



O vetor pV1382 é uma plataforma prática para utilização e direcionamento do sistema CRISPR-Cas9 em *S. cerevisiae*, promovendo a expressão constitutiva tanto da enzima Cas9 quanto do sgRNA para direcionar a enzima para o local de corte. Esse plasmídeo também possui uma região de clonagem da porção de DNA responsável pela transcrição do crRNA (responsável por direcionar o sistema para alvos desejados pelo pesquisador) que é flanqueada por sítios de restrição da endonuclease BsmBI (**Figura 8a**), permitindo a clonagem do fragmento de DNA, portanto, direcionando o sistema para o alvo genômico desejado de forma simples. Dado que o crRNA é pequeno, com apenas 20 pb, é possível encomendar a síntese do DNA desejado da mesma forma que se sintetizam oligonucleotídeos para serem utilizados como iniciadores em PCR, porém, suas extremidades 5' precisam ser fosforiladas para permitir a clonagem (**Figura 8b e c**).

Figura 8: Esquema de clonagem do crRNA no pV1382. **(a)** sítio de clonagem do fragmento de DNA que codifica a porção crRNA do sgRNA utilizado pelo sistema CRISPR-Cas9, no plasmídeo pV1382. As caixas cinzas destacam os sítios de reconhecimento da enzima BsmBI, enquanto, em vermelho, estão destacados os pontos de corte promovidos por ela. **(b)** par de oligonucleotídeos (fosforilados em suas extremidades 5') desenhados de forma a serem complementares entre si e, assim, formarem **(c)** uma fita dupla de DNA contendo os 20 pb que compõem a porção crRNA e extremidades livres complementares aos sítios digeridos pela enzima BsmBI no plasmídeo pV1382.



As regiões *ARS208a* e *ARS1309a* foram selecionadas para inserção dos módulos de sobreexpressão dos genes focos do presente trabalho. Essa seleção foi realizada tomando como base o trabalho realizado por Reider Apel e colaboradores (2017). Neste trabalho, as regiões *ARS208a* e *ARS1309a*, além de diversas outras, foram testadas quanto às eficiências de integração de genes (usando sistema

CRISPR-Cas9) e quanto à eficiência de expressão de genes integrados nessas regiões. Como analisado no trabalho, ambas as regiões selecionadas apresentaram eficiência de integração próxima à 100% e altos níveis de expressão relativa às demais regiões analisadas.

Após o sequenciamento de ambas as regiões de interesse presentes nos genomas das linhagens industriais GMY08 e MP-C5H1, conforme descrito em no item 3.11., identificou-se diversos polimorfismos entre as duas linhagens e se buscou por porções de 20 pb idênticas em ambas as linhagens (para servirem como sítio de reconhecimento do crRNA), que fossem seguidas por uma sequência motivo adjacente do protoespaçador (do inglês *protospacer adjacent motif* ou *PAM*) reconhecida pelo sistema CRISPR-Cas9 em questão (nesse caso: “NGG”). Para o sítio *ARS208a*, a sequência selecionada foi o sítio “GTCCGCTAAACAAAAGATCT”, seguida pela sequência *PAM* “TGG”, localizado aproximadamente 325 pb a montante do *locus ARS208a*. Para o sítio *ARS1309a*, a sequência selecionada foi a “CCTGTGGTGACTACGTATCC”, seguida pela sequência *PAM* “AGG”, localizada aproximadamente 180 pb a montante do *locus ARS1309a*.

Cada porção de DNA responsável pela transcrição do crRNA específico para cada sítio, foi clonada no pV1382 como descrito por Vyas e colaboradores (2018). Nesse processo, exemplificado na **Figura 8**, o vetor plataforma (pV1382) foi digerido com a enzima BsmBI e, em seguida, as extremidades 5' de cada fita de DNA do plasmídeo linearizado foram desfosforiladas com fosfatase alcalina (Quick CIP - NEB), e o produto foi purificado (*QIAquick PCR Purification Kit*). Para realizar a clonagem, o plasmídeo digerido e o par de oligonucleotídeos específicos (sgRNA.ARS1309_F e sgRNA.ARS1309_R para direcionar o sistema CRISPR-Cas9 para o local de interesse no *locus ARS1309* e sgRNA.ARS208_F e sgRNA.ARS208_R para o local de interesse no *locus ARS208* – **Tabela 1**) foram incubados a 15° C por 16 h na presença de T4 DNA ligase e respectivo tampão (ThermoFisher). Dessa forma, os plasmídeos resultantes continham as sequências de DNA (necessárias para as transcrições corretas dos sgRNA de interesse) clonadas corretamente no local desejado.

Depois de clonados, os plasmídeos resultantes foram sequenciados utilizando os iniciadores seq.p1382.sgRNA_F e seq.p1382.sgRNA_R (**Tabela 1**) para confirmar a correta inserção dos fragmentos de DNA.

3.7. GIBSON ASSEMBLY

Para unir os diferentes fragmentos de DNA amplificados por PCR foi realizado *Gibson Assembly*® utilizando o kit *NEBuilder*® *HiFi DNA Assembly* (NEB). Para cada reação de PCR foi utilizado um par de iniciadores (**Tabela 1**) contendo ao menos 20 pb na extremidade 3' que anelam no início (ou fim) da região que se pretende amplificar e, na extremidade 5', ao menos 20 nucleotídeos idênticos à extremidade da porção de DNA presente na outra molécula com a qual se pretende unir. Cada iniciador foi desenhado utilizando a plataforma/ferramenta *NEBuilder*® *Assembly Tool* (NEB – disponível em <https://nebuilder.neb.com/>).

Para construção do fragmento de reparo para inserção do gene que codifica cada uma das versões do transportador MgCBT2, foram necessários unir três fragmentos iniciais diferentes: (I) fragmento de DNA com 515 pb idênticos à região à montante do ponto de corte do sítio *ARS1309a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), amplificado com os iniciadores *ARS1309_F* e *Mg-02*; (II) fragmento de DNA contendo o promotor *GPDp*, a versão desejada do *MgCBT2* e o terminador *CYCt* (obtido por PCR utilizando os plasmídeos *p426-MgCBT2*, *p426-tMgCBT2ΔC* ou *p426-tMgCBT2ΔNΔC* como DNA molde), amplificado com os iniciadores *Mg-01* e *Mg-04*; e (III) fragmento de DNA com 624 pb idênticos à região à jusante do ponto de corte do sítio *ARS1309a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), amplificado com os iniciadores *Mg-03* e *ARS1309a_R*.

Dessa forma, os 20 últimos nucleotídeos do iniciador *Mg-01* são idênticos aos 20 últimos pb da região à montante do ponto de corte do sítio *ARS1309a*, e os 20 últimos nucleotídeos do iniciador *Mg-02* são idênticos aos 20 primeiros pb do promotor *GPDp*. Assim, os 40 últimos pb do fragmento I são idênticos aos 40 primeiros pb do fragmento II. De modo similar, os 20 últimos nucleotídeos do iniciador *Mg-03* são idênticos aos 20 primeiros pb da região a jusante do ponto de corte do sítio *ARS1309a*, e os 20 últimos nucleotídeos do iniciador *Mg-04* são idênticos aos 20 últimos pb do terminador *CYCt*. Assim, os 40 últimos pb do fragmento II são idênticos aos 40 primeiros pb do fragmento III.

Para formação do fragmento de reparo contendo o módulo de sobreexpressão do gene que codifica a enzima *SpBGL2*, optou-se pela construção circular da mesma, uma vez que a técnica de Gibson Assembly possui baixa eficiência na formação de uma molécula linear a partir de mais de três fragmentos distintos. Para circularização, foi utilizado o vetor *pMV* como molde para amplificação por PCR, utilizado os iniciadores *pMV_F* e *pMV_R* (**Tabela 1**), amplificando a porção contendo origem de replicação em *E. coli* e gene que confere resistência à ampicilina para seleção das transformantes. O fragmento de reparo foi construído unindo cinco fragmentos iniciais distintos: (I) fragmento de DNA com 695 pb idênticos à região à montante do ponto de corte do sítio *ARS208a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), amplificado com os iniciadores *ARS208_F* e *Sp-02*; (II) fragmento de DNA contendo os 608 pb imediatamente à montante da região codificante do gene *TEF1*, correspondentes à sua região promotora (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), amplificado com os iniciadores *Sp-01* e *Sp-04*; (III) fragmento de DNA contendo o gene *SpBGL2* (obtido por PCR utilizando o plasmídeo *p424-SpBGL2* como DNA molde), amplificado com os iniciadores *Sp-03* e *Sp-06*; (IV) fragmento de DNA contendo os 428 pb imediatamente à jusante da região codificante do gene *PGK1*, correspondentes à sua região terminadora (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), amplificado com os iniciadores *Sp-05* e *Sp-08*; e (V) fragmento de DNA com 742 pb idênticos à região à jusante do ponto de corte do sítio *ARS208a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), amplificado com os iniciadores *Sp-07* e *ARS208_R*.

Dessa forma, os 20 últimos nucleotídeos do iniciador ARS208_F são idênticos aos 20 últimos pb da região do pMV amplificada pelos iniciadores pMV_F e pMV_R, o que faz com que os 20 primeiros pb do fragmento I sejam idênticos aos 20 últimos pb do fragmento amplificado à partir do pMV. Os 20 últimos nucleotídeos do iniciador Sp-02 são idênticos aos 20 primeiros pb da região promotora *TEF1t*, o que faz com que os 40 últimos pb do fragmento I sejam idênticos aos 40 primeiros pb do fragmento II. Os 20 últimos nucleotídeos do iniciador Sp-04 são idênticos aos 20 primeiros pb da região codificadora do gene *SpBGL2*, o que faz com que os 40 últimos pb do fragmento II sejam idênticos aos 40 primeiros do fragmento III. Os últimos 20 nucleotídeos do iniciador Sp-05 são idênticos aos 20 últimos pb da região codificadora do gene *SpBGL2*, o que faz com que os 40 primeiros pb do fragmento IV sejam idênticos aos 40 últimos pb do fragmento III. Os 20 últimos nucleotídeos do iniciador Sp-07 são idênticos aos 20 últimos pb do terminador *PKGt*, fazendo com que os 40 primeiros pb do fragmento V sejam idênticos aos 40 últimos pb do fragmento IV. Os 20 últimos pb do iniciador ARS208_R são idênticos aos 20 primeiros pb do fragmento amplificado à partir do pMV, assim circularizando o fragmento contendo o fragmento de reparo que contém o módulo de sobreexpressão do gene *SpBGL2*.

Cada fragmento de PCR foi purificado utilizando o kit *QIAquick PCR Purification Kit* e, em seguida, incubados em conjunto a 50° C, por 60 min, na presença do reagente *NEBuilder® HiFi DNA Assembly* (NEB), composto por solução tampão e mix enzimático de exonuclease 5'-3', DNA-polimerase e DNA-ligase. Posteriormente, os produtos foram purificados (*QIAquick PCR Purification Kit*) e/ou transformados em *E. coli* DH5α e, através de seleção por ampicilina, colônias foram selecionadas para que seus plasmídeos pudessem ser confirmados quanto à correta construção.

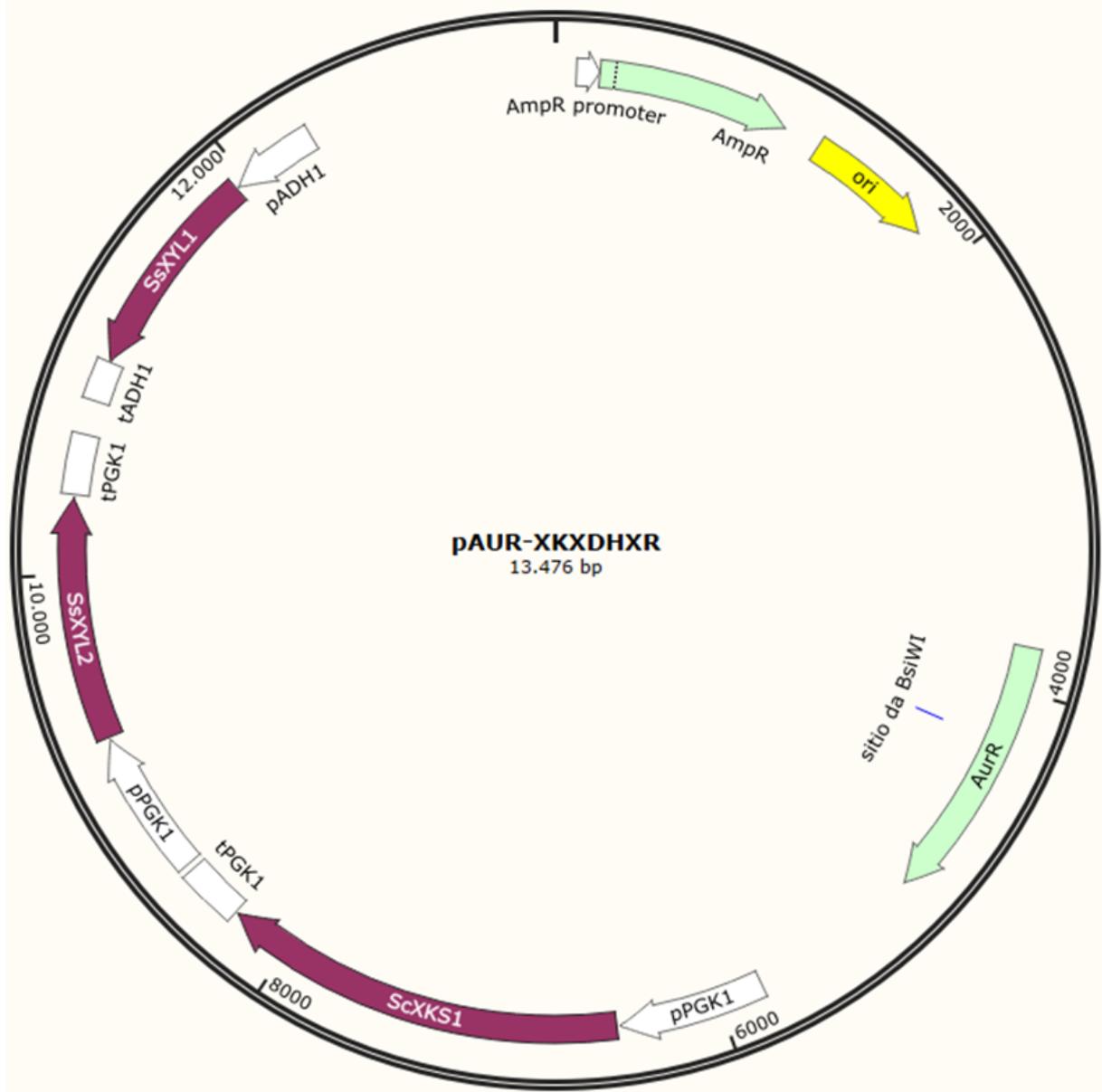
3.8. TRANSFORMAÇÕES

Para transformações das *E. coli* DH5α, foi utilizado o método de cloreto de cálcio, como descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001). Todas as bactérias transformadas foram selecionadas em meios contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina (Sigma-Aldrich). Todas as transformações de linhagens de leveduras foram realizadas utilizando o método de acetato de lítio, descrito por GIETZ & WOODS (2006). Para integração do plasmídeo pAUR-XKXDHXR (**Figura 9**, MATSUSHIKA *et al.*, 2008) no genoma das linhagens de levedura, se digeriu o mesmo utilizando a enzima de restrição BsiWI (NEB) e, em seguida, cerca de 1 µg do DNA produto da digestão foi utilizado para transformar as linhagens selecionadas. Como esse sítio de restrição fica localizado dentro do gene *AUR1-C*, o plasmídeo linearizado com a BsiWI consegue se integrar no *locus AUR1* de *S. cerevisiae* via recombinação homóloga. Esse processo torna as células que o integraram corretamente resistentes à aureobasedin A (Takara), o que permitiu sua seleção em meios contendo 0,5 mg L⁻¹ desse antibiótico, ao mesmo tempo que insere no genoma os genes necessários para a metabolização de xilose: *XYL1* (XR) e *XYL2* (XDH), de *Sc*.

stipitis, e *XKS1* (XK) de *S. cerevisiae*, todos sob regência de promotores fortes e constitutivos (**Figura 9**).

Para transformação das linhagens laboratoriais com os plasmídeos de sobreexpressão contendo versões do transportador MgCBT2 e/ou a enzima SpBGL2, aproximadamente 300 ng de cada plasmídeo foi utilizado para transformar as linhagens selecionadas. As células resultantes foram então selecionadas em meios deficientes em uracila, triptofano ou ambos, a depender do(s) plasmídeo(s) transformado(s).

Figura 9: Mapa do plasmídeo pAUR-XKXDHR (MATSUSHIKA *et al.*, 2008), utilizado para inserir a via oxirredutora para o metabolismo de xilose no *locus AUR1* de *S. cerevisiae*. Em destaque é possível identificar (interno ao gene *AurR*) o sítio de restrição da enzima BsiWI, utilizado para linearizar o plasmídeo, além das regiões onde se encontram os genes *ScXKS1*, de *S. cerevisiae*, *SsXYL2* e *SsXYL1*, ambos de *Sc. stipitis*, todos sob influencias de promotores fortes e constitutivos. Também estão visíveis o gene *AmpR*, para seleção de bactérias, além da região em amarelo (*ori*) sendo a origem de replicação de bactéria.



Para inserção genômica assistida por CRISPR-Cas9 dos módulos de sobreexpressão do *SpBGL2* ou o módulo de sobreexpressão de cada uma das versões do gene *MgCBT2* nas linhagens industriais, as transformações foram realizadas com: (1) aproximadamente 300 ng do plasmídeo derivado do pV1382, modificado para direcionar o sistema CRISPR-Cas9 ao sítio de interesse; e (2) cerca de 5 µg do módulo de reparo contendo o módulo de sobreexpressão de cada um dos genes de interesse (produtos do *Gibson Assembly*).

Tendo em vista que apenas as células que receberam o plasmídeo derivado do pV1382 possuem resistência à nourseotricina – cloNAT (WERNER BioAgents), as células resultantes foram selecionadas em meio contendo 100 mg L⁻¹ desse antibiótico.

3.9. PROPAGAÇÃO E EXTRAÇÕES DE PLASMÍDEOS

As linhagens de *E. coli* contendo os plasmídeos a serem propagados foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani), pH 7,0 e contendo 100 mg L⁻¹ de Ampicilina (Sigma-Aldrich), a 37° C e agitação de 180 rpm. A extração dos plasmídeos foi realizada pelo método manual “miniprep”, através do protocolo descrito por Green & Sambrook (2012) ou então através de kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN).

3.10. ANÁLISES DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Quando necessário, os fragmentos de DNA gerados por PCR e/ou digestões com enzimas de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de 1% agarose (Sigma-Aldrich) em tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) para que o perfil de migração pudesse ser observado. Foi adicionado brometo de etídio aos géis de forma suficiente para que a concentração final fosse de 2,5 µg L⁻¹. Foram também utilizados marcadores de tamanho molecular de DNA (New England Biolabs).

3.11. SEQUENCIAMENTOS

Para os sequenciamentos de DNA, o serviço de sequenciamento Sanger (Mix2Seq, da empresa Eurofins) foi utilizado, em que é necessário o fornecimento de uma amostra de DNA em conjunto de um iniciador específico para realizar o sequenciamento de Sanger.

Os sequenciamentos dos plasmídeos derivados do pV1382 foram realizados utilizando os iniciadores seq.p1382.sgRNA_F e seq.p1382.sgRNA_R e amostras purificadas (*QIAquick PCR Purification Kit*) dos plasmídeos em questão.

Os sequenciamentos das corretas construções dos módulos de sobreexpressão do gene *MgCBT2* e suas variantes foi realizado utilizando os iniciadores seq.ARS1309-Mg-1_F, seq.ARS1309-Mg-2_F, seq.MgCDT2-begin-R, seq.ARS1309-Mg-3_F, seq.ARS1309-Mg-4_F, seq.ARS1309-Mg-5_F, seq.MgCDT2-F2, seq.MgCDT2-R2, seq.ARS1309-Mg-6_F, seq.MgCDT2-end-F, seq.ARS1309-Mg-7_R e seq.ARS1309-Mg-8_R e ampliações por PCR do respectivo módulo, amplificadas utilizando os iniciadores seq.ARS1309-Mg-1_F e seq.ARS1309-Mg-8_R.

O sequenciamento da correta construção do módulo de sobreexpressão do gene *SpBGL2* foi realizado utilizando os iniciadores seqARS209-B2-1_F, seqARS209-B2-2_F, seqARS209-B2-3_R, seqARS209-B2-4_F, seq.SpBGL2-1_F, seqARS209-B2-5_F, seq.SpBGL2-2_F, seqARS209-B2-6_F, seq.SpBGL2-3_R, seqARS209-B2-7_F e seqARS209-B2-8_R e amostra purificada (*QIAquick PCR Purification Kit*) do plasmídeo pMV-pTEF1-SpBGL2-tPGK1, contendo o respectivo módulo de sobreexpressão.

Os sequenciamentos dos plasmídeos p426-MgCBT2, p426-tMgCBT2ΔC e p426-tMgCBT2ΔNΔC foram realizados utilizando os iniciadores seq.MgCDT2-begin-R, seq.MgCDT2-F2, seq.MgCDT2-R2, seq.MgCDT2-end-F, GPD.2-F e CYC.2-R e amostras purificadas (*QIAquick PCR Purification Kit*) dos plasmídeos em questão.

O sequenciamento do plasmídeo p424-SpBGL2 foi realizado utilizando os iniciadores seq.SpBGL2-1_F, seq.SpBGL2-2_F, seq.SpBGL2-3_R, GPD.2-F e CYC.2-R e amostras purificadas (*QIAquick PCR Purification Kit*) dos plasmídeos em questão.

Os sequenciamentos do plasmídeo contendo os genes que codificam as enzimas necessárias para a via de metabolização de xilose e das linhagens transformadas com esse plasmídeo foram realizados utilizando os iniciadores seq.pAUR-AUR.beg_R, seq.AurR.end_F, seq.5'MCSpAUR_R, seq.5'MCSpAUR_F, seq.5'XKS1_F, seq.5'XKS1_R, seq.meioXKS1_F, seq.3'XKS1_F, seq.3'XKS1_R, seq.5'XYL2_F, seq.5'XYL2_R, seq.3'XYL2_F, seq.3'XYL2_R, seq.3'XYL1_R, seq.3'XYL1_F, seq.5'XYL1_R, seq.5'XYL1_F e seq.3'MCSpAUR_R e amostras purificadas (*QIAquick PCR Purification Kit*) dos plasmídeos em questão ou ampliações do *locus AUR1* por PCR de colônia das linhagens CENPK-X-RDK, MGD-X-RDK, GMY-X-RDK e MP-C5H1.

O sequenciamento da região genômica cerca de 900 pb em torno do *locus ARS208a* foi realizado utilizando os iniciadores seqARS209-B2-1_F e seqARS209-B2-8_R e amplificação da região genômica em questão por PCR de colônia das linhagens GMY-X-RDK e MP-C5H1, utilizando o mesmo par de iniciadores.

O sequenciamento da região genômica cerca de 900 pb em torno do *locus ARS1309a* foi realizado utilizando os iniciadores seq.ARS1309-Mg-1_F e seq.ARS1309-Mg-8_R e amplificação da região genômica em questão por PCR de colônia das linhagens GMY-X-RDK e MP-C5H1, utilizando o mesmo par de iniciadores.

Todos os iniciadores citados estão listados na **Tabela 1**.

3.12. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As linhagens de *E. coli*, tanto a DH5α quanto as transformadas com os plasmídeos para propagação, foram crescidas em meio LB (Luria-Bertani), pH 7,0, contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina quando necessário. A temperatura de cultivo foi

de 37°C. Para cultivo sólido, adicionou-se 15 g L⁻¹ de ágar no meio. Os cultivos líquidos foram incubados sob agitação de 180 rpm.

Para o cultivo das linhagens de levedura, se utilizou tanto meio rico YP (composto por 10 g L⁻¹ de extrato de levedura e 20 g L⁻¹ de peptona) quanto meio sintético Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ (adaptado de Sen *et al.*, 2016), contendo 13,4 g L⁻¹ de bases nitrogenadas de levedura sem aminoácidos e 2,78 g L⁻¹ de suplemento *drop-out* (Sigma-Aldrich) sem uracila (URA⁻), sem triptofano (TRP⁻) ou sem ambos. A temperatura de cultivo foi de 30°C e o pH foi ajustado para 5,0. Para cultivo sólido, adicionou-se 20 g L⁻¹ de ágar no meio. Os cultivos líquidos foram incubados sob agitação de 180 rpm. Quando era necessário fazer seleção de transformantes ou manutenção de plasmídeos, os meios ricos foram suplementados com 0,5 mg L⁻¹ de Aureobasidina A (Takara-Bio) ou 100 mg L⁻¹ de Nourseotricina (cloNAT, WERNER BioAgents) e os meios sintéticos foram formulados de forma a serem deficientes em uracila e/ou triptofano. Todos os meios foram suplementados com 10, 20 ou 40 g L⁻¹ de fonte de carbono de interesse (glicose, celobiose ou celobiose e sacarose).

3.13. ENSAIOS DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO

Ao início de cada experimento, foram realizados inóculos em tubos de ensaio contendo de 3 mL de meio líquido, e incubados de 12 a 48 h. Em seguida, alíquotas deste cultivo foram utilizadas para inocular 10 mL de meio, em Erlenmeyer de 50 mL, de forma que a concentração de células no frasco fosse de aproximadamente 0,026 g L⁻¹ (DO = 0,1 a 600 nm), e incubados de 12 a 48 h. A partir desses inóculos, as células foram colhidas para servirem de inóculo para o crescimento (realizados em volumes de 50 ou 100 mL, preenchendo 20% do volume total de frascos Erlenmeyer), de modo que esse iniciasse com uma concentração celular de aproximadamente 0,026 g L⁻¹. Todas as incubações foram realizadas a 30°C, sob agitação de 180 rpm durante o período de crescimento e, quando necessário, amostras foram retiradas para monitorar o crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol. Como forma de monitorar a densidade celular nos cultivos líquidos, as amostras coletadas dos mesmos foram diluídas com água destilada e lidas em espectrofotômetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies), utilizando comprimento de onda de 600 nm.

Para os ensaios fermentativos, as células colhidas durante a fase exponencial de crescimento foram lavadas, concentradas e transferidas para frascos de 25 mL contendo 20 mL de meio de cultivo, de modo a apresentarem aproximadamente 10 g L⁻¹ de massa celular seca. Os frascos foram mantidos a 30°C, sob agitação de 180 rpm, e amostras foram retiradas para monitorar o consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol.

O coeficiente de rendimento de conversão de substrato (celobiose) a produto (etanol) $Y_{E/S}$ foi obtido pela **Equação 1**.

$$Y_{E/S} = \frac{C_E \cdot V - C_{E0} \cdot V_0}{C_{S0} \cdot V_0 - C_S \cdot V}$$

(1)

onde:

“ $Y_{E/S}$ ” é o coeficiente de rendimento (g g^{-1});

“ C_E ” é a concentração de produto (g L^{-1});

“ C_S ” é a concentração de substrato (g L^{-1});

“ V ” é o volume (L) e;

o subscrito “0” é referente ao tempo inicial.

A velocidade de consumo de substrato (V) foi obtida pela **Equação 2**.

$$V = \left(\frac{\text{açúcar}_0 - \text{açúcar}_f}{t} \right) \quad (2)$$

onde:

“ V ” é a velocidade de consumo (g h^{-1});

“ açúcar_0 ” é a concentração inicial de açúcar (g L^{-1});

“ açúcar_f ” é a concentração final de açúcar (g L^{-1});

“ t ” é o tempo (h).

3.14. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS

Para determinar a concentração de açúcares e de etanol presentes nos cultivos líquidos, as amostras coletadas ao longo dos experimentos foram submetidas à CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – em inglês: *HPLC*) utilizando-se coluna para ácidos orgânicos Aminex HPX-87H (Biorad), fase móvel com 5 mM ácido sulfúrico, fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 30 min, temperatura da coluna de 30°C e detecção por índice de refração do cromatógrafo líquido (Shimadzu Prominence LC-20A - Shimadzu).

3.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os ensaios de atividade enzimática seguiram um protocolo utilizando células permeabilizadas, como descrito por Stambuk (1999). As células crescidas em cultivo líquido foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e gelada (4°C) e

concentradas para aproximadamente 2 g L^{-1} . Alíquotas de 1 mL dessa solução celular foram separadas em tubos eppendorf e lavadas com tampão 100 mM MOPS-NaOH, pH 6,8; e após o sobrenadante ser descartado, as células foram ressuspensas em $200 \text{ }\mu\text{L}$ do mesmo tampão contendo 20% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM ditioneitol, e adicionado $12 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de tolueno/etanol/10% triton X-100 em água (1:4:1; v/v). Os tubos foram vigorosamente agitados por 1 min e, em seguida, centrifugados (2600 g , 1 min); o sobrenadante foi descartado e as células permeabilizadas foram lavadas com tampão 100 mM MOPS-NaOH, pH 6,8, e ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão.

Para quantificar a atividade de hidrólise dos substratos, $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de células permeabilizadas (em concentrações que variaram de $\sim 0,1$ a $\sim 0,4 \text{ g L}^{-1}$, a depender do ensaio) foram adicionadas a $450 \text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão 100 mM MOPS-NaOH, pH 6,8, contendo a quantidade desejada de substrato, e imediatamente incubadas a 30°C por exatos 10 min . A reação foi interrompida colocando os tubos a 99°C por 3 min . Como controles foram utilizadas células pré-fervidas por 3 min . Como substratos foram utilizados três compostos: (1) *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-N β G), (2) *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*-N β X), ambos com concentração final variando de $0,05$ a 10 mM (a depender do experimento), e (3) celobiose, com concentração variando de 1 a 80 mM (a depender do experimento). Após a reação, as células foram centrifugadas (2600 g , 5 min) e o sobrenadante dos ensaios utilizando *p*-N β G e *p*-N β X foram utilizados para determinar a atividade enzimática através da concentração de *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise dos substratos, mensurada através da absorbância a 400 nm ($\Delta\epsilon = 7.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para determinar a atividade de hidrólise da celobiose, o sobrenadante dos ensaios foi utilizado para mensurar a concentração de glicose formada, através de kit comercial de glicose oxidase-peroxidase (GLICOSE PAP LIQUIFORM da Centerlab). As atividades são expressas em μM de substrato hidrolisado (g seca de célula) $^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos através de regressão não-linear aplicada sobre o modelo cinético de Michaelis–Menten, utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.

3.16. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE

Os ensaios de atividade de transporte seguiram um método colorimétrico como descrito por Hollatz & Stambuk (2001). As células foram removidas do cultivo líquido, lavadas duas vezes com água destilada estéril e gelada (4°C) e ressuspensas em tampão 50 mM succinato-Tris, pH 5,0 de forma que a concentração de células ficasse em torno de 30 g L^{-1} . Alíquotas de $50 \text{ }\mu\text{L}$ dessa solução celular foram separadas em tubos eppendorf e um volume de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de substrato no mesmo tampão foram adicionados. As células foram imediatamente incubadas a 30°C por exatos 10 min , durante os quais o substrato internalizado sofria hidrólise em função das atividades de β -glicosidase ou β -xilosidase intracelulares, e a reação foi interrompida colocando os tubos a 99°C por 3 min . Em

seguida, foram adicionados 200 μL de 2M NaHCO_3 . Como controles foram utilizadas células pré-fervidas por 3 min. Como substratos foram utilizados dois compostos: (1) *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-N β G), (2) *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*-N β X), ambos com concentração final de 5 mM. Após a parada da reação e adição de NaHCO_3 , as células foram centrifugadas (2600 *g*, 5 min) e o sobrenadante dos ensaios foram utilizados para determinar a concentração de *p*-nitrofenol liberado pelo transporte e hidrólise dos substratos, mensurada através da absorbância a 400 nm ($\Delta\epsilon = 7.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As atividades são expressas em μM de substrato hidrolisado (g seca de célula) $^{-1} \text{ min}^{-1}$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA SpBGL2

Para caracterizar a atividade da enzima SpBGL2 de *S. passalidarum* clonada por Knychala (2017), realizamos ensaios de hidrólise de três substratos pela enzima presente na linhagem CENPK-B2-MgCBT2 (**Tabela 3**). As células foram crescidas em meio rico (YP) contendo 20 g L⁻¹ de celobiose até que atingissem a fase exponencial. Em seguida, elas foram permeabilizadas, e a atividade de hidrólise de celobiose, *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (*p*-NβG), análogo à celobiose, ou *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (*p*-NβX), análogo à xilobiose, foi avaliada. Como pode ser observado na **Figura 10**, a β-glicosidase expressa pela linhagem CENPK-B2-MgCBT2 apresentou capacidade de hidrólise de todos os substratos testados, com V_{max} de 1.188, 5.368 e 1.088 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ e K_m de 18,160, 0,810 e 0,965 mM para celobiose, *p*-NβG e *p*-NβX, respectivamente (**Tabela 4**). Esses dados demonstram uma maior atividade de hidrólise de *p*-NβG pela enzima SpBGL2 expressa pela linhagem CENPK-B2-MgCBT2 quando comparado com os outros substratos.

Figura 10: Caracterização enzimática da enzima SpBGL2 expressa na linhagem CENPK-B2-MgCBT2. A capacidade de hidrolisar (a) 1 a 80 mM de celobiose, (b) 0,05 a 7 mM de *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (*p*-NβG) e (c) 0,05 a 5 mM de *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (*p*-NβX) foi realizada como descrito em Material e Métodos.

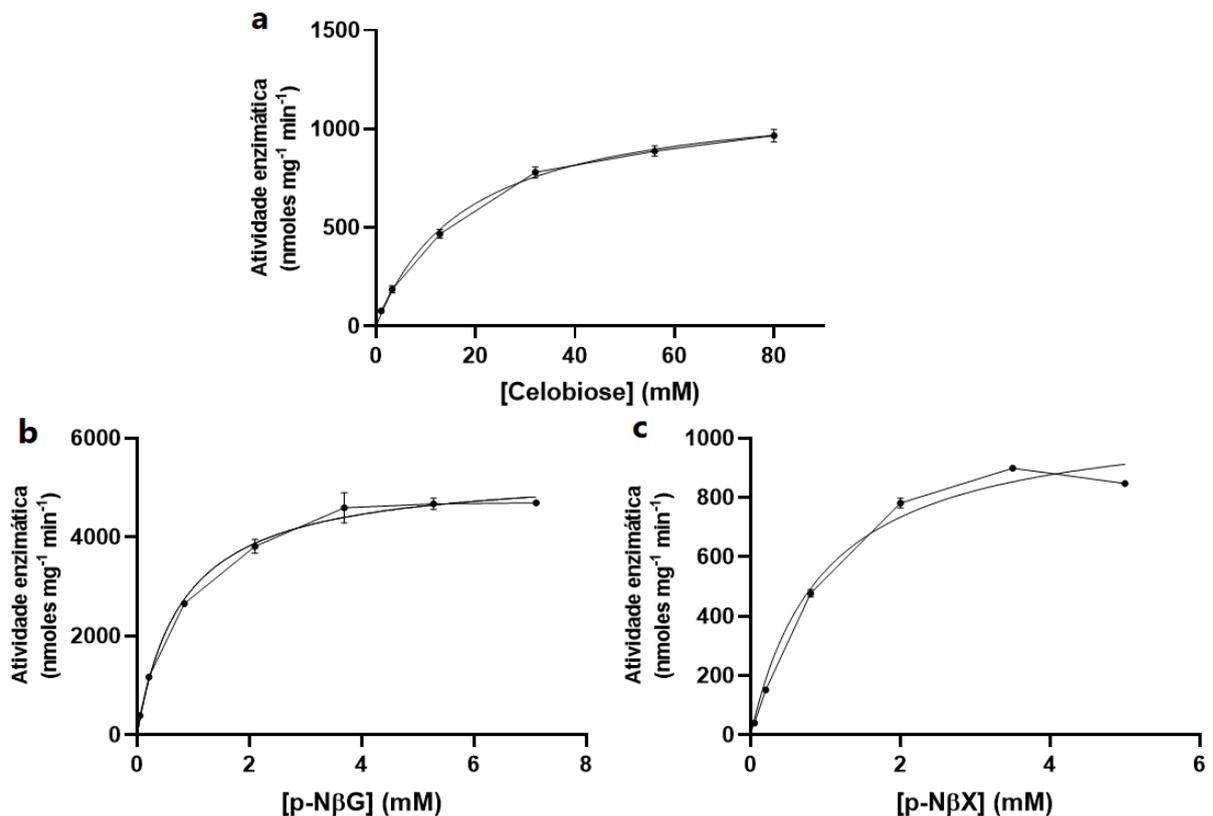


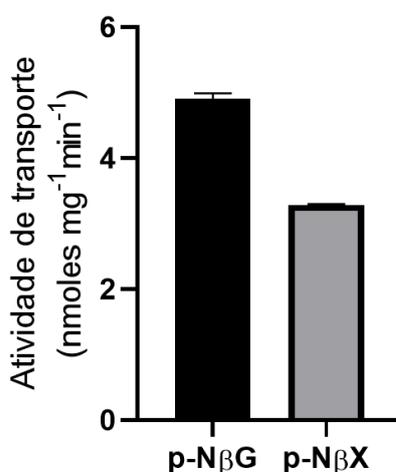
Tabela 4: Parâmetros cinéticos obtidos para a enzima SpBGL2 expressa na linhagem CENPK-B2-MgCBT2.

Substrato	V_{\max} (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	K_m (mM)
Celbiose	1.188 \pm 85	18,160 \pm 3,870
<i>p</i> -N β G	5.368 \pm 199	0,810 \pm 0,159
<i>p</i> -N β X	1.088 \pm 174,8	0,965 \pm 0,445

4.2. CARACTERIZAÇÃO COLORIMÉTRICA DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE β -GLUCOSÍDEOS PELA PERMEASE MgCBT2

Uma vez constatada a capacidade de hidrólise e parâmetros cinéticos da enzima SpBGL2, foi analisada a capacidade de transporte da permease MgCBT2, expressa na linhagem CENPK-B2-MgCBT2, usando um método colorimétrico com os substratos *p*-N β G e *p*-N β X, adaptado da metodologia proposta por Hollatz & Stambuk (2001) para a determinação colorimétrica do transporte de α -glucosídeos por leveduras. Para isso, a linhagem CENPK-B2-MgCBT2 foi crescida em meio rico (YP) contendo 20 g L⁻¹ de celbiose até que atingisse a fase exponencial e, em seguida as células foram avaliadas quanto à capacidade de transportar e hidrolisar 5 mM dos substratos sintéticos. Como pode ser observado na **Figura 11**, a linhagem expressando o transportador MgCBT2 e β -glicosidase SpBGL2 é capaz de internalizar e hidrolisar ambos os substratos, apresentando uma atividade de transporte maior para 5 mM do análogo à celbiose (*p*-N β G) em relação à 5 mM do análogo à xilbiose (*p*-N β X), com valores aproximados de 4,91 e 3,29 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente.

Figura 11: Atividade de transporte (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) de 5 mM dos substratos *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-N β G) e *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*-N β X) apresentada pela linhagem CENPK-B2-MgCBT2.



Ao comparar os resultados ilustrados nas **Figuras 10** e **11**, é possível constatar uma notável disparidade na produção de *p*-nitrofenol utilizando 5 mM de *p*-N β G como substrato. No contexto do ensaio de atividade de transporte, que utilizou

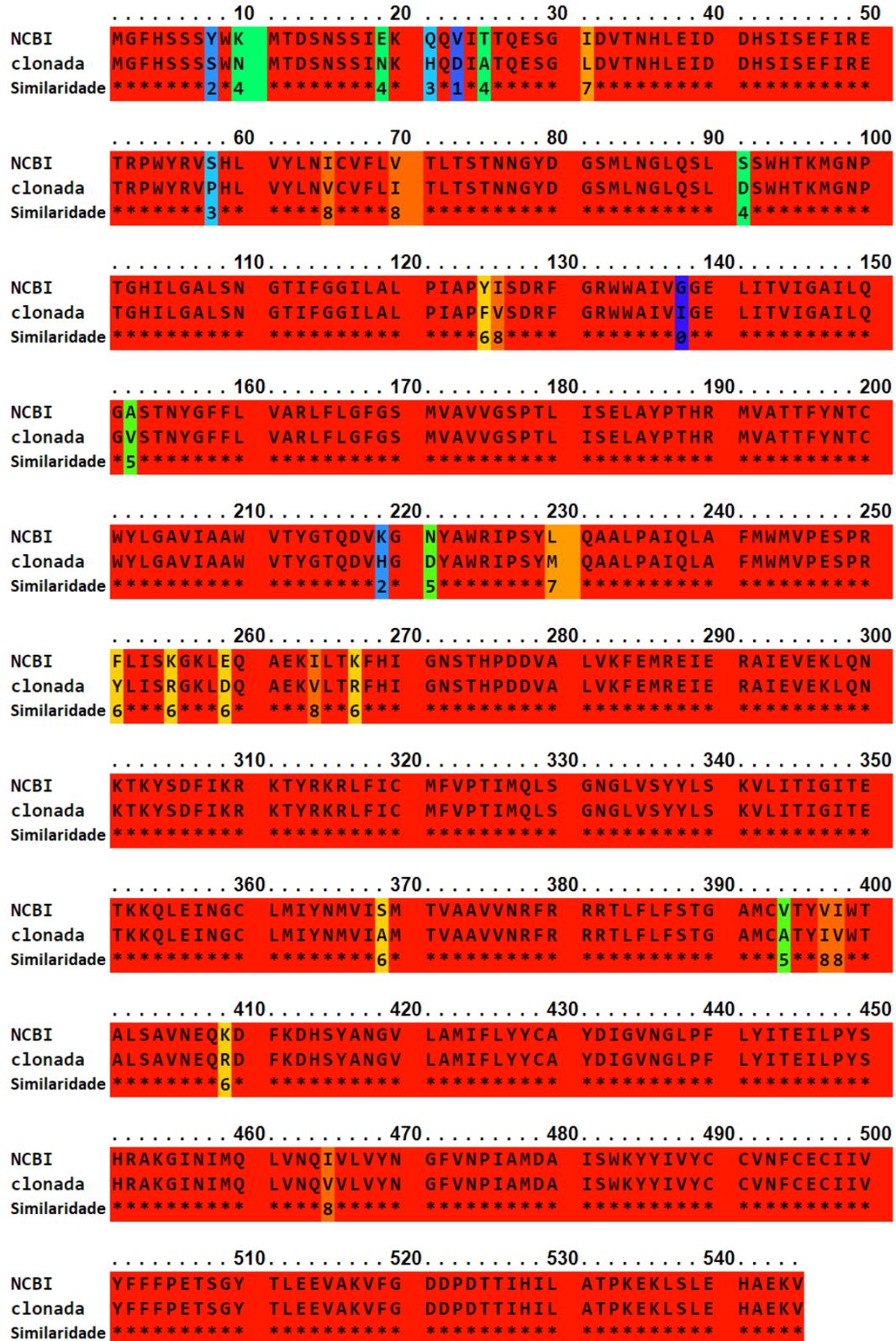
células íntegras, essa produção foi substancialmente menor, em uma ordem de magnitude de mil vezes, quando contrastada com a atividade enzimática registrada no ensaio utilizando células permeabilizadas. Isso indica que, em células expressando esse transportador de celobiose e essa β -glicosidase intracelular, a velocidade de transporte pode ser o fator limitante para a hidrólise dos substratos testados e, possivelmente, para o consumo de celobiose e/ou xilobiose em linhagens que expressem tanto o transportador quanto a enzima em questão.

O trabalho conduzido por Ha e colaboradores (2011) elucidou que a variação no desenvolvimento de distintas linhagens de *S. cerevisiae*, expressando uma β -glicosidase intracelular em comum, porém que divergem nos tipos de transportadores de celobiose, resulta em discrepantes níveis de consumo desse dissacarídeo, também indicando que, entre a etapa de transporte e a de hidrólise intracelular, é a primeira o que limita o consumo de celobiose.

4.3. ANÁLISES ESTRUTURAL DA PERMEASE MgCBT2

Após sequenciamento do gene *MgCBT2* clonado no plasmídeo p426-GPD, como descrito em Material e Métodos, percebeu-se diversas diferenças pontuais na proteína codificada pela versão clonada em relação à codificada pela versão depositada no NCBI (GeneID: XM_001486960.1), como pode ser observado no alinhamento ilustrado na **Figura 12**, com a linha “NCBI” indicando a sequência da proteína codificada pelo gene depositado no NCBI e a linha “clonada” indicando a sequência codificada pelo gene clonado. A identidade entre as duas versões é de 95%, sendo que a metade final do alinhamento apresentou um maior grau de similaridade entre as duas sequências, com apenas seis pontos de discordância entre as sequências proteicas, todas sendo substituições de impacto leve ou moderado com cadeias laterais diferindo pouco em termos de polaridade e/ou tamanho. Já a metade inicial do alinhamento apresentou 23 pontos de discordância entre as duas sequências, com substituições de maior impacto sob a similaridade da substituição, como a substituição na posição 8 de um resíduo de tirosina (Y – que possui uma cadeia lateral polar com um anel aromático) por um de serina (S – que possui uma cadeia lateral composta apenas por um grupo hidroxila), a substituição na posição 23 de um resíduo de valina (V – de cadeia lateral apolar) por um de ácido aspártico (D – de cadeia lateral ácida) e a substituição na posição 138 de um resíduo de glicina (G – de cadeia lateral composta apenas por um átomo de H) por um de isoleucina (I – de cadeia lateral composta por um grupo sec-butil), por exemplo. Além disso, pode ser destacada a posição 10, em que um resíduo de lisina é substituído por um resíduo de asparagina (N) que, por se encontrar no início da proteína, provavelmente compõem a região N-terminal anterior ao primeiro TM e pode vir a servir como possível sítio de ubiquitinação do transportador codificado pelo gene depositado no NCBI, mas não na versão clonada. Diferenças sutis entre as proteínas são esperadas uma vez que a linhagem que teve seu genoma sequenciado e depositado no NCBI (NCBI:txid294746) é diferente da utilizada por Knychala (2017) para fazer a clonagem do gene.

Figura 12: Alinhamento pelo programa PRALINE das duas versões do transportador MgCBT2, depositada no NCBI (linha NCBI) e clonada no plasmídeo p-426-GPD por Knychala (2017) (linha clonada). Os pontos de divergência na sequência aminoacídica das duas proteínas estão destacados na escala de cores que vai do azul (menos conservado) ao vermelho (mais conservado), de acordo com as características de polaridade e/ou tamanho da cadeia lateral.



Não-conservado 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conservado

Com a correta sequência do gene clonado, foi possível utilizar ferramentas computacionais para analisar algumas características do transportador. Para comparar o transportador foco do presente trabalho com outras permeases já descritas e caracterizadas, foi construído uma árvore filogenética (**Figura 13**). É possível notar a separação entre dois grandes grupos de transportadores, distinguíveis em relação às suas capacidades de transporte de mono ou dissacarídeos (com algumas exceções que transportam ambos). À esquerda se agrupam os transportadores de monossacarídeos, mais semelhantes aos transportadores da família dos HXT e, à direita, estão as permeases que promovem o transporte de dissacarídeos, como os transportadores da família MALx1 de *S. cerevisiae* e os transportadores CDT-1 e CDT-2 de *N. crassa*, clássicos transportadores de celobiose amplamente estudados, caracterizados como tendo capacidade de transporte de celobiose (GALAZKA *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2014; SON *et al.*, 2016; OH *et al.*, 2016; CHOMVONG *et al.*, 2017) e de xilobiose, no caso do CDT-2 (LI *et al.*, 2015). Mais similares ao MgCBT2, destacam-se os transportadores HXT2.4 de *Sc. stipitis* e o CBT1 de *C. tropicalis*, ambos também estudados por Knychala (2017), em que foi observado que permitem consumo de celobiose por linhagens de *S. cerevisiae* quando expressos em conjunto de β -glicosidase intracelular.

Inicialmente, as ferramentas PRALINE, HMMTOP, TMHMM - 2.0 e Phyre² foram utilizadas para prever quais seriam os TMs do transportador. Os resultados das diferentes ferramentas foram concisos para a maioria dos TMs, porém conflitantes em alguns. Como a superfamília MFS inclui diversos transportadores que possuem 12 TMs (HENDERSON, 1993; PAO *et al.*, 1998; SAIER, 2000), utilizou-se uma combinação dos resultados dos programas, em comparação com o modelo tridimensional construído com o SWISS-MODEL, para se estipular que os TMs do MgCBT2 são os 12 destacados na **Figura 14**.

Ferramentas de bioinformática são úteis na tentativa de prever quais lisinas (K) podem ou não servir como sítios de ubiquitinação, porém os mecanismos pelos quais as proteínas de membrana são ubiquitinadas ainda não são completamente compreendidos, o que torna desafiador antecipar o local exato de ubiquitinação nos transportadores. Uma ferramenta que busca identificar possíveis sítios de ubiquitinação é o BDM-PUB, descrita por Li e colaboradores (2009), e que foi a utilizada para prever sítios de ubiquitinação no transportador MgCBT2.

Apenas os resíduos de lisina que foram preditos como sendo possíveis sítios de ubiquitinação e que estavam presentes nas regiões N- e/ou C- terminais foram destacados em vermelho na **Figura 14**. Percebe-se que esses resíduos de lisina são apenas três presentes apenas na região C-terminal do transportador. Um outro resíduo de lisina está presente na região C-terminal, na posição 517, porém não foi predito como sendo passível de ubiquitinação. Além desse, o resíduo de lisina da posição 20, na região N-terminal, também não foi predito como sendo passível de ubiquitinação pelo PDM-PUB, mas se encontra destacado em amarelo por ser o único resíduo de lisina presente na região N-terminal do transportador MgCBT2. A **Figura 14** também ilustra a sequência de outros dois transportadores MgCBT2 truncados que serão discutidos no tópico seguinte.

Figura 13: Árvore filogenética comparativa entre o transportador de *Meyerozyma guilliermondii* MgCBT2 (M.gui CBT2, destacado na caixa vermelha) e diversos outros transportadores já descritos e caracterizados quanto aos substratos que transportam (indicados pelas esferas coloridas ao lado dos nomes). A árvore foi construída como descrito em Material e Métodos.



Ao comparar a sequência do MgCBT2 com os transportadores de celodextrinas CDT-1 e CDT-2 de *N. crassa* (**Figura 15**), percebe-se que as três permeases possuem também resíduos de ácido aspártico (D) e de ácido glutâmico (E) nos seus TMs. Analisar a presença desses resíduos de aminoácido nos TMs é interessante pois permite estipular se o transportador em questão poderia ou não se tratar de um transportador que realiza co-transporte de açúcar com H^+ , uma vez que esse tipo de transporte demanda que haja interação do H^+ com a cadeia lateral de

um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico, ambas carregadas negativamente, localizados no poro do transportador (SAHIN-TOTH *et al.*, 2000; GUAN & KABACK, 2006; VADYVALOO *et al.*, 2006; TRICHEZ *et al.*, 2019). O alinhamento demonstra a presença de resíduos de ácido aspártico nos TMs 1 e 10 e resíduos de ácido glutâmico nos TMs 3, 8 e 12. Desses resíduos, os presentes no TM-1 e no TM-12 são conservados entre os três transportadores que foram alinhados. Uma vez que os TMs 3, 6, 9 e 12 não fazem parte da composição do poro central do transportador (**Figura 4**) (ABRAMSON *et al.*, 2003; SORGEN *et al.*, 2002; TRICHEZ *et al.*, 2019), os resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico presentes nessas porções dos transportadores não devem ser responsáveis pela interação com o H⁺. Assim, caso o tipo de transporte realizado pelo transportador MgCBT2 seja um co-transporte de açúcar com H⁺, os resíduos de aminoácidos capazes de interagir com o H⁺ poderiam ser o D-80 (TM-1), E-356 (TM-8) e D-432 (TM-10).

O trabalho de Ujwal e colaboradores (1994) já descreveu o E-269 (TM-8) do LacY de *E. coli* como essencial para a funcionalidade do transportador ativo de lactose. Já os trabalhos de Sahin-Toth e colaboradores (2000) e Sahin-Toth & Kaback (2001) descreveram o E-325 (TM-10) do LacY de *E. coli* como sendo fundamental para a interação transportador-H⁺. Trichez e colaboradores (2019) demonstram que o E-325 do LacY se encontram posicionados praticamente da mesma maneira que o D-123 (TM-1) do transportador AGT1 de *S. cerevisiae* e, além do D-123, o G-120 também se encontra no TM-1 e tem a posição conservada em outros transportadores de α -glucosídeos relacionados (como os MALx1). A mutagênese destes resíduos no transportador AGT1 aboliam a capacidade de transportar (e fermentar açúcares) por esta permease, ressaltando a sua importância para a atividade H⁺-simporte.

O transportador CDT-1 possui apenas o D-90 (TM-1), que se encontra na mesma posição estrutural do D-80 do MgCBT2, como sendo um possível ponto de interação com o H⁺. O transportador CDT-1 foi caracterizado por Kim e colaboradores (2014), com base em experimentos de inibição utilizando carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (um desacoplador de gradiente de prótons), como tendo atividade de co-transporte com H⁺. Apesar disso, o mesmo trabalho classificou o CDT-2 como sendo um transportador que realiza difusão facilitada, mesmo possuindo um D-56 que se encontra na mesma posição estrutural do D-90 do CDT-1 ou do D-80 do MgCBT2. Portanto, novos estudos serão necessários para confirmar se o transportador MgCBT2 é um transportador ativo de celobiose (celobiose-H⁺-simporte).

4.4. FERMENTAÇÃO DE CELOBIOSE E ANÁLISE TEMPORAL DE ATIVIDADES ENZIMÁTICA E DE TRANSPORTE NA LINHAGEM CENPK-B2-MgCBT2

A seguir a linhagem CENPK-B2-MgCBT2 foi avaliada quanto à sua capacidade fermentativa na presença de 20 g L⁻¹ de celobiose em meio complexo YP (**Figura 16a**) e meio Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ (**Figura 16b**) durante 148 h. Os

melhores resultados foram obtidos em fermentações utilizando meio YP, em que a linhagem conseguiu consumir cerca de 71,7% da celobiose presente no meio e produzir aproximadamente 6,3 g L⁻¹ de etanol, enquanto em meio Sc otimizado URA⁻TRP⁻ a mesma linhagem foi capaz de consumir apenas 4% de celobiose, produzindo aproximadamente 0,7 g L⁻¹ de etanol.

Figura 14: Alinhamento pelo programa PRALINE das três versões do transportador MgCBT2 (selvagem e truncadas - tMgCBT2 Δ C (tMg-C) e tMgCBT2 Δ N Δ C (tMg-N-C)). As 12 possíveis regiões transmembrana (TMs), destacadas em verde, foram resultado de uma análise bioinformática utilizando, além do próprio programa PRALINE (com as metodologias PSIPRED e HMMTOP) os programas TMHMM - 2.0, Phyre² e SWISS-MODEL para determinar a mais provável posição dos TMs. Em laranja está destacada a posição do único resíduo de lisina (K) localizado na região N-terminal da proteína e, em vermelho, os resíduos K localizados na região C-terminal que, de acordo com o programa BDM-PUB, são possíveis sítios de ubiquitinação.

```

..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50
MgCBT2 MGFHSSSSWN MTDSNSSINK HQDIATQESG LDVTNHLEID DHSISEFIRE
tMg-C MGFHSSSSWN MTDSNSSINK HQDIATQESG LDVTNHLEID DHSISEFIRE
tMg-N-C -----M HQDIATQESG LDVTNHLEID DHSISEFIRE

..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
MgCBT2 TRPWYRVPHL VYLNVCVFLI TLTSTNNGYD GSMLNGLQSL DSWHTKMGNP
tMg-C TRPWYRVPHL VYLNVCVFLI TLTSTNNGYD GSMLNGLQSL DSWHTKMGNP
tMg-N-C TRPWYRVPHL VYLNVCVFLI TLTSTNNGYD GSMLNGLQSL DSWHTKMGNP

..... 110 ..... 120 ..... 130 ..... 140 ..... 150
MgCBT2 TGHILGALSN GTIFGGILAL PIAPFVSDRF GRWWAIVIGE LITVIGAILQ
tMg-C TGHILGALSN GTIFGGILAL PIAPFVSDRF GRWWAIVIGE LITVIGAILQ
tMg-N-C TGHILGALSN GTIFGGILAL PIAPFVSDRF GRWWAIVIGE LITVIGAILQ

..... 160 ..... 170 ..... 180 ..... 190 ..... 200
MgCBT2 GVSTNYGFFL VARLFLGFGS MVAVVGSPTL ISELAYPTHR MVATTFYNTC
tMg-C GVSTNYGFFL VARLFLGFGS MVAVVGSPTL ISELAYPTHR MVATTFYNTC
tMg-N-C GVSTNYGFFL VARLFLGFGS MVAVVGSPTL ISELAYPTHR MVATTFYNTC

..... 210 ..... 220 ..... 230 ..... 240 ..... 250
MgCBT2 WYLGAVIAAW VTYGTQDVHG DYAWRIPSYM QAALPAIQLA FMWMPESPR
tMg-C WYLGAVIAAW VTYGTQDVHG DYAWRIPSYM QAALPAIQLA FMWMPESPR
tMg-N-C WYLGAVIAAW VTYGTQDVHG DYAWRIPSYM QAALPAIQLA FMWMPESPR

..... 260 ..... 270 ..... 280 ..... 290 ..... 300
MgCBT2 YLISRGKLDQ AEKVLTRFHI GNSTHPDDVA LVKFEMREIE RAIEVEKLQN
tMg-C YLISRGKLDQ AEKVLTRFHI GNSTHPDDVA LVKFEMREIE RAIEVEKLQN
tMg-N-C YLISRGKLDQ AEKVLTRFHI GNSTHPDDVA LVKFEMREIE RAIEVEKLQN

..... 310 ..... 320 ..... 330 ..... 340 ..... 350
MgCBT2 KTKYSDFIKR KTYRKRLFIC MFVPTIMQLS GNLVSYYS KVLITIGITE
tMg-C KTKYSDFIKR KTYRKRLFIC MFVPTIMQLS GNLVSYYS KVLITIGITE
tMg-N-C KTKYSDFIKR KTYRKRLFIC MFVPTIMQLS GNLVSYYS KVLITIGITE

..... 360 ..... 370 ..... 380 ..... 390 ..... 400
MgCBT2 TKKQLEINGC LMIYNMVIAM TVAAVVNRFR RRTLFLFSTG AMCATYIVWT
tMg-C TKKQLEINGC LMIYNMVIAM TVAAVVNRFR RRTLFLFSTG AMCATYIVWT
tMg-N-C TKKQLEINGC LMIYNMVIAM TVAAVVNRFR RRTLFLFSTG AMCATYIVWT

..... 410 ..... 420 ..... 430 ..... 440 ..... 450
MgCBT2 ALSAVNEQRD FKDHSYANGV LAMIFLYYCA YDIGVNLPPF LYITEILPYS
tMg-C ALSAVNEQRD FKDHSYANGV LAMIFLYYCA YDIGVNLPPF LYITEILPYS
tMg-N-C ALSAVNEQRD FKDHSYANGV LAMIFLYYCA YDIGVNLPPF LYITEILPYS

..... 460 ..... 470 ..... 480 ..... 490 ..... 500
MgCBT2 HRAKGINIMQ LVNQVVLVYN GFVNPIAMDA ISWKYYIVYC CVNFCECIIV
tMg-C HRAKGINIMQ LVNQVVLVYN GFVNPIAMDA ISWKYYIVYC CVNFCECIIV
tMg-N-C HRAKGINIMQ LVNQVVLVYN GFVNPIAMDA ISWKYYIVYC CVNFCECIIV

..... 510 ..... 520 ..... 530 ..... 540 .....
MgCBT2 YFFFPETSGY TLEEVAKVFG DDPDTTIHIL ATPKKLSLE HAKV
tMg-C YFFFPETSGY TLEEVAKVFG DDPDTTIHIL ATP-----
tMg-N-C YFFFPETSGY TLEEVAKVFG DDPDTTIHIL ATP-----

```

Figura 15: Alinhamento pelo programa PRALINE das permeases CDT-1 e CDT-2 de *N. crassa* e da permease MgCBT2 de *M. guilliermondii*. Em verde estão destacadas as regiões transmembrana (TMs), determinadas utilizando os programas PRALINE (com as metodologias PSIPRED e HMMTOP), TMHMM - 2.0, Phyre² e SWISS-MODEL. Os resíduos de ácido aspártico (D) presentes nos TMs estão destacados em vermelho, enquanto os de ácido glutâmico (E) estão destacados em azul.

```

      . . . . . 10 . . . . . 20 . . . . . 30 . . . . . 40 . . . . . 50
CDT2_Nc -----MGI  FNKK--PVAQ  AVD---LNQ  IQEEAPQFER  VD-----
CBT2_Mg -----MG-  FHSS--SSWN  MTDSNSSINK  HQDIATQESG  LDVTNHLEID
CDT1_Nc MSSHGSHDGA  STEKHLATHD  IAPTHDAIKI  VPKGHGQTAT  KPGAQEKQEV

      . . . . . 60 . . . . . 70 . . . . . 80 . . . . . 90 . . . . . 100
CDT2_Nc -----  -----WKKDP  GLRKLYFYAF  ILCIASATTG  YD-MFFNSVQ
CBT2_Mg DHSISEFIRE  T--RPWYRVP  HLVYLVNVCVF  LITLTSTNNG  YDGSMLNGLQ
CDT1_Nc NAALFAAIKE  SNIKPWSKES  --IHLFYAIF  VAFCCACANG  YDGSMLMTGII

      . . . . . 110 . . . . . 120 . . . . . 130 . . . . . 140 . . . . . 150
CDT2_Nc NFETWIKYFG  DPRGSELGLL  GALYQIGSIG  SIPF-PLLTD  NFGRRKTPIII
CBT2_Mg SLDSWHTKMG  NPTGHILGAL  SNGTIFGGIL  ALPIAPFVSD  RFGRRWWAIVI
CDT1_Nc AMDKFQNQF-  -HTGDTGPPKV  SVIFSLYTMV  GAPFAAILS  D  RFGRRKKGMFI

      . . . . . 160 . . . . . 170 . . . . . 180 . . . . . 190 . . . . . 200
CDT2_Nc GCVIMIVGAV  LQATAKNLDT  FMGGRTMLGF  GNSLAQIASP  MLLTELAHPQ
CBT2_Mg GELITVIGAI  LQGVSTNYGF  FLVARLFLGF  GSMVAVVGSP  TLISELAYPT
CDT1_Nc GGIFIIVGS  IVASSSKLAQ  FVVGRRVLGL  GIAIMTVAAP  AYSIEIAPP

      . . . . . 210 . . . . . 220 . . . . . 230 . . . . . 240 . . . . . 250
CDT2_Nc HRARLTTIYN  CLWNVGALVV  SWLAFGTNYI  NNDWSWRIPA  LLQAFPSIIQ
CBT2_Mg HRMVATTFYN  TCWYLGAVIA  AWVTYGTQDV  HGDYAWRIPS  YMQAALPAIQ
CDT1_Nc WRGRCTGFYN  CGWFGGSIPA  ACITYGCYFI  KSNWSSWRIPL  ILQAFTCLIV

      . . . . . 260 . . . . . 270 . . . . . 280 . . . . . 290 . . . . . 300
CDT2_Nc LLGIWVVPES  PRFLIAKDKH  DEALHILAKY  HANGDPNHP-  ---TVQFEFR
CBT2_Mg LAFMWMVPES  PRYLISRGKL  DQAEKVLTRF  HI-GNSTHPD  DVALVKFEMR
CDT1_Nc MSSVFFLPES  PRFLFANGRD  AEAFAFLVKY  HGNGDPNSK-  ---LVLETE

      . . . . . 310 . . . . . 320 . . . . . 330 . . . . . 340 . . . . . 350
CDT2_Nc EIKETIRLEM  ESTKNSSYLD  FFKSRGNRYR  LAILLSLGF  SOWSGNAIIS
CBT2_Mg EIERAIEVEK  LQNK-TKYS  FIKRKYRKR  LFICMFVPTI  MQLSGNGLVS
CDT1_Nc EMRDGIRTDG  VDKVWWDYRP  LFMTHSGRWR  MAQVLMISIF  GQFSGNGL-G

      . . . . . 360 . . . . . 370 . . . . . 380 . . . . . 390 . . . . . 400
CDT2_Nc NYSSKLYETA  GVTDSTTAKLG  LSAGQTGLAL  IVSVTMALLV  DKLGRRLAFL
CBT2_Mg YYLSKVVLITI  GITETKKQLE  INGCLMIYNM  VIAMTVAADV  NRRFRRTLFL
CDT1_Nc YFNTVIFKNI  GVTSTSQQLA  YNILNSVISA  IGALTAVSMT  DRMPRRAVLI

      . . . . . 410 . . . . . 420 . . . . . 430 . . . . . 440 . . . . . 450
CDT2_Nc ASTGGMCGTF  VIWTLTAGLY  G-----  -----EHR  LK-----G
CBT2_Mg FSTGAMCATY  IVWTALSAVN  E-----  -----QRD  FK-----D
CDT1_Nc IGTFMCAAAL  ATNSGLSATL  DKQTQRGTQI  NLNQGMNEQD  AKDNAYLHVD

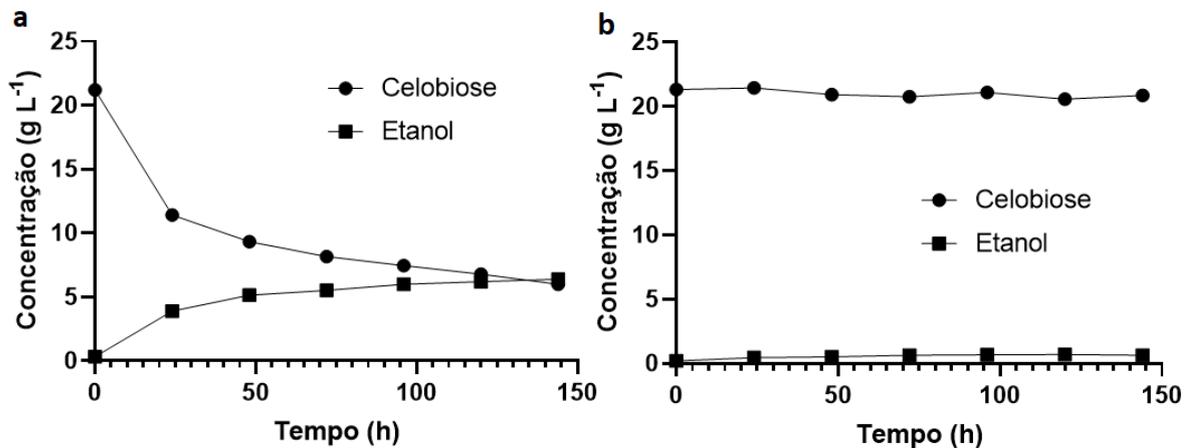
      . . . . . 460 . . . . . 470 . . . . . 480 . . . . . 490 . . . . . 500
CDT2_Nc ADKA--MIFF  IWVFGIFYSL  AWSGLLVGYA  IEILPYRLRG  KGLMVMNMSV
CBT2_Mg HSYANGVLAM  IFLYCYAYDI  GVNGLPFLYI  TEILPYSHRA  KGINIMQLVN
CDT1_Nc SNYAKGALAA  YFLFNVIFSF  TYTPLQGVIP  TEALETTRIG  KGLALSGFIV

      . . . . . 510 . . . . . 520 . . . . . 530 . . . . . 540 . . . . . 550
CDT2_Nc QCALTLNTYA  NPVAFDYFGP  DHSWKLYLIY  TCWIAAEFVF  VFFMYVETKG
CBT2_Mg QVVLVYNGFV  NPIAMDAI--  --SWKYYIVY  CCVNFCECII  VYFFFPETSG
CDT1_Nc NAMGFINQFA  GPIALHNIG-  ---YKYIFVF  VGWDLIETVA  WYFFGVESQG

      . . . . . 560 . . . . . 570 . . . . . 580 . . . . . 590
CDT2_Nc PTLEELAKVI  DGDEADVAHI  DIHQVEKEVE  IHEHEGKSVA
CBT2_Mg YTLEEVAKVF  -GDDPDTT-I  HILATPKEKL  SLEHAEKV--
CDT1_Nc RTLEQLEWVY  DQPNPVKASL  KVEKVVVQAD  GHV-SEAIVA

```

Figura 16: Ensaio de fermentação utilizando 10 g L^{-1} de células da linhagem CENPK-B2-MgCBT2, em (a) meio YP com $\sim 20 \text{ g L}^{-1}$ de celobiose ou (b) meio Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ com $\sim 20 \text{ g L}^{-1}$ celobiose. Células pré-inoculadas em meio Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ glicose 20 g L^{-1} .



Esses resultados contrastam com o observado por Knychala (2017). No seu experimento fermentativo utilizando meio Sc URA⁻ TRP⁻ simples, foi observado consumo de cerca de 75% de toda celobiose presente no meio fermentativo, com produção de $8,1 \text{ g L}^{-1}$ de etanol em 120 h de fermentação. O consumo observado também se deu de forma lenta e com diminuição na taxa de consumo ao longo do experimento, se assemelhando aos resultados observados em meio YP do presente trabalho. Os motivos pelo qual o desempenho fermentativo da linhagem CENPK-B2-MgCBT2 observado por Knychala (2017) foi tão diferente do observado em meio sintético no presente trabalho permanece incertos.

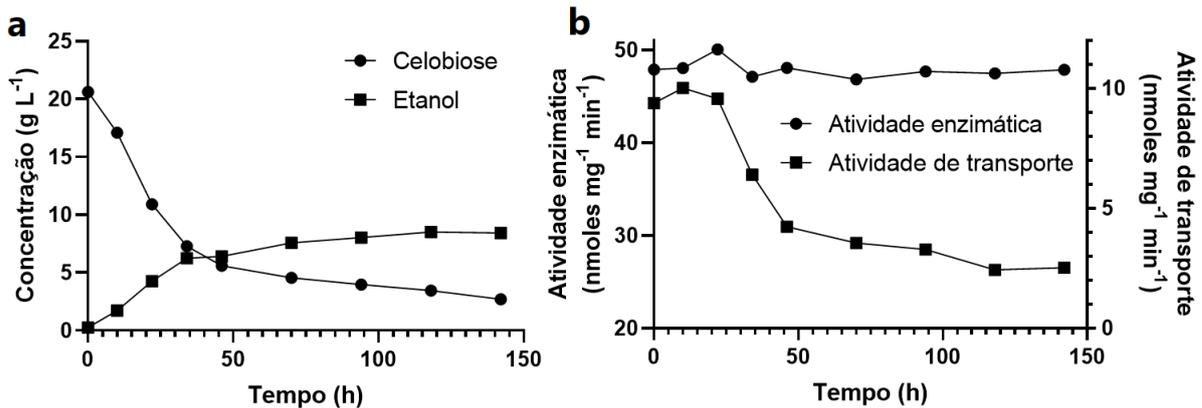
Em virtude dos resultados superiores observados em meio YP quando comparados com meio Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ (**Figura 16**), os experimentos subsequentes do presente trabalho foram realizados utilizando meio YP.

Na tentativa de elucidar o motivo pelo qual a linhagem perde sua capacidade de consumo de celobiose ao longo da fermentação, outro experimento fermentativo foi realizado, mas agora, além de serem mensuradas as concentrações de celobiose e etanol ao longo da fermentação (**Figura 17a**), também foi determinada a atividade enzimática e de transporte de *p*-NβG ao longo do experimento (**Figura 17b**). De forma similar ao encontrado no experimento anterior (**Figura 16a**), o consumo de celobiose também foi longo e incompleto, com 86,88% do substrato consumido ao longo de 148 h. A linhagem manteve a velocidade de consumo maior no início do experimento, $0,33 \text{ g h}^{-1}$ nas primeiras 48 h, quando comparadas com as últimas 96 h ($0,03 \text{ g h}^{-1}$).

Os ensaios de atividade enzimática e de transporte de *p*-NβG (**Figura 17b**) revelam que a linhagem expressando a enzima SpBGL2 e o transportador MgCBT2 mantém a atividade de hidrólise do substrato alta (em torno de $48 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e constante ao longo do experimento, mas a sua atividade de transporte é reduzida em mais de três vezes quando comparado o início (em torno de $9,6 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e o final do experimento (em torno de $2,7 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), com uma queda

na atividade de transporte que ocorre de forma paralela à queda no consumo de celobiose. Esses resultados indicam que a redução na atividade de transporte é a responsável pelo interrompimento no consumo e fermentação de celobiose.

Figura 17: Ensaio de fermentação com 10 g L^{-1} de células da linhagem CENPK-B2-MgCBT2 em meio YP contendo 20 g L^{-1} de celobiose. Células pré-inoculadas em Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ glicose 20 g L^{-1} . Os consumos de celobiose e produção de etanol estão ilustrados em (a), enquanto as atividades de hidrólise e de transporte de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo estão ilustradas em (b).



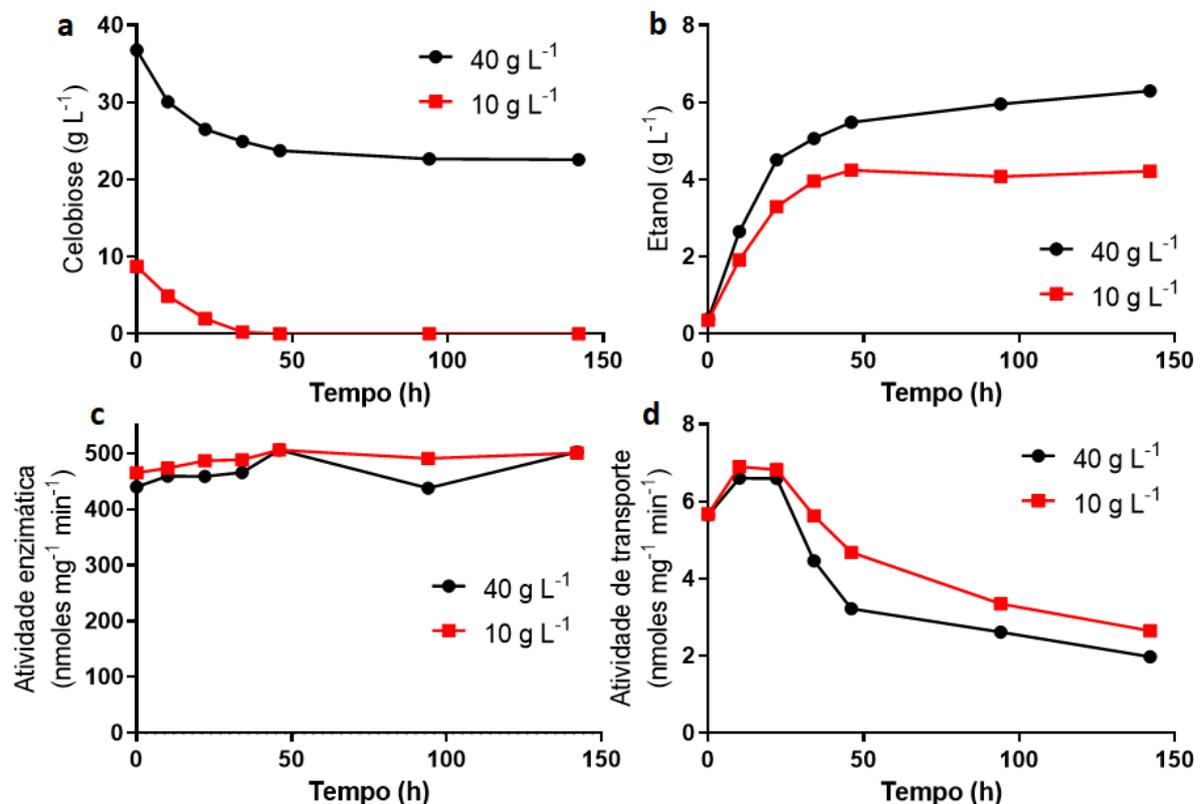
Na tentativa de elucidar se a concentração de celobiose no meio fermentativo tem alguma influência na diminuição da capacidade de transporte e, conseqüentemente, na capacidade fermentativa, foram realizados ensaios fermentativos nas mesmas condições que as utilizadas nos ensaios anteriores, porém, utilizando celobiose na concentração de 40 g L^{-1} e 10 g L^{-1} (**Figura 18**).

Como pode ser observado, os resultados das fermentações são similares entre si, com ambas as condições levando aos mesmos padrões observados anteriormente de atividade enzimática e de transporte. Observa-se também que, na fermentação com concentração inicial de aproximadamente 10 g L^{-1} de celobiose, foi possível o consumo total do substrato, o que mostra que a capacidade de transporte garantida pelo transportador estudado é eficiente até mesmo em concentrações baixas de celobiose. Com concentração inicial de aproximadamente 10 g L^{-1} , o $Y_{E/S} = 0,48 \text{ g g}^{-1}$, e a velocidade de consumo nas primeiras 34 h foi de $0,25 \text{ g h}^{-1}$. Já na concentração inicial de 40 g L^{-1} de celobiose, a linhagem foi capaz de consumir apenas 38,6% do substrato presente no meio, com velocidade de consumo de $0,35 \text{ g h}^{-1}$ nas primeiras 34 h.

É interessante ressaltar que, durante a fermentação que inicia com apenas 10 g L^{-1} de celobiose, mesmo após 48h de experimento, quando não há mais celobiose presente no meio, as células ainda apresentam atividade enzimática e de transporte. Isso indica que a estratégia de sobreexpressão de rotas metabólicas sob promotores constitutivos expressos em plasmídeos episomais de cópia múltipla é eficiente. O padrão de diminuição na atividade de transporte encontrado em todos os experimentos realizados com a linhagem CENPK-B2-MgCBT2, em conjunto com o fato de que os genes que codificam esses transportadores se encontram sob

regência dos mesmos promotores (fortes e constitutivos) que regem os genes que codificam a enzima SpBGL2, é um indício de que as permeases MgCBT2 estão sendo reguladas negativamente de forma pós-traducional pelas leveduras.

Figura 18: Ensaio de fermentação com 10 g L^{-1} de células da linhagem CENPK-B2-MgCBT2 utilizando 10 g L^{-1} e 40 g L^{-1} de celobiose como fonte de carbono. Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ glicose 20 g L^{-1} . Em (a) observa-se os padrões de consumo de celobiose e em (b) os padrões de produção de etanol, em (c) o padrão temporal de atividade enzimática e em (d) o padrão temporal de atividade de transporte. Os dois últimos parâmetros foram estimados avaliando a hidrólise de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (e consequente formação de *p*-nitrofenol) por células permeabilizadas e células intactas, respectivamente.



Como já discutido por Stambuk (2002) e Horák (2003), proteínas presentes na membrana plasmática (como é o caso das permeases de açúcares) podem sofrer modificações pós-traducionais, do tipo ubiquitinação, em alguns de seus resíduos de lisina presentes em suas porções N- ou C-terminais citoplasmáticas. Por exemplo, Roy e colaboradores (2014) identificaram que a porção N-terminal do transportador Hxt1 de *S. cerevisiae* possui duas lisinas (K12 e K39) que podem servir como sítios de ubiquitinação e promover a endocitose do transportador quando glicose é depletada do meio. Nesse trabalho, a remoção da região N-terminal desse transportador (via truncagem) e a sobreexpressão dessa versão modificada em linhagem de *S. cerevisiae* deficiente nos transportadores de hexose (*hxt*-null) permitiu a permanência da permease na membrana plasmática mesmo quando a glicose era depletada do meio. A mesma estratégia foi utilizada por Pereira e colaboradores (2021) numa linhagem industrial recombinante com a via de

fermentação de xilose, o que permitiu a estabilidade do transportador durante o consumo de xilose, e portanto, ausência de glicose. A linhagem sobreexpressando esse transportador truncado apresentou uma melhora na capacidade de fermentar xilose, conseguindo consumir cerca de 40 g L⁻¹ em 48 h, enquanto a linhagem parental foi capaz de consumir cerca de 80% desse valor no mesmo período. (PEREIRA *et al.*, 2021; vide DOS SANTOS, 2021).

Li e colaboradores (2016b) expressaram em linhagem de *S. cerevisiae hxt-null* contendo via de metabolização de xilose, o transportador CiGXS1 de *Candida intermedia*, um transportador com capacidade de transportar tanto glicose quanto xilose via co-transporte com H⁺. Após ensaios de mutagênese, identificaram que a truncagem de parte da região C-terminal do transportador diminuía a inibição do transporte de xilose, causado pela presença de glicose, nesse transportador.

Sen e colaboradores (2016) expressaram os transportadores de celobiose CDT-1 e CDT-2 de *N. crassa* em *S. cerevisiae*, e identificaram o papel de α -arrestinas na endocitose desses transportadores heterólogos. Além disso, também identificaram a importância de lisinas presentes na região C-terminal do CDT-2 para a remoção desse transportador da membrana plasmática. Através da substituição dos K484, K493, K512 e K522 por resíduos de arginina (R), a versão modificada do CDT-2 teve uma permanência maior na membrana quando comparado com a versão não modificada, e a linhagem expressando essa versão mutante conseguiu consumir cerca de 75% dos 80 g L⁻¹ de celobiose inicialmente presentes no meio fermentativo ao final de 172 h de experimento, enquanto a linhagem expressando a versão convencional foi capaz de consumir apenas 40% da celobiose no mesmo período.

Nijland e colaboradores (2016) substituíram os resíduos de lisina por resíduos de arginina nas posições 12, 27, 35 e 59 (todos presentes na região N-terminal) dos transportadores Hxt1 e Hxt36 (uma variante do Hxt3). Quando introduzidas em linhagens de *S. cerevisiae hxt-null* expressando via de metabolização de xilose, essas versões alteradas das permeases em questão exibiram maior permanência na membrana em comparação com as permeases não modificadas, mesmo na ausência de glicose. Além disso, essas variantes promoveram uma melhora significativa no consumo de xilose.

Knychala e colaboradores (2022) identificaram uma permease de *Sp. passalidarum*, nomeada SpXUT1, e outra de *Sp. arborariae*, nomeada SaXUT1, ambas contendo similaridade com o transportador de glicose e xilose SsXUT1, de *Sc. stipitis* (de Sales *et al.*, 2015). Tanto a sobreexpressão do SpXUT1 e quanto a do SaXUT1 não permitiram que linhagens de *S. cerevisiae hxt-null* conseguissem consumir glicose ou xilose. Após o desenvolvimento de versões truncadas dessas permeases, SpXUT1 sem os últimos 22 resíduos de aminoácidos (SpXUT1 Δ C) e SaXUT1 sem os primeiros 17 e os últimos 19 resíduos de aminoácidos (SaXUT1 Δ N Δ C), uma vez inseridas em linhagem *hxt-null* de *S. cerevisiae* com via de metabolização de xilose, permitiram o consumo, crescimento e fermentação em meios contendo tanto glicose quanto xilose. Das linhagens desenvolvidas, a

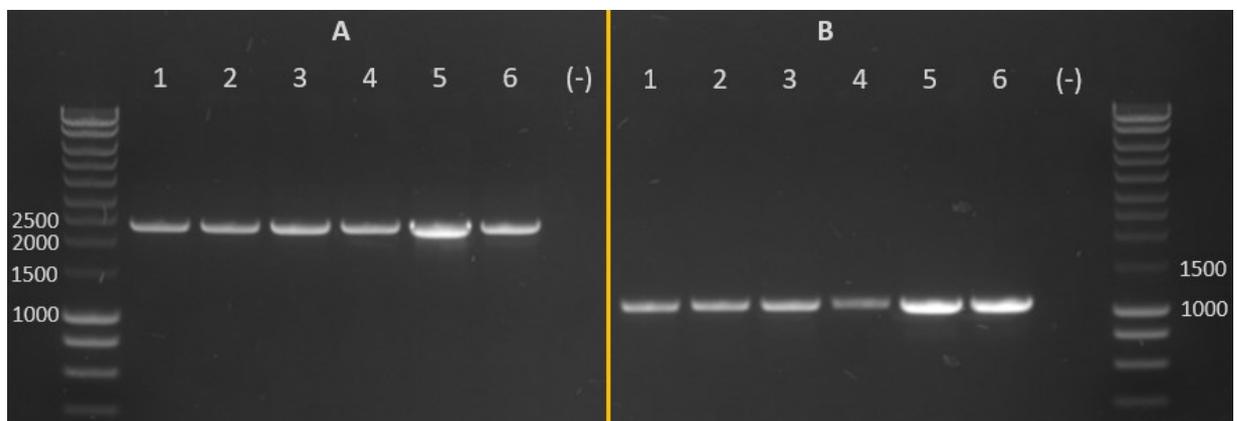
contendo o transportador SpXUT1 Δ C foi capaz de fermentar aproximadamente 20 g L⁻¹ de xilose em 48 h.

Dessa forma, optou-se pela análise da presença de resíduos de lisina passíveis de ubiquitinação presentes nas regiões N- e/ou C-terminais do transportador MgCBT2 e, caso presentes, realizar o desenvolvimento de versões truncadas desta permease.

4.5. INTEGRAÇÃO DO pAUR-XKXDHXR

Para permitir o co-consumo de xilose juntamente com a porção C6 (hexoses) na indústria de etanol 2G, é necessário o desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* que possuam expressão das enzimas necessárias para metabolização intracelular de xilose. Para tal, optou-se pela mesma estratégia que permitiu o desenvolvimento da linhagem MP-C5H1, de integração gênica do plasmídeo pAUR-XKXDHXR (**Figura 9**) (MATSUSHIKA *et al.*, 2008c.) no *locus AUR1*. Após a correta integração desse plasmídeo integrativo no restante das linhagens selecionadas, confirmada por PCR (**Figura 19**), as linhagens desenvolvidas possuíam integrados em seus genomas os genes *XKS1* (de *S. cerevisiae*), *XYL2* e *XYL1* (ambos oriundos de *S. stiptis*), todos sob regência dos promotores fortes e constitutivos (*PGK1p* para os dois primeiros e *ADH1p* para o último).

Figura 19: Imagem de eletroforese em gel de agarose ilustrando a correta inserção do plasmídeo pAUR-XKXDHXR no *locus AUR1* das linhagens. Na metade **A** da imagem, ilustra-se a eletroforese dos produtos de PCR utilizando os iniciadores AurR-meio_F e XKS1-begin.2-R (**Tabela 1**), que juntos promovem a amplificação de um fragmento de 2344 pb. Já a metade **B**, ilustra a eletroforese dos produtos de PCR utilizando os iniciadores XKS1-fim_F e XYL2-begin_R (**Tabela 1**), que juntos promovem a amplificação de um fragmento de 1094 pb. As colunas numeradas são relativas à origem do DNA utilizado como molde para cada PCR, sendo elas: (1) linhagem CENPK-X-B2-Mg, derivada da linhagem CENPK-B2-MgCBT2; (2) linhagem CENPK-X-RDK, derivada da linhagem CEN.PK2-1C; (3) linhagem MGD-X-RDK, derivada da linhagem MGD-01; (4) linhagem GMY-X-RDK, derivada da linhagem GMY08; (5) linhagem MP-C5H1 e; (6) plasmídeo pAUR-XKXDHXR purificado. As colunas (-) representam os PCR controle, sem utilizar DNA como molde.



4.6. TRUNCAGEM DO TRANSPORTADOR MgCBT2

Na tentativa de aumentar a permanência do transportador na membrana e, em consequência, melhorar o consumo de celobiose pelas linhagens, optou-se pela remoção dos resíduos de lisina que podem servir como sítios de ubiquitinação presentes na região C-terminal do transportador, criando uma versão truncada na extremidade final da proteína (**Figura 14, linha tMg-C**). Apesar de a ferramenta BDM-PUB apontar apenas os resíduos de lisina presentes na região C-terminal como passíveis de ubiquitinação, optou-se por desenvolver uma segunda versão do transportador que, além da modificação na região C-terminal já descrita, também não possuísse nenhuma lisina presente em sua região N-terminal (**Figura 14, linha tMg-N-C**).

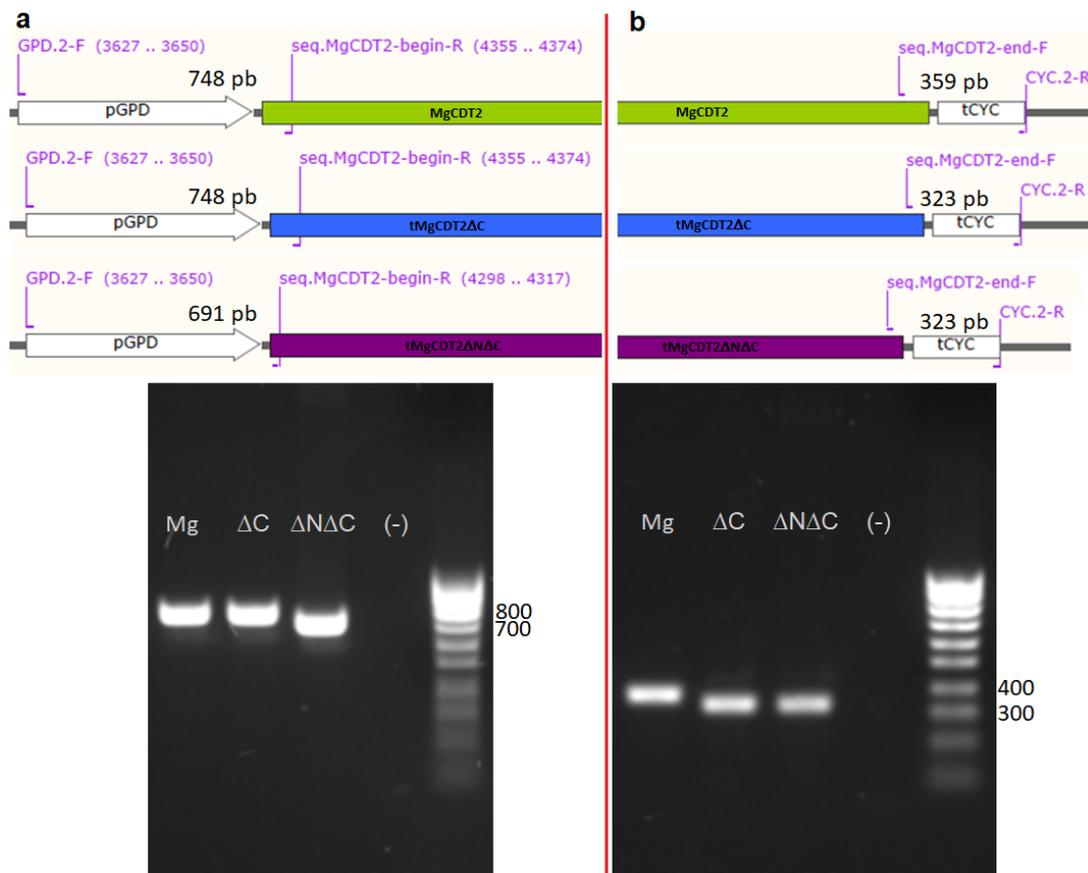
A estratégia adotada foi a truncagem dos genes, por ser uma técnica simples, barata e que já foi demonstrada como sendo eficiente para a melhoria no consumo dos açúcares (ROY *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016b; PEREIRA *et al.*, 2021; KNYCHALA *et al.*, 2022). Essa técnica consiste na utilização de iniciadores que amplifiquem apenas a parte do gene que codifica a região da proteína que se pretende manter na versão truncada, deixando de lado uma e/ou ambas as extremidades, de forma que as traduções desses genes resultem em transportadores que apenas diferem do original em relação ao comprimento de suas regiões N- e/ou C- terminais. É importante destacar que, com essa técnica, é necessário que o códon ATG inicial e/ou o códon final (*stop*) sejam mantidos nas versões truncadas tal qual estão na versão selvagem do gene. Para isso, planejou-se o desenvolvimento de duas novas versões do gene *MgCBT2*: (1) *tMgCBT2ΔC* – que codifica uma versão do transportador truncado apenas na região C-terminal, ilustrado na **Figura 14, linha tMg-C** (*MgCBT2*[1600-1635Δ]) e (2) *tMgCBT2ΔNΔC* – que codifica uma versão do transportador truncando em ambas as regiões N- e C-terminal, ilustrado na **Figura 14, linha tMg-N-C** ([4-60Δ]*MgCBT2*[1600-1635Δ]). O gene *tMgCBT2ΔC* foi obtido através de PCR utilizando os iniciadores MgCDT2.2-F e tMgCDT2_R (**Tabela 1**), com o plasmídeo p426-MgCBT2 como molde. O gene *tMgCBT2ΔNΔC* foi obtido através de PCR utilizando os iniciadores tMgCDT2_F e tMgCDT2_R (**Tabela 1**), com o plasmídeo p426-MgCBT2 como molde.

Os genes que codificam as versões truncadas do transportador foram clonadas no mesmo vetor utilizado para a versão selvagem usado por Knychala (2017), o plasmídeo p426-GPD, entre o promotor forte e constitutivo *GPDp* e o terminador *CYC1t*. A confirmação da correta clonagem das novas versões do gene se deu através de amplificações das regiões iniciais e finais dos genes (**Figura 20**) e de sequenciamentos das regiões relevantes nos plasmídeos, conforme descrito na seção de Material e Métodos. Uma vez que a construção dos plasmídeos foi confirmada, os mesmos foram inseridos nas linhagens laboratoriais de interesse. Para confirmação da correta transformação das linhagens, foram realizadas PCRs de colônia amplificando as mesmas regiões utilizadas para confirmar a correta construção dos plasmídeos (dados não mostrados).

4.7. FERMENTAÇÕES DE CELOBIOSE PELAS LINHAGENS LABORATORIAIS

Como forma de comparação das eficiências entre as duas linhagens laboratoriais selecionadas, outro experimento fermentativo com acompanhamento temporal das atividades enzimáticas e de transporte foi realizado, nos mesmos moldes do experimento ilustrado na **Figura 17**, porém utilizando a linhagem MGD-X-B2-MgCBT2 (**Figura 21**).

Figura 20: Esquema para confirmação do desenvolvimento das novas versões do gene *MgCBT2*. Estão representadas as regiões amplificadas (com seus respectivos tamanhos esperados), pares de iniciadores utilizados, e eletroforese em géis de agarose dos PCRs das regiões (**a**) inicial e (**b**) final do gene *MgCBT2* e de suas versões truncadas *tMgCBT2ΔC* e *tMgCBT2ΔNΔC*. Nos géis, as colunas nomeadas Mg, ΔC e ΔNΔC correspondem aos PCRs utilizando os plasmídeos clonados com os genes *MgCBT2*, *tMgCBT2ΔC* e *tMgCBT2ΔNΔC* como DNA molde (respectivamente), enquanto a coluna (-), representa o PCR controle, em que não foi adicionado nenhum DNA molde.

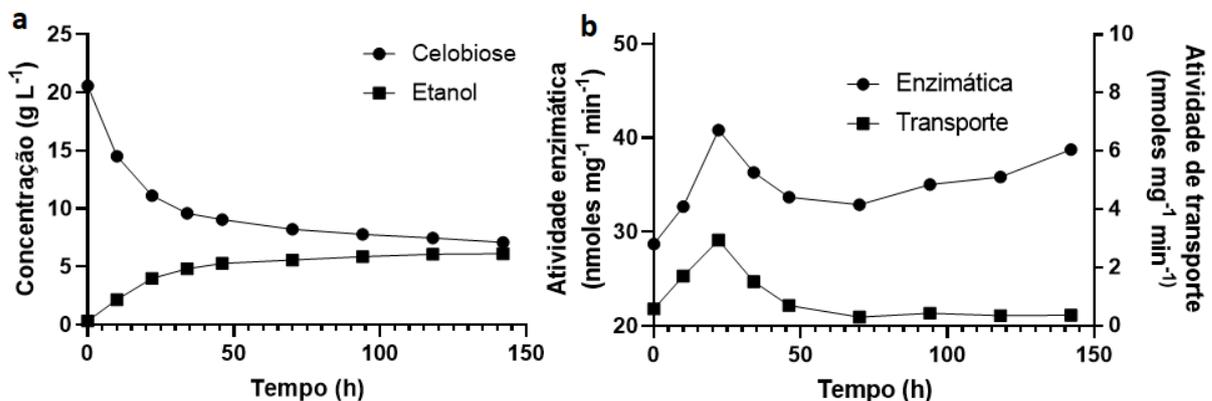


Ao comparar os desempenhos fermentativos nos dois experimentos, percebe-se que a linhagem CENPK-B2-MgCBT2 (**Figura 17**) apresentou melhor performance, consumindo cerca de 86,9% da celobiose presente no meio, produzindo 8,4 g L⁻¹ de etanol, com velocidade de consumo de 0,33 g h⁻¹ nas primeiras 48 h. Enquanto isso, a linhagem MGD-X-B2-Mg foi capaz de consumir em

torno de 65,5% de celobiose, com 6,1 g L⁻¹ de etanol produzidos e uma velocidade de consumo de 0,25 g h⁻¹ nas primeiras 48 h.

Além do desempenho fermentativo superior, os níveis de atividade enzimática e atividade de transporte de *p*-NβG encontrados na linhagem CENPK-B2-MgCBT2 também foram maiores que os observados na linhagem MGD-X-B2-Mg. Enquanto a linhagem CENPK-B2-MgCBT2 apresentou 10,0 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ como máxima atividade de transporte pelo transportador MgCBT2 e 50,0 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ como máxima atividade enzimática pela enzima SpBGL2, a linhagem MGD-X-B2-Mg apresentou atividades máximas de 2,9 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ para o transportador e 40,8 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ para a enzima. Apesar do desempenho inferior, a fermentação realizada pela linhagem MGD-X-B2-Mg seguiu os mesmos padrões dos apresentados pela linhagem CENPK-B2-MgCBT2, com fermentação lenta e incompleta, em que a linhagem em questão mantém a atividade de sua β-glicosidase e apresenta uma diminuição na atividade de transporte. Esses resultados indicam que, do mesmo modo que ocorre com a linhagem CENPK-B2-MgCBT2, a redução na atividade de transporte é o responsável pela diminuição na velocidade de consumo e fermentação de celobiose.

Figura 21: Ensaio de fermentação com 10 g L⁻¹ de células da linhagem MGD-X-B2-MgCBT2 em meio YP contendo 20 g L⁻¹ de celobiose. Células pré-inoculadas em YP glicose 20 g L⁻¹. Os consumos de celobiose e produção de etanol estão ilustrados em (a), enquanto as atividades enzimáticas e de transporte de *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (através da formação de *p*-nitrofenol utilizando células permeabilizadas e células intactas, respectivamente) estão ilustradas em (b).



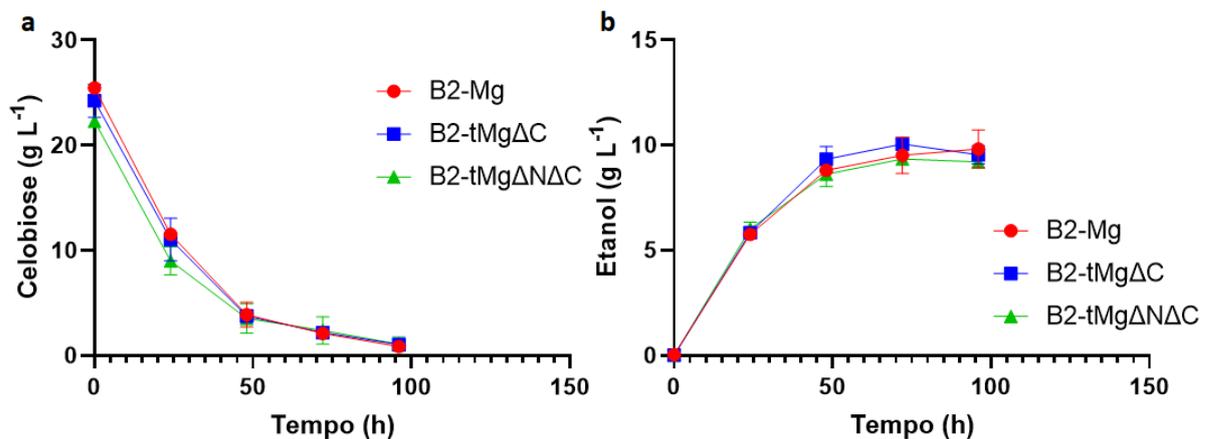
Os demais experimentos utilizando linhagens laboratoriais sobrexpressando β-glicosidase intracelular e transportador de celobiose em plasmídeos de cópia múltipla foram realizados utilizando linhagens mais próximas da CENPK-B2-MgCBT2 devido ao seu melhor desempenho aqui relatado.

Outro resultado relacionado às condições de cultivo observado no presente trabalho foi: células previamente expostas à glicose apresentaram uma menor velocidade de crescimento em celobiose em comparação com células cultivadas exclusivamente em celobiose (dados não mostrados). O tempo necessário para que as linhagens crescidas apenas em YP celobiose 20 g L⁻¹ (já a partir de meio sólido)

atingissem concentrações celulares suficientes para o início de experimentos de crescimento ou fermentação, era cerca de 24 h menor do que quando comparado com as mesmas linhagens crescidas anteriormente em meio Sc otimizado URA⁻TRP⁻ contendo glicose. Bae e colaboradores (2014), que desenvolveram diversas linhagens de *S. cerevisiae* expressando β -glicosidase GH1-1 de *N. crassa* e diferentes transportadores de celobiose de *N. crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Thielavia terrestris* e *Trichoderma reesei*, também relatam que, apesar das β -glicosidases e transportadores estarem sob regência de promotores fortes e constitutivos (*GPDp*), todas as linhagens desenvolvidas apresentaram uma longa fase lag que pôde ser diminuída através do cultivo prévio das linhagens em meio contendo celobiose.

Para identificar possíveis impactos da mudança na estratégia de metodologia de pré cultivo sobre os experimentos subsequentes, foi realizado um ensaio fermentativo (**Figura 22**) nos mesmos moldes dos experimentos ilustrado nas **Figuras 16** e **17**, porém, utilizando células pré-crescidas apenas em YP celobiose 20 g L⁻¹. Como é possível observar, todas as linhagens testadas contendo β -glicosidase intracelular e alguma versão do transportador de celobiose foram capazes de consumir praticamente toda celobiose presente no meio, restando menos de 5% do açúcar inicial ao final de 96 h de fermentação, com um rendimento em torno de 0,42 g g⁻¹ e velocidade de consumo em torno de 0,42 g h⁻¹ para cada uma das três linhagens. Isso indica que o cultivo apenas em celobiose, por si só, já é capaz de melhorar o desempenho fermentativo das linhagens.

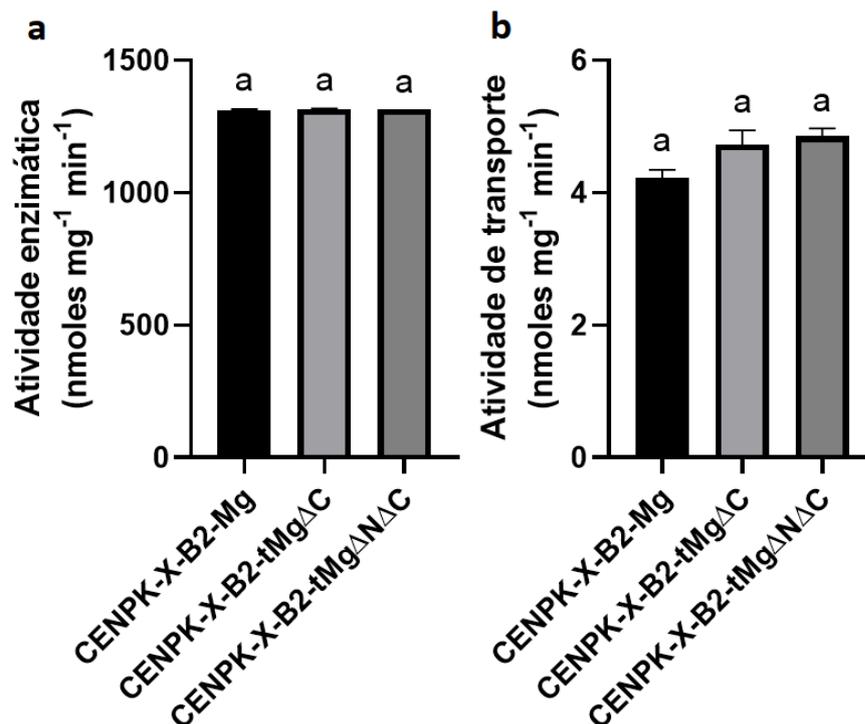
Figura 22: Ensaio fermentativo das linhagens CENPK-X-B2-Mg (quadrados vermelhos), CENPK-X-B2-tMg Δ C (triângulos azuis) e CENPK-X-B2-tMg Δ N Δ C (triângulos verdes) em meio YP contendo aproximadamente 20 g L⁻¹ de celobiose como fonte de carbono. Células pré-inoculadas em YP celobiose 20 g L⁻¹. Em (a) estão ilustradas as concentrações de celobiose e em (b) as concentrações de etanol ao longo do experimento.



Com a melhora no desempenho fermentativo observado por todas as linhagens pré-crescidas apenas em celobiose, esse experimento não foi capaz de indicar qual versão do transportador MgCBT2 garante maior vantagem no consumo de celobiose.

Para analisar se as linhagens expressando as diferentes versões do transportador MgCBT2 apresentavam diferentes atividades de transporte e de hidrólise enzimática do *p*-NβG, foram realizados experimentos pontuais para mensurar as atividades enzimática e de transporte com o conjunto de linhagens após 48 h de crescimento em meio YP celobiose 20 g L⁻¹ (**Figura 23**). Como esperado, as três linhagens apresentaram atividade enzimática idêntica, (cerca de 1308 nmoles mg⁻¹ min⁻¹) (**Figura 23a**). As atividades de transporte foram estatisticamente iguais para todas as linhagens, com valor de aproximadamente 4,6 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ (**Figura 23b**). Esses resultados indicam que as modificações realizadas nas extremidades do transportador MgCBT2 não alteram sua atividade de transporte.

Figura 23: Comparação entre (a) atividade (nmoles mg⁻¹ min⁻¹) da β-glicosidase em solução de células permeabilizadas na presença de 10 mM de *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (*p*-NβG) e (b) de transporte por células intactas na presença de 7,5 mM de *p*-NβG das três de background laboratorial: CENPK-X-B2-Mg, CENPK-X-B2-tMgΔC e CENPK-X-B2-tMgΔNΔC. Médias e desvio padrão seguidas da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Tuckey.



Li e colaboradores (2016b) já relataram que o desenvolvimento de versões truncadas de transportadores de glicose/xilose alteram apenas a estabilidade na membrana e não o perfil de crescimento e consumo dos açúcares testados, enquanto outras versões (com porções maiores do transportador removido) apresentavam piora em ambos os perfis.

4.8. INTEGRAÇÃO GENÔMICA DOS GENES *SpBGL2* E/OU DAS DIFERENTES VERSÕES DO GENE *MgCBT2* NAS LINHAGENS INDUSTRIAIS

Para auxiliar na correta inserção dos genes e evitar a inserção de genes marcadores, utilizou-se o sistema CRISPR-Cas9 (através do vetor pV1382), com sgRNAs específicos para as regiões nos *loci ARS208a* e *ARS1309a*, nos quais se planejou inserir os genes. O sistema CRISPR-Cas9, quando na presença do correto sgRNA, promove um corte em ambas as fitas do DNA alvo e, assim, ativa o sistema de reparo celular. Se, além do sistema de corte, for fornecido um módulo de reparo (que possua regiões similares ao ponto de corte) para a célula, a mesma tenderá a utilizar o módulo de reparo fornecido como molde para realizar o reparo via recombinação homóloga (CONG & ZHANG, 2015).

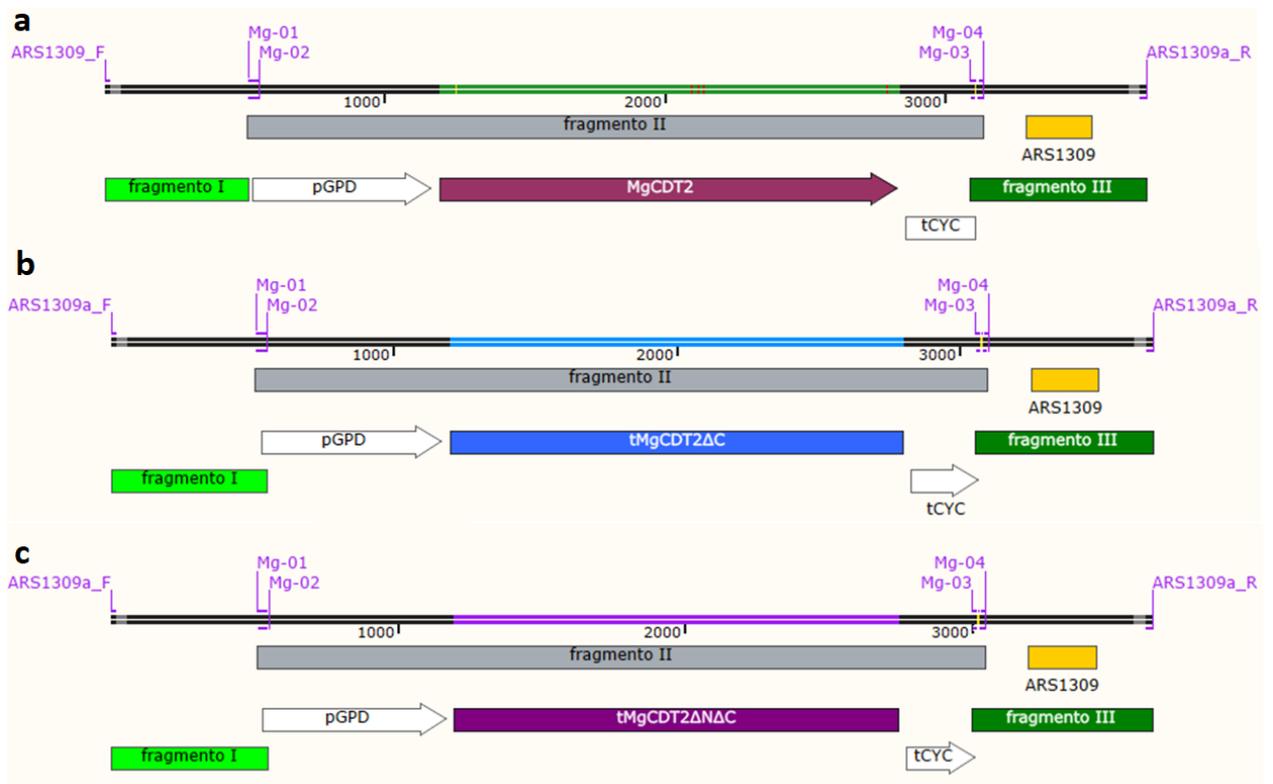
Uma vez que os plasmídeos que garantem a expressão e direcionamento do sistema CRISPR-Cas9 foram desenvolvidos corretamente (vide tópico anterior), buscou-se construir fragmentos de DNA que pudessem operar como módulos de reparo através de recombinação homóloga e, ao mesmo tempo, inserir no genoma das linhagens os módulos de sobreexpressão dos genes de interesse do presente trabalho.

Para isso, módulos de reparo contendo cada uma das versões do *MgCBT2* (**Figura 24**) foram desenvolvidos através da união de fragmentos de DNA distintos por Gibson Assembly. Cada um desses procedimentos de Gibson Assembly visava a formação de uma única molécula de DNA resultante da união de três fragmentos de DNA distintos. Os fragmentos eram: (I) fragmento de DNA com 515 pb idênticos à região à montante do ponto de corte do sítio *ARS1309a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar); (II) fragmento de DNA contendo o promotor *GPDp*, a versão desejada do *MgCBT2* e o terminador *CYCt* (obtido por PCR utilizando os plasmídeos p426-*MgCBT2*, p426-t*MgCBT2* Δ C ou p426-t*MgCBT2* Δ N Δ C como DNA molde) e; (III) fragmento de DNA com 624 pb idênticos à região à jusante do ponto de corte do sítio *ARS1309a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar).

Já para a inserção do gene *SpBGL2*, se desenvolveu, via Gibson Assembly, um módulo de reparo consistido por 5 fragmentos de DNA distintos (**Figura 25**): (I) fragmento de DNA com 695 pb idênticos à região à montante do ponto de corte do sítio *ARS208a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar); (II) fragmento de DNA contendo os 608 pb imediatamente à montante da região codificante do gene *TEF1*, correspondentes à sua região promotora (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar); (III) fragmento de DNA contendo o gene *SpBGL2* (obtido por PCR utilizando o plasmídeo p424-*SpBGL2* como DNA molde); (IV) fragmento de DNA contendo os 428 pb imediatamente à jusante da região codificante do gene *PGK1*, correspondentes à sua região terminadora (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar), e; (V) fragmento de DNA com 742 pb idênticos à região à jusante do ponto de corte do sítio *ARS208a* (obtido por PCR de colônia das linhagens que se desejava modificar).

Devido à menor eficiência intrínseca da técnica de Gibson Assembly para unir mais de três fragmentos de DNA em uma única molécula, optou-se pela construção circular do módulo de reparo para inserção do módulo de sobreexpressão do gene *SpBGL2*. Para tal, utilizou-se o vetor pMV como plataforma para circularização e seleção em bactéria, na qual o vetor pMV foi utilizado como molde para amplificação por PCR utilizando os iniciadores pMV_F e pMV_R (**Tabela 1**), amplificando a porção contendo origem de replicação em *E. coli* e gene que confere resistência à ampicilina para seleção das transformantes. Essa porção amplificada por PCR foi adicionada aos cinco fragmentos descritos acima e, via Gibson Assembly, os seis produtos de PCR foram unidos de modo a formar uma molécula circular (**Figura 25**).

Figura 24: Esquema ilustrando o resultado final da técnica de Gibson Assembly para formar o módulo de reparo para sobreexpressão do gene *MgCBT2* e suas variações no sítio *ARS1309*. (a) *MgCBT2*, (b) *tMgCBT2ΔC* e (c) *tMgCBT2ΔNΔC*. Os iniciadores utilizados para amplificar cada um dos fragmentos estão destacados (em rosa), paralelos às regiões onde se anelam.

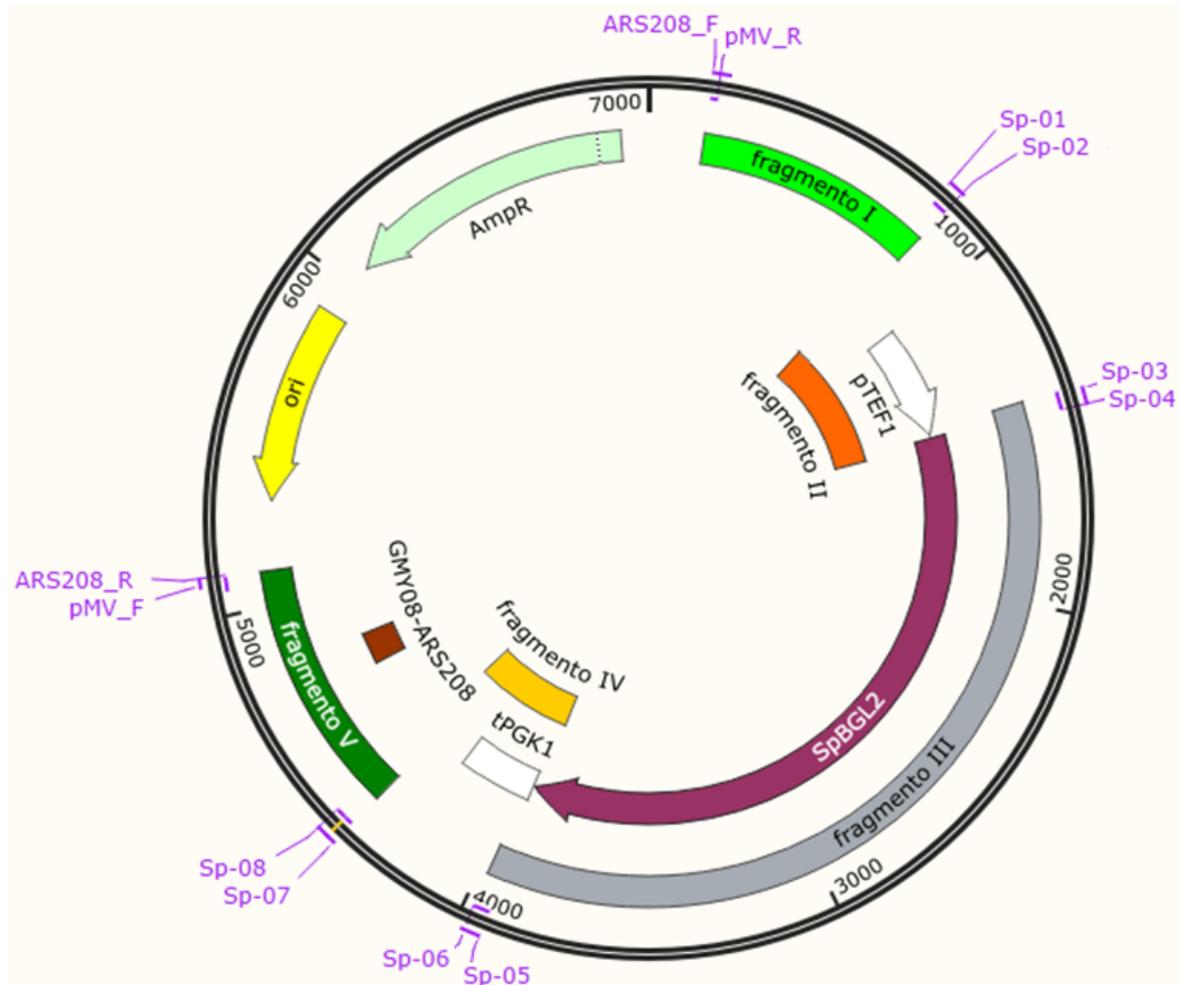


As linhagens GMY-X-RDK e MP-C5H1 foram transformadas com os plasmídeos pV1382-ARS208 e o módulo de reparo 5'ARS208-TEF1p-*SpBGL2*-PGK1t-3'ARS208 (amplificado por PCR utilizando o par de iniciadores ARS209_F + ARS209_R e o plasmídeo pMV-pTEF1-*SpBGL2*-tPGK1 como DNA molde) e/ou com o plasmídeo pV1382-ARS1309 e um dos módulos de reparo que continham cada uma das diferentes variantes do gene *MgCBT2*: (1) 5'ARS1309-GPDp-*MgCBT2*-CYC1t-3'ARS1309, (2) 5'ARS1309-GPDp-*tMgCBT2ΔC*-CYC1t-3'ARS1309 ou (3) 5'ARS1309-GPDp-*tMgCBT2ΔNΔC*-CYC1t-3'ARS1309. Esses módulos foram obtidos através de PCR utilizando os iniciadores ARS1309_F + ARS1309_R e, como molde,

os produtos resultantes de cada reação de Gibson Assembly contendo os respectivos módulos de sobreexpressão e os iniciadores.

Após as transformações, foram selecionadas colônias de cada uma das transformantes e as corretas inserções foram confirmadas via sequenciamento das regiões de inserção de cada módulo. Para tal, foram utilizados os iniciadores seq.ARS1309-Mg-1_F, seq.ARS1309-Mg-2_F, seq.MgCDT2-begin-R, seq.ARS1309-Mg-3_F, seq.ARS1309-Mg-4_F, seq.ARS1309-Mg-5_F, seq.MgCDT2-F2, seq.MgCDT2-R2, seq.ARS1309-Mg-6_F, seq.MgCDT2-end-F, seq.ARS1309-Mg-7_R, seq.ARS1309-Mg-8_R, seq.ARS209-B2-1_F, seq.ARS209-B2-2_F, seq.ARS209-B2-3_R, seq.ARS209-B2-4_F, seq.SpBGL2-1_F, seq.ARS209-B2-5_F, seq.SpBGL2-2_F, seq.ARS209-B2-6_F, seq.SpBGL2-3_R, seq.ARS209-B2-7_F e seq.ARS209-B2-8_R.

Figura 25: Esquema ilustrando o resultado final da técnica de Gibson Assembly realizado para formar o plasmídeo pMV-pTEF1-SpBGL2-tPGK1, que contém o módulo de reparo desenhado para integrar no sítio *ARS208* o módulo de sobreexpressão do gene *SpBGL2*. Os fragmentos destacados consistem de: (I) região idêntica àquela presente à montante do ponto de corte no sítio *ARS208a*; (II) região promotora do gene *TEF1*; (III) região codificante do gene *SpBGL2*; (IV) região terminadora do gene *PGK1* e; (V) região idêntica àquela presente à jusante do ponto de corte no sítio *ARS208a*. Os iniciadores utilizados para amplificar cada um dos fragmentos (e o vetor pMV linearizado) estão destacados (em rosa), paralelos às regiões onde se anelam. Também estão visíveis o gene *AmpR*, para seleção de bactérias, além da região em amarelo (*ori*) sendo a origem de replicação de bactéria.



4.9. ENSAIOS DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO EM CELOBIOSE DAS LINHAGENS INDUSTRIAIS

Para identificar se a estratégia de inserção de apenas uma cópia de cada um dos genes que codificam a via de metabolização de celobiose no genoma de linhagens industriais de *S. cerevisiae* é capaz de permitir o consumo desse dissacarídeo, foi realizado um ensaio de crescimento em celobiose com a linhagem GMY-X-B2 (controle expressando β -glicosidase, mas não expressando transportador) e GMY-X-B2-Mg (**Figura 26 a e b**). Como esperado, a linhagem controle não apresentou nem consumo e nem crescimento significativo. Porém, o crescimento da linhagem GMY-X-B2-Mg foi discreto e com uma extensa fase lag. Atingindo uma densidade óptica (DO (600 nm) superior a 5 após 200 h de

experimento, com DO máxima de aproximadamente 8,3 em 240 h, consumindo apenas $\sim 1,6 \text{ g L}^{-1}$ de celobiose. Também foram comparados os desempenhos de crescimento e consumo de celobiose entre as linhagens GMY-X-B2-tMg Δ C e GMY-X-B2-tMg Δ N Δ C (**Figura 26 c e d**). A linhagem contendo a versão truncada do transportador tanto em N quanto em C-terminal apresentou um crescimento modesto similar ao observado na linhagem contendo o transportador original, porém superou a DO = 5 em aproximadamente 144 h, atingindo DO = $\sim 16,9$ em 240 h, e consumindo cerca de $3,83 \text{ g L}^{-1}$ de celobiose ao longo do experimento. Apenas a linhagem GMY-X-B2-tMg Δ C (expressando tanto a SpBGL2 quanto o tMgCBT2 Δ C) apresentou capacidade de consumo de toda celobiose presente no meio ($\sim 20 \text{ g L}^{-1}$), depletando-a em 192 h e atingindo DO = 39,0. Durante o ensaio, não foi produzido quantidades relevantes de etanol. Apesar do crescimento e consumo superiores, essa linhagem apresentou uma longa fase lag, de aproximadamente 96 h.

Lin e colaboradores (2014), ao investigarem o uso e modulação de promotores e fatores de transcrição para melhorar o consumo de celobiose de linhagens de *S. cerevisiae* expressando β -glicosidase GH1-1 e o transportador CDT-1 de *N. crassa*, também notaram a existência de uma extensa fase lag em suas linhagens. A duração das fases lag das diferentes linhagens desenvolvidas, em meio fermentativo sintético otimizado, girou em torno de 74,28 h e 58,32 h.

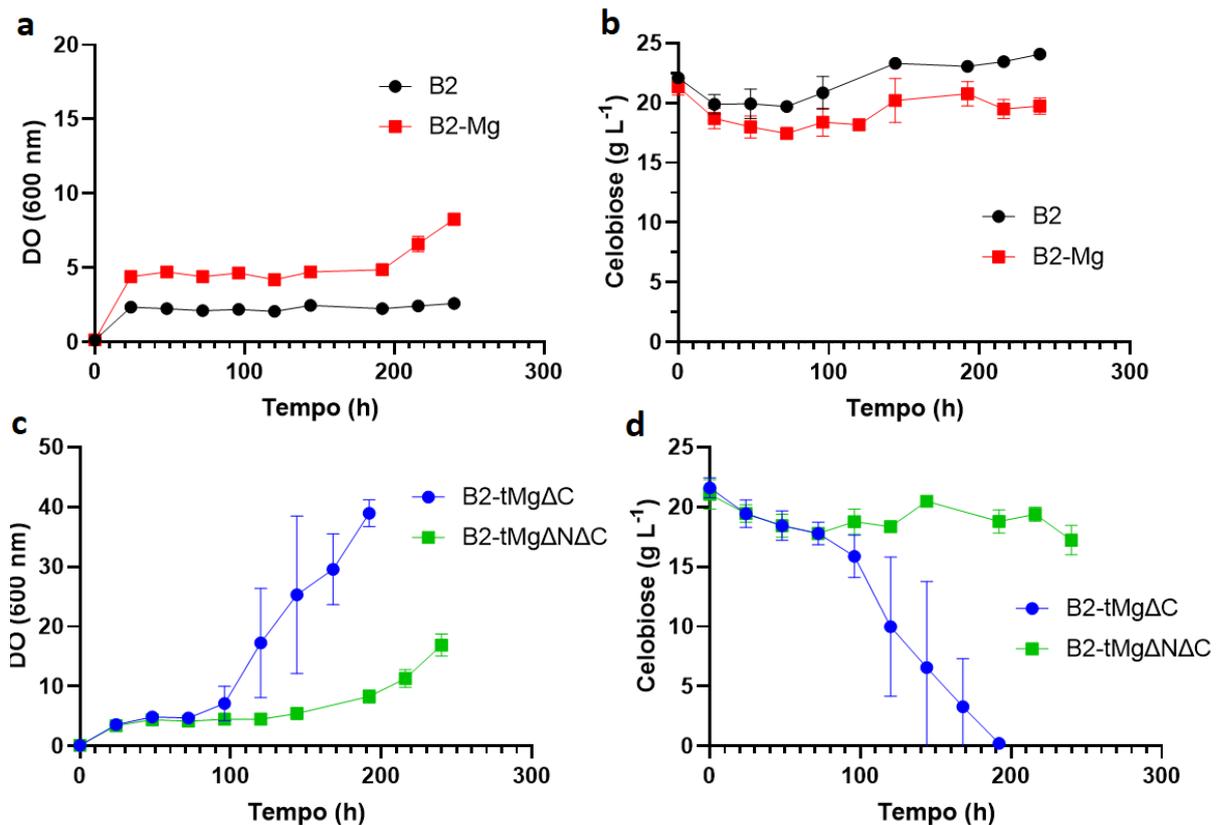
Chomvong e colaboradores (2017), também desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* contendo o transportador CDT-1 e a β -glicosidase GH1-1 intracelular LYP1 de *N. crassa*, expressos sob promotores fortes e constitutivos (*pPGK1* e *pTDH3*, respectivamente) e observaram uma fase lag superior a 72 h, em meio fermentativo sintético otimizado, podendo ser reduzida significativamente mediante diminuição da concentração de ATP intracelular.

Recentemente, Bermejo (2022) desenvolveu linhagens de *S. cerevisiae* contendo a via de consumo de celobiose presente em cópia única no genoma e a linhagem não foi capaz de consumir celobiose ou crescer em meio contendo esse dissacarídeo. Ao realizar ensaios de atividade enzimática em extratos celulares, foi verificado uma baixa atividade de β -glicosidase. Também foram desenvolvidas linhagens expressando o transportador de celodextrina em plasmídeo episossomal de cópia múltipla e, mesmo assim, a linhagem não foi capaz de crescer em celobiose ou consumir essa fonte de carbono. Foi então hipotetizado que a presença em cópia única da β -glicosidase intracelular não era capaz de gerar expressão em quantidade suficiente da enzima a ponto de permitir o consumo de celobiose pelas linhagens.

Apesar do presente trabalho ter selecionado genes e *loci* diferentes dos escolhidos por Bermejo (2022), os resultados descritos na **Figura 26** indicam que é possível obter atividades enzimáticas e de transporte suficientes para permitir consumo de celobiose e crescimento celular em linhagens contendo apenas uma cópia do gene que codifica a β -glicosidase intracelular e uma cópia do gene que codifica o transportador. Essa conclusão também é corroborada por outros trabalhos que expressaram transportador de celobiose e β -glicosidase intracelular em cópias únicas no genoma (CHOMVONG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2022). Porém, é interessante ressaltar que os cultivos realizados por Bermejo (2022) utilizaram meios

sintéticos com baixas concentrações aminoacídica e, quando se compara os resultados ilustrados na **Figura 16**, fica evidente que a composição do meio fermentativo influencia os resultados de consumo de celobiose.

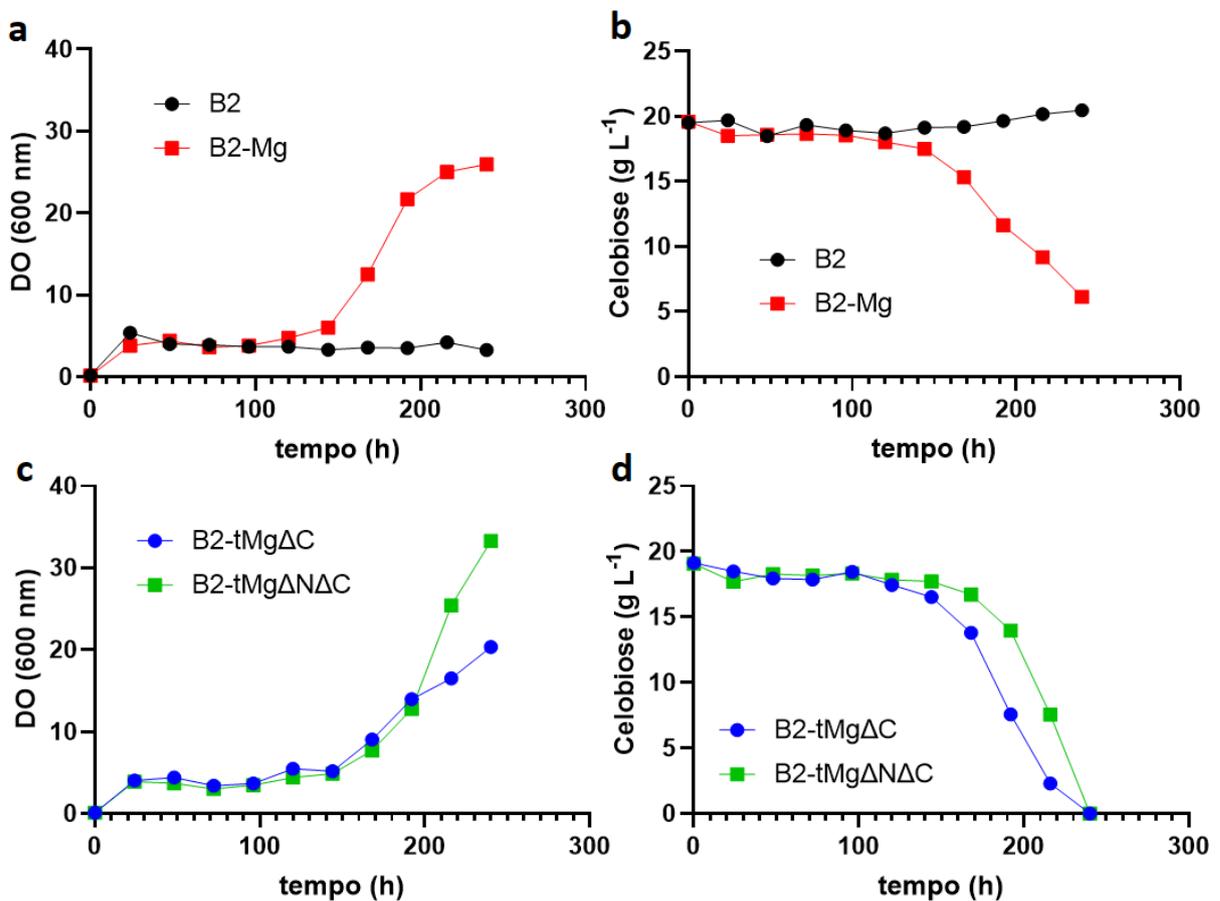
Figura 26: Ensaio de crescimento em meio YP contendo aproximadamente 20 g L⁻¹ de celobiose como fonte de carbono. Células pré-inoculadas em YP glicose 20 g L⁻¹. Ilustrados em (a) e (b), respectivamente, as densidades ópticas (DO) à 600nm e as concentrações de celobiose ao longo do experimento com as linhagens GMY-X-B2 (círculos pretos) e GMY-X-B2-Mg (quadrados vermelhos). Ilustrados em (c) e (d), respectivamente, as densidades ópticas (DO) à 600nm e as concentrações de celobiose ao longo do experimento com as linhagens GMY-X-B2-tMgΔC (triângulos azuis) e GMY-X-B2-tMgΔNΔC (triângulos verdes).



Analisando os resultados do ensaio de crescimento em celobiose das linhagens oriundas da MP-C5H1 (**Figura 27**), percebe-se que a extensa fase lag é encontrada também nessas linhagens. Ao final do experimento com a linhagem contendo β -glicosidase e a versão selvagem do transportador (MgCBT2) (**Figura 27 c e d**), ainda havia cerca de 31,3% de celobiose residual, com velocidade de consumo de 0,11 g h⁻¹ nas últimas 96 h de experimento e a linhagem controle (expressando apenas a β -glicosidase) não apresentou capacidade de crescimento relevante e não consumiu celobiose. As linhagens contendo as versões modificadas do transportador (tMgCBT2ΔC e tMgCBT2ΔNΔC) (**Figura 27 c e d**) foram capazes de consumir toda celobiose presente no meio em até 240 h, com velocidades de consumo nas últimas 96 h sendo ligeiramente superiores para a linhagem tMgCBT2ΔC (0,18 g h⁻¹) quando comparado com a linhagem tMgCBT2ΔNΔC (0,17 g

h⁻¹). Nenhuma das linhagens foi capaz de produzir concentrações significativas de etanol.

Figura 27: Ensaio de crescimento em meio YP contendo 20 g L⁻¹ de celobiose como fonte de carbono. Linhagens MPC5H1-B2 (círculos pretos) foi pré inoculada em YP glicose 20 g L⁻¹ e demais linhagens foram pré-inoculadas em YP celobiose 20 g L⁻¹. Resultados com linhagem MPC5H1-B2 e MPC5H1-B2-Mg (quadrados vermelhos) estão ilustrados em (a) – densidades ópticas (DO) à 600nm – e em (b) – concentrações de celobiose ao longo do experimento. Resultados com linhagem MPC5H1-B2-tMgΔC (triângulos azuis) e MPC5H1-B2-tMgΔNΔC (triângulos verdes) estão ilustrados em (c) – densidades ópticas (DO) à 600nm – e em (d) – concentrações de celobiose ao longo do experimento.



Diferente do observado no crescimento realizado com as linhagens oriundas da GMY-X-RDK (**Figura 26**), todas as linhagens contendo a via completa de consumo de celobiose foram capazes de crescer e consumir essa fonte de carbono. Esse resultado é interessante pois, diferente do experimento ilustrado na **Figura 26**, em que as células passaram por etapa de pré-crescimento em meio Sc otimizado URA⁻ TRP⁻ com 20 g L⁻¹ de glicose, as linhagens utilizadas para o experimento ilustrado na **Figura 27** foram cultivadas apenas em meio YP com 20 g L⁻¹ de celobiose. Isso reforça o encontrado em experimento prévio com linhagem laboratorial, ilustrado nas **Figuras 17** e **22**, em que a capacidade de consumo de celobiose utilizando células pré-crescidas apenas nesse dissacarídeo é superior

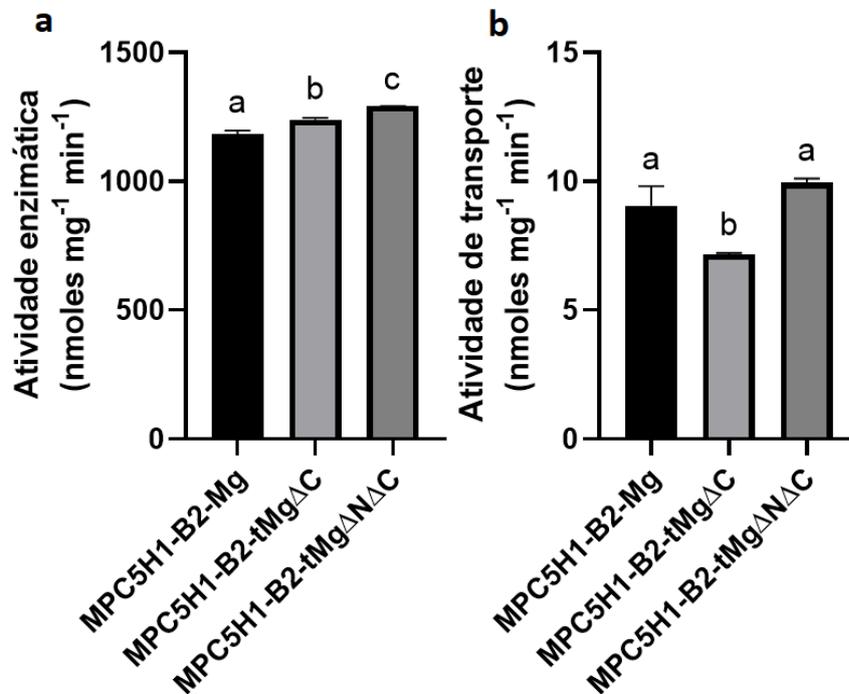
quando comparado com o consumo de celobiose de células pré-crescidas em alguma etapa anterior em meio contendo glicose.

De forma idêntica ao realizado com as linhagens laboratoriais no experimento ilustrado na **Figura 23**, foi realizado um experimento para analisar e comparar as atividades pontuais de transporte e de hidrólise enzimática de *p*-N β G das linhagens industriais expressando a enzima SpBGL2 e cada uma das diferentes versões do transportador MgCBT2 (**Figura 28**). Inesperadamente, os níveis de atividade enzimática das três linhagens foram estatisticamente diferentes, com a linhagem MPC5H1-B2-Mg apresentando menor atividade (~ 1183 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), a linhagem MPC5H1-B2-tMg Δ C apresentando atividade de ~ 1240 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ e a linhagem MPC5H1-B2-tMg Δ N Δ C maior atividade (~ 1308 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Apesar disso, essas atividades são próximas das encontradas nas linhagens laboratoriais (**Figura 23a**). Também inesperados foram os resultados de atividade de transporte (**Figura 28b**), em que as linhagens MPC5H1-B2-Mg e MPC5H1-B2-tMg Δ N Δ C apresentaram valores similares e levemente superiores ($9,5$ nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) ao observado na linhagem MPC5H1-B2-tMg Δ C ($7,2$ nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Apesar de os genes que codificam as versões do transportador estarem presentes em cópia única no genoma das linhagens industriais, enquanto a expressão dos mesmos genes ser realizada em plasmídeo de cópia múltipla nas linhagens laboratoriais, todos os resultados de atividade de transporte nas linhagens industriais foram superiores aos encontrados nas linhagens laboratoriais (**Figura 23b**).

As linhagens derivadas da MP-C5H1 também foram desafiadas em ensaio fermentativo (**Figura 29**). Todas as linhagens foram capazes de consumir celobiose e produzir etanol, sendo que a linhagem contendo o transportador tMgCBT2 Δ N Δ C apresentou o melhor desempenho, com rendimento de $0,37$ g g^{-1} , velocidade de consumo de $0,22$ g h^{-1} nas primeiras 72 h e restando apenas cerca de 5,31% de celobiose residual ao fim do experimento. O percentual de celobiose restante nos experimentos com as linhagens contendo o transportador MgCBT2 e o tMgCBT2 Δ C foi de 44,77% e 57,51%, respectivamente.

É interessante notar que, apesar de apresentarem maior atividade de transporte quando comparadas com as linhagens laboratoriais oriundas da CENPK-X-RDK, (**Figuras 28 e 23**, respectivamente), os desempenhos em fermentação de celobiose das linhagens derivadas da MP-C5H1 foram inferiores. Esses resultados indicam que os diferentes desempenhos de consumo de celobiose encontrados nessas linhagens com diferentes backgrounds não se deve apenas pelas diferentes estratégias de expressão/número de cópias dos genes (expressão em cópia única no genoma ou em plasmídeo de cópia múltipla), mas também em virtude de outras características fisiológicas das linhagens.

Figura 28: Comparação entre (a) atividade ($\text{nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) da β -glicosidase em solução de células permeabilizadas na presença de 10 mM de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-N β G) e (b) de transporte por células intactas na presença de 7,5 mM de *p*-N β G das três de background industrial: MPC5H1-B2-Mg, MPC5H1-B2-tMg Δ C e MPC5H1-B2-tMg Δ N Δ C. Médias e desvio padrão seguidas da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Tuckey.



Apesar disso, Oh e colaboradores (2016) utilizaram engenharia evolutiva de linhagens de *S. cerevisiae* contendo tanto o transportador de celobiose (codificado pelo gene *cdt-1*) quanto uma β -glicosidase intracelular (codificada pelo gene *gh1-1*) de *N. crassa* em seu genoma e identificaram que, dentre outras modificações a nível genômico, houve amplificação no número de cópias dos genes *cdt-1* e *gh1-1*, mantendo uma proporção de 1:2, respectivamente, nas linhagens com melhores capacidades fermentativas. Essa proporção entre o número de cópias desses dois genes também foi observada no trabalho de Zhang e colaboradores (2022), indicando que a proporção do número de cópias dos genes (e conseqüente nível de expressão dos mesmos) é importante para a eficiência fermentativa.

As linhagens derivadas da GMY-X-RDK também foram avaliadas quanto à sua capacidade de fermentar celobiose (**Figura 30**). Seguindo o mesmo padrão que o observado pelas diferentes linhagens oriundas da MP-C5H1, na **Figura 29**, todas as linhagens foram capazes de consumir celobiose e produzir etanol, sendo que a linhagem contendo o transportador tMgCBT2 Δ N Δ C também apresentou o melhor desempenho, consumindo toda a celobiose presente no meio, com velocidade de consumo de $0,16 \text{ g h}^{-1}$ nas primeiras 120 h e rendimento de $0,43 \text{ g g}^{-1}$. O percentual de celobiose restante nos experimentos com as linhagens contendo o transportador MgCBT2 e o tMgCBT2 Δ C foi de 64,65% e 70,48%, respectivamente.

Figura 29: Ensaio fermentativo em meio YP contendo 20 g L⁻¹ de celobiose como fonte de carbono. Linhagens MPC5H1-B2 (círculos pretos) foi pré inoculada em YP glicose 20 g L⁻¹ e demais linhagens foram pré-inoculadas em YP celobiose 20 g L⁻¹. Resultados com linhagem MPC5H1-B2 e MPC5H1-B2-Mg (quadrados vermelhos) estão ilustrados em (a) – concentrações de celobiose – e em (b) – concentrações de etanol ao longo do experimento. Resultados com linhagem MPC5H1-B2-tMgΔC (triângulos azuis) e MPC5H1-B2-tMgΔNΔC (triângulos verdes) estão ilustrados em (c) – concentrações de celobiose – e em (d) – concentrações de etanol ao longo do experimento.

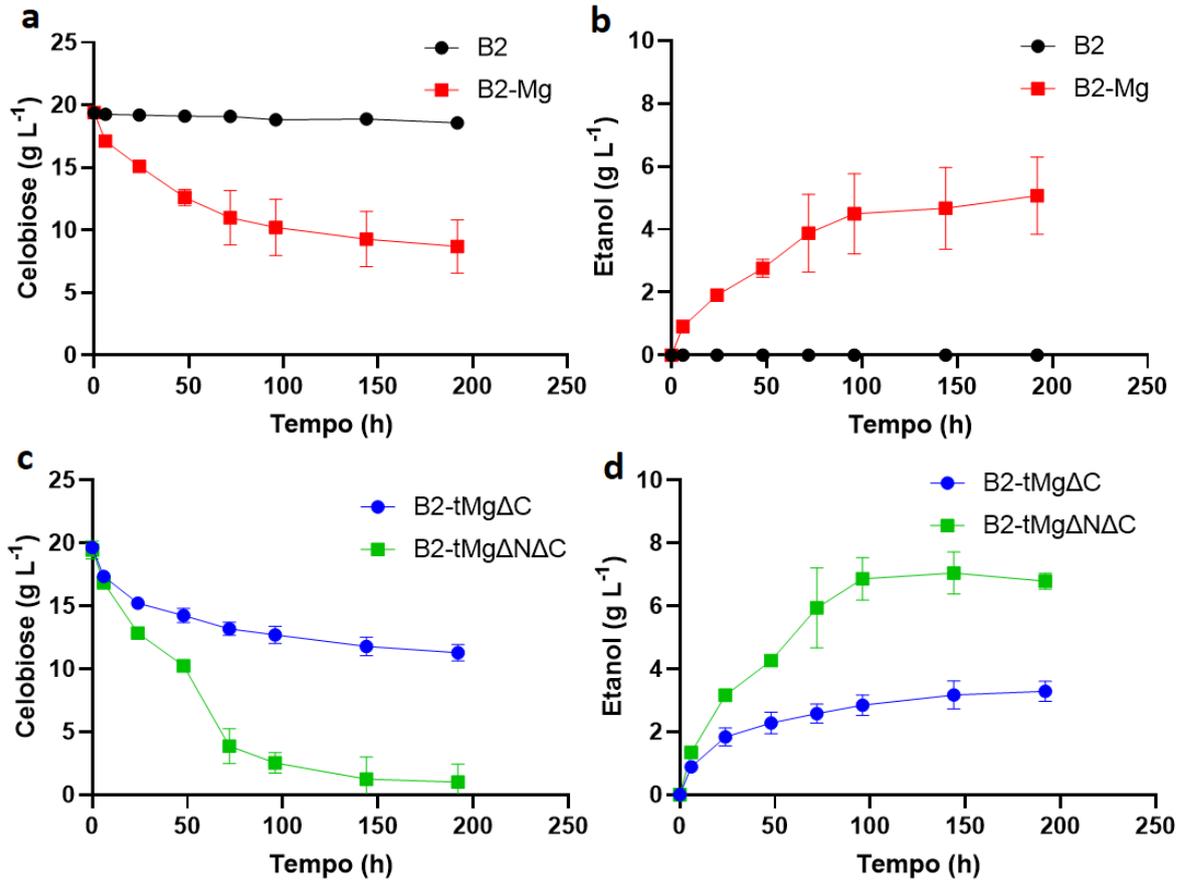
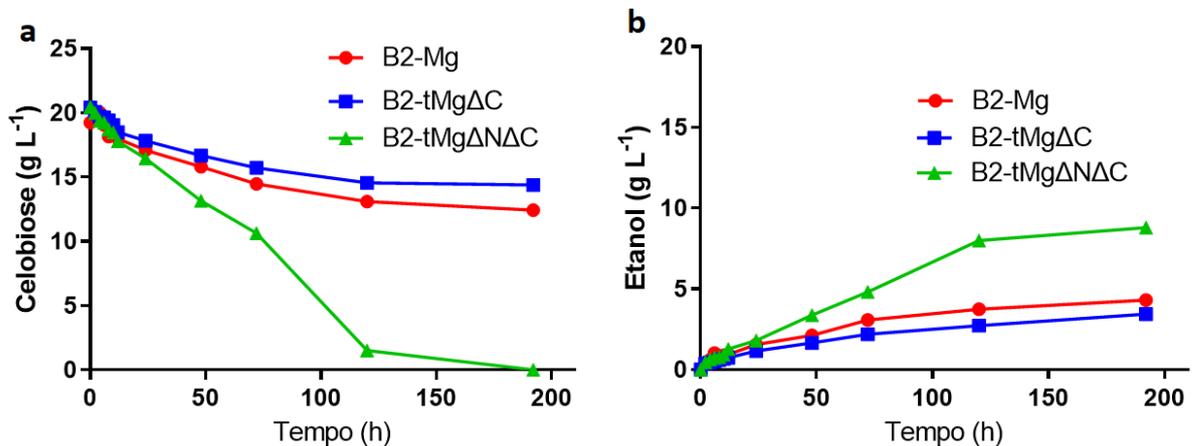


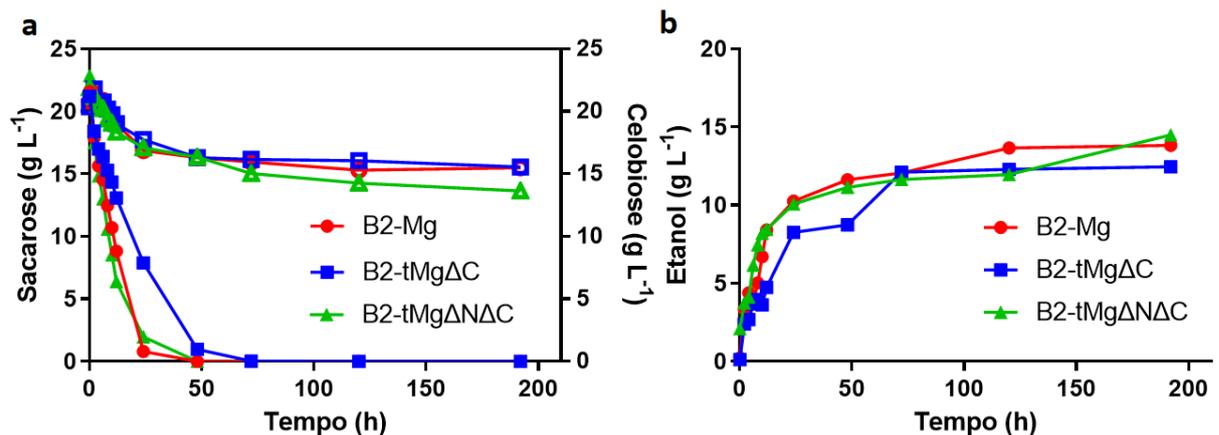
Figura 30: Ensaio fermentativo das linhagens GMY-X-B2-Mg (círculos vermelhos), GMY-X-B2-tMgΔC (quadrados azuis) e GMY-X-B2-tMgΔNΔC (triângulos verdes) em meio YP contendo aproximadamente 20 g L⁻¹ de celobiose. Células pré-inoculadas em YP celobiose 20 g L⁻¹. Em (a) estão ilustradas as concentrações de celobiose e em (b) as concentrações de etanol ao longo do experimento.



Esses resultados indicam que, em meio fermentativo (em condições de microarobiose), as linhagens contendo o transportador $tMgCBT2\Delta N\Delta C$ possuem vantagem em relação as suas linhagens irmãs que expressam as outras versões desse transportador. Esses resultados são contrastantes quando comparados com os experimentos de crescimento (com agitação e livre troca gasosa com a atmosfera), em que as linhagens GMY-X-B2- $tMg\Delta C$ e MPC5H1-B2- $tMg\Delta C$ tiveram vantagem (de maior ou menor grau) do que suas respectivas irmãs contendo outras versões do transportador $MgCBT2$. São necessários mais estudos para identificar a razão pela qual esse fenômeno ocorre.

Visando avaliar o potencial iSUCCELL das linhagens derivadas da GMY-X-RDK, foram realizados ensaios de co-fermentação de sacarose e celobiose (**Figura 31**). Apesar de todas as três linhagens, GMY-X-B2- Mg , GMY-X-B2- $tMg\Delta C$ e GMY-X-B2- $tMg\Delta N\Delta C$, terem conseguido consumir completamente a sacarose com rendimentos de $0,51\text{ g g}^{-1}$, $0,48\text{ g g}^{-1}$ e $0,47\text{ g g}^{-1}$, respectivamente, o consumo de aproximadamente 20 g L^{-1} só se deu após 24 h de experimento, explicitando velocidades de consumo de $0,87\text{ g h}^{-1}$, $0,28\text{ g h}^{-1}$ e $0,87\text{ g h}^{-1}$. Esses resultados de velocidade de consumo de sacarose são muito inferiores que o observado pela linhagem parental desenvolvida por Müller e colaboradores (2023) que foi capaz de consumir aproximadamente 200 g L^{-1} em menos de 10 h, com velocidade de consumo superior a 20 g h^{-1} .

Figura 31: Ensaio co-fermentativo das linhagens GMY-X-B2- Mg (círculos vermelhos), GMY-X-B2- $tMg\Delta C$ (quadrados azuis) e GMY-X-B2- $tMg\Delta N\Delta C$ (triângulos verdes) em meio YP contendo 20 g L^{-1} de sacarose e mais 20 g L^{-1} celobiose como fonte de carbono. Células pré-inoculadas em YP celobiose 20 g L^{-1} . Em (a) estão ilustradas as concentrações de sacarose e celobiose e em (b) as concentrações de etanol ao longo do experimento.



Além disso, quando comparado com os resultados de fermentação contendo apenas celobiose (**Figura 30**), a co-fermentação com sacarose leva a um pior consumo de celobiose, com porcentagem residual sendo de 74,48%, 76,42% e 62,32% para as linhagens contendo o transportador $MgCBT2$, $tMgCBT2\Delta C$ e o $tMgCBT2\Delta N\Delta C$, respectivamente.

Chomvong e colaboradores (2017) também desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* que expressa a via hidrolítica de consumo de celobiose intracelular e, visando elucidar os fatores responsáveis pelo consumo mais lento desse dissacarídeo, comparam os níveis de metabólitos nas células cultivadas em celobiose com o de células cultivadas em glicose. Apesar da rota de metabolização de celobiose diferir pouco da rota de consumo de glicose, o perfil fisiológico das células é alterado drasticamente.

A via glicolítica é regulada principalmente de forma pós-transcricional (DARAN-LAPUJADE *et al.*, 2007), e sua regulação influencia diretamente a eficiência de consumo de celobiose, sendo que o consumo lento de celobiose em linhagens expressando o transportador de celodextrinas e a β -glicosidase intracelular se deve à inativação da enzima Fosfofrutocinase-1 (Pfk1), devido a altas concentrações de ATP intracelular durante o consumo de celobiose, freando a via glicolítica (CHOMVONG *et al.*, 2017). A Pfk1 é responsável pela reação de fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1-6-bisfosfato, sendo um dos passos regulatórios da glicólise e possuindo o ATP como inativador alostérico. Algumas modificações foram capazes de melhorar, de forma independente e isoladas, o desempenho fermentativo de celobiose, como a expressão de uma Pfk1 insensível a ATP, expressão da ATPase de membrana Pma1 constitutivamente ativa (para diminuir as concentrações de ATP celular) e a deleção dos receptores membranares Snf3 e Rgt2, que regulam o transporte de glicose e, indiretamente, os níveis de ATP (CHOMVONG *et al.*, 2017).

O consumo lento de celobiose observado nas fermentações das linhagens industriais, com uma extensa fase lag, pode ser explicado devido à uma possível alta concentração de ATP celular apresentada por essas células. De forma similar, a piora na capacidade de consumo de celobiose apresentado durante os ensaios de co-fermentação com sacarose poderia ser devido a um aumento ainda maior dos níveis internos de ATP, ocasionado pela fermentação de sacarose. A inativação alostérica da Pfk1 devido aos altos níveis de ATP também poderia ser responsável pela piora no consumo de sacarose dessas linhagens durante a co-fermentação celobiose/sacarose, em comparação com a linhagem parental desenvolvida por Müller e colaboradores (2023) durante a fermentação de sacarose.

Para melhor compreender o metabolismo de células consumindo celobiose via rota de hidrólise intracelular, é interessante antes reanalisar a forma como *S. cerevisiae* regula seu metabolismo de acordo com a presença ou ausência de glicose nos meios intra e extracelular. Como bem descrito no capítulo de STASYK & STASYK (2019), a glicose é a fonte de carbono utilizada preferencialmente por *S. cerevisiae* e também exerce papel fundamental na regulação metabólica de leveduras através de três vias de sinalização: via de repressão por glicose, mediada por Mig1-Hxk2; via AMP cíclico (AMPC)/proteína-quinase A (PKA); e via sensor/receptor-repressor, mediada por Snf3/Rgt2.

A Hxk2 é uma enzima bifuncional, com atividade citosólica catalítica (fosforilando glicose a glicose-6-fosfato) e também agindo como importante regulador da expressão gênica envolvida na repressão catabólica por glicose.

Quando na presença de glicose, a Hxk2 tem papel fundamental, agindo em conjunto da Mig1, para repressão da utilização de outras fontes de carbono, da gliconeogênese e da atividade mitocondrial (NEHLIN & RONNE, 1990; GANCEDO, 1998; TREITEL *et al.*, 1998; MORENO *et al.*, 2005; CONRAD *et al.*, 2014; KAYIKCI & NIELSEN, 2015).

A proteína-cinase ativada por AMP, Snf1, é um elemento central na integração da sinalização da repressão por glicose com a sinalização dos níveis energéticos de leveduras (HEDBACKER & CARLSON, 2008; PETRANOVIC *et al.*, 2010; COCCETTI *et al.*, 2018). Sua ativação é responsável pela troca de um metabolismo fermentativo para um respiratório (MCCARTNEY & SCHMIDT, 2001; HONG *et al.*, 2003). Tanto Hxk2 quanto Mig1 são fosforiladas pela Snf1 quando na presença de baixas concentrações de glicose, o que inativa suas funções de repressores transcricionais (KRIEGL *et al.*, 1994; PAPAMICHOS-CHRONAKIS *et al.*, 2004; AHUATZI *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2012). Quando na presença de glicose, a fosfatase Glc7 desfosforila tanto Hxk2 quanto Mig1, permitindo suas ações de repressão na transcrição gênica (RANDEZ-GIL *et al.*, 1998; RUBENSTEIN *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2012).

Dessa forma, células expressando a via hidrolítica de consumo intracelular de celobiose, quando na presença desse dissacarídeo, podem apresentar altas concentrações de glicose intracelular formadas pela hidrólise da celobiose, o que levaria ao aumento na atividade da Glc7 e consequente desfosforilação da Hxk2 e Mig1, ativando a via de repressão gênica pela presença de glicose, o que deveria promover o perfil fermentativo.

A proteína-cinase A (PKA) regula a fisiologia da célula de diversas formas. Se ativa, age promovendo características relacionadas ao rápido crescimento e fermentação, ao mesmo tempo que reprime o crescimento respiratório lento, a fase estacionária, o acúmulo de carboidrato (glicogênio e trealose), a tolerância ao estresse, etc. (THEVELEIN & DE WINDE, 1999; THEVELEIN, 2004; CONRAD *et al.*, 2014). Também já foi descrito que a exposição à glicose leva ao aumento da concentração de AMP cíclico (AMPc) e da ativação da PKA (THEVELEIN, 1984; WANG *et al.*, 2004).

O mecanismo de ativação da via AMPc-PKA na presença de glicose já foi elucidado e envolve ativação da proteína Gpr1, um receptor transmembrana que responde à concentração extracelular de glicose (e sacarose) e promove cascata de sinalização mediada por proteína G (YUN *et al.*, 1997; XUE *et al.*, 1998; KRAAKMAN *et al.*, 1999; LEMAIRE *et al.*, 2004; CONRAD *et al.*, 2014). Uma das proteínas ativadas durante a cascata de sinalização desencadeada pela ativação da Gpr1 é a adenilato ciclase Cyr1, que converte ATP em AMPc (YUN *et al.*, 1997; YUN *et al.*, 1998; PEETERS *et al.*, 2006; STEYFKENS *et al.*, 2018) e as altas concentrações de AMPc promovem a ativação da PKA (TODA *et al.*, 1987; KRAAKMAN *et al.*, 1999).

De alguma forma ainda não elucidada, a presença de glicose intracelular ativa proteínas Ras (ROLLAND *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2004). As proteínas Ras são proteínas essenciais em *S. cerevisiae* e são parte das GTPases envolvidas principalmente na transdução de sinais e agem aumentando a produção de cAMP e,

consequentemente, ativando PKA (KATAOKA *et al.*, 1985; ROLLAND *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2004).

Desse modo, como em células cultivadas em celobiose a Gpr1 não estaria ativa (e consequentemente não estaria promovendo a formação de cAMP e ativação da PKA), essa via de sinalização estaria promovendo características respiratórias e de defesa contra estresse. Por outro lado, a presença de glicose intracelular poderia estar ativando as proteínas Ras, que tenderiam a aumentar a concentração de cAMP e ativação da PKA.

Os receptores Snf3/Rgt2 detectam os níveis extracelulares de glicose e promovem cascatas de sinalização para modular, principalmente, a expressão dos transportadores de hexoses HXTs (OZCAN *et al.*, 1996; OZCAN & JOHNSTON, 1999; KANIAK *et al.*, 2004; HORÁK, 2013). Enquanto o Snf3 é um receptor de alta afinidade por glicose, o Rgt2 é um receptor de baixa afinidade. Assim, a expressão dos transportadores de glicose de baixa afinidade é aumentada quando o Rgt2 está ativado (na presença de altas concentrações de glicose), e a expressão dos transportadores de alta afinidade é aumentada quando o Snf3 está ativado (na presença de baixas concentrações de glicose) (ÖZCAN, 2002). Já foi proposto que esses receptores também têm, de alguma forma, capacidade de avaliar a proporção da concentração de glicose entre o meio extra e intracelular, de modo a modular a expressão dos transportadores para manter a homeostase intracelular de glicose (KARHUMAA *et al.*, 2010).

Dessa forma, como células que expressam a via intracelular de metabolização de celobiose não encontram glicose no meio extracelular, ausência desta resultaria na não ativação desses receptores, levando ao bloqueio na síntese de transportadores de hexoses, o que poderia inclusive aumentar o espaço livre disponível na membrana plasmática para que mais transportadores heterólogos de celobiose, por exemplo, possam estar ativos na membrana. Isso deveria melhorar a fermentação de celobiose (a menos que a captação de celobiose não seja o problema).

Analisando as possibilidades (descritas acima) de regulação metabólica que a ausência de glicose extracelular e hidrólise intracelular de celobiose proporcionam, é possível que esse contexto metabólico esteja causando conflitos entre as vias de sinalização, levando a prejuízos no consumo e fermentação de celobiose. Inclusive, Lin e colaboradores (2014) identificaram que células cultivadas em celobiose apresentam ativação mitocondrial e redução da síntese de aminoácidos. Além disso, identificaram que tanto elementos da via AMPc-PKA, quanto Snf3 e Rgt2 e elementos da via Hxk2-Mig1 se encontravam apenas parcialmente ativos. Esses resultados corroboram o encontrado no presente trabalho, em que células cultivadas em celobiose na presença de oxigênio (ensaios de crescimento) são capazes de consumir o dissacarídeo, mas o respiram em vez de fermentar (**Figuras 26 e 27**), além de indicar conflito nas vias de sinalização de glicose.

Outro trabalho que busca melhorar a fermentação de celobiose é o desenvolvido por Zhang e colaboradores (2022). Nesse, os autores desenvolvem uma linhagem de *S. cerevisiae* contendo os genes que possibilitam o transporte de

celobiose e sua hidrólise intracelular em uma versão artificial do cromossomo V e submetem essa linhagem a eventos de Rearranjo e Modificação de Cromossomos Sintéticos por Evolução Mediada por *LoxP*sym, ou “*SCRaMbLE*” (do inglês *Synthetic Chromosome Rearrangement and Modification by LoxP*sym-mediated Evolution), que permite a obtenção rápida de diversos mutantes aleatórios via rearranjos cromossômicos. Fazendo análise das melhores linhagens obtidas pós evento de rearranjo cromossômico, identificaram tanto um aumento no número de cópias de ambos os genes que codificam a β -glicosidase intracelular e o transportador de celobiose quanto a deleção de dois genes: *MXR1* e *ADK2*. O gene *MXR1* codifica uma metionina-S-sulfoxido redutase, envolvida na resposta ao estresse oxidativo, regulação do tempo de vida celular, proteção contra inativação de clusters de ferro-enxofre, entre outros (MOSKOVITZ *et al.*, 1997; HANSEN, 1999; KOC *et al.*, 2004; SIDERI *et al.*, 2009), enquanto o gene *ADK2* codifica uma adenilato cinase mitocondrial, capaz de catalisar a síntese reversível de GTP e AMP a partir de GDP e ADP, podendo servir como via alternativa para a síntese de GTP ou ADP, dependendo das condições metabólicas (GU *et al.* 2005). A deleção do *ADK2* foi a responsável pelo aumento maior da capacidade de consumo de celobiose, e a explicação para isso poderia ser por conta de alterações nos níveis de ATP, de forma similar ao descrito por Chamvong e colaboradores (2017).

Blount e colaboradores (2018) também utilizaram *SCRaMbLE* na levedura com a versão artificial do cromossomo V, mas seu objetivo era o desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes (com a via *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*) com melhor capacidade de consumo de xilose. Interessantemente, dentre outras alterações, constataram que a deleção do gene *MXR1* também é capaz de melhorar o consumo de xilose. Esses resultados indicam que a deleção desse gene pode levar a melhora na expressão de vias metabólicas heterólogas em *S. cerevisiae*.

Assim, a versão truncada nas regiões N- e C-terminal do transportador MgCBT2 de *M. guilliermondii* e a β -glicosidase intracelular SpBGL2 de *Sp. passalidarum* se mostram muito promissoras para melhorar a internalização e hidrólise intracelular de celobiose (e conseqüente produção de etanol) por linhagens de *S. cerevisiae* que expressam ambos. Porém, provavelmente é necessário o emprego de outras estratégias que visem contornar as características fisiológicas apresentadas por *S. cerevisiae* que surgem em decorrência do consumo de celobiose, e que prejudicam a fermentação deste dissacarídeo que não é naturalmente metabolizado por esta levedura.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, é possível concluir que:

- A enzima SpBGL2 de *S. passalidarum* expressa em *S. cerevisiae* possui capacidade de hidrólise tanto de celobiose (K_m 18 mM, V_{max} 1.188 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$), como de pN β G (K_m 0,8 mM, V_{max} 5.368 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$), ou de pN β X (K_m 0,9 mM, V_{max} 1.088 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$), portanto com velocidade máxima e afinidade maior para o pN β G;
- O transportador MgCBT2 de *M. guilhermondii* expresso em *S. cerevisiae* possui capacidade de transporte de celobiose e dos substratos sintéticos pN β G e pN β X;
- Embora as células de *S. cerevisiae* expressando a enzima SpBGL2 e o transportador MgCBT2 sejam capazes de crescer em celobiose, a fermentação deste açúcar pelas células recombinantes ocorre de forma lenta e incompleta quando comparadas com fermentações de glicose;
- A diminuição no consumo de celobiose durante a fermentação ocorre devido a uma queda na atividade de transporte, e não na atividade de hidrólise intracelular do açúcar;
- O crescimento e fermentação de celobiose podem ser melhorados com a remoção de resíduos de lisina presentes nas extremidades N- e/ou C-terminais do transportador MgCBT2, através da truncagem das extremidades da permease;
- Em condições fermentativas, o transportador truncado nas duas extremidades (tMgCBT2 Δ N Δ C) se mostrou mais eficiente no consumo e fermentação de celobiose, do que o transportador MgCBT2 ou sua versão truncada apenas na extremidade C-terminal (tMgCBT2 Δ C);
- Um maior número de cópias dos genes SpBGL2 e MgCBT2 na levedura recombinante não necessariamente levam à uma relativa maior atividade enzimática e/ou de transporte e fermentação pelas células;
- A estratégia iSUCCELL, embora interessante, esbarra em outros problemas fisiológicos de *S. cerevisiae*, de forma que, além de inserir via de metabolização intracelular de celobiose em linhagens que hidrolisam sacarose intracelularmente, talvez seja necessário fazer outras modificações adicionais para garantir a co-fermentação eficiente de celobiose e sacarose pela levedura utilizando as vias de metabolização intracelular de ambos os dissacarídeos;
- São necessários mais estudos para identificar os motivos pelos quais o transportador tMgCBT2 Δ C permite um melhor consumo de celobiose em condições aeradas e o transportador tMgCBT2 Δ N Δ C permite um melhor consumo em condições de microaerobiose.

6. REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, J.; SMIRNOVA, I.; KASHO, V.; VERNER, G.; KABACK, H.R.; IWATA, S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. **Science**, v.30, p.610-615, 2003.
- ADELSBERGER, H.; HERTEL, C.; GLAWISCHNIG, E.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2257-2266, 2004.
- ADSUL, M. G. & GOKHALE, Digambar V. The conundrum of making biomass-to-biofuels economic. **Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 383-386, 2012.
- ADSUL, M.; SANDHU, S. K.; SINGHANIA, R. R.; GUPTA, R.; PURI, S. K.; MATHUR, A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. **Enzyme and microbial technology**, v. 133, p. 109442, 2020.
- AHUATZI, D.; RIERA, A.; PELA, R.; HERRERO, P.; MORENO, F. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. **Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4485-4493, 2007.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p.719-739, 2005.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S. L.; CORDIOLI, M. L. A.; MILETTI, L. C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2008.
- BAE, Y.H.; KANG, K.H.; JIN, Y.S.; SEO, J.H. Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases conferring efficient cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 169, p. 34-41, 2014.
- BARRETTO, D. A.; AVCHAR, R.; CARVALHO, C.; SAMPAIO, J. P.; VOOTLA, S. K.; BAGHELA, A. *Blastobotrys bombycis* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast isolated from the gut of the silkworm larva *Bombyx mori*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v.68(8), p.2638-2643. 2018.
- BARROS, K. O., SOUZA, R. M., PALLADINO, F., CADETE, R. M., SANTOS, A. R. O., GOES-NETO, A., ... & Rosa, C. A. *Cyberlindnera dasilvae* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from rotting wood and frass of cerambycid larva. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.71(9), p.004986. 2021.
- BASSO, T. O.; DE KOK, S., DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; ...; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 6, p. 694-703, 2011.

- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 26-33, 2005.
- BATT, C. A.; CARYALLO, S.; EASSON JR.; D. D.; AKEDO, M.; SINSKEY, A. J. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p.549-553, 1986.
- BECUWE, M.; VIEIRA, N.; LARA, D.; GOMES-REZENDE, J.; SOARES-CUNHA, C.; CASAL, M.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; VINCENT, O.; PAIVA, S.; LEON, S. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. **Journal of Cell Biology**, v.196, p.247–259. 2012.
- BERMEJO, P. M.; RAGHAVENDRAN, V.; GOMBERT, A. K. Neither 1G nor 2G fuel ethanol: setting the ground for a sugarcane-based biorefinery using an iSUCCELL yeast platform. **FEMS yeast research**, v. 20, n. 4, p. foaa027, 2020.
- BERMEJO, P. M. **Towards an iSUCCELL *Saccharomyces cerevisiae* platform for fuel ethanol production: Rumo a uma plataforma iSUCCELL de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol combustível.** Tese (Doutorado) em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2022.
- BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2008.
- BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016.
- BLOUNT, B. A.; GOWERS, G. F.; HO, J. C. H.; LEDESMA-AMARO, R.; JOVICEVIC, D.; MCKIERNAN, R. M.; ...; Ellis, T. Rapid host strain improvement by in vivo rearrangement of a synthetic yeast chromosome. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1932, 2018.
- BRASIL. DECRETO Nº 10.084, DE 5 DE NOVEMBRO DE 2019. Revoga o Decreto nº 6.961, de 17 de setembro de 2009. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, Edição 215, p. 2, 2019.
- BRASIL, C. N. A. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Guia de Financiamento para agricultura de baixo carbono/Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**, v. 1, p. 44, 2012. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/boletins/pib-do-agronegocio-termina-2018-estavel>>. Acesso 25 set 2022.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2304-2311, 2009.
- BRIENEN, R. J., PHILLIPS, O. L., FELDPAUSCH, T. R., GLOOR, E., BAKER, T. R., LLOYD, J., ... & ZAGT, R. J. Long-term decline of the Amazon carbon sink. **Nature**, v. 519, n. 7543, p. 344-348, 2015.

BUŠIĆ, A.; MARĐETKO, N.; KUNDAS, S.; MORZAK, G.; BELSKAYA, H.; ŠANTEK, M.I.; KOMES, D.; NOVAK, S.; ŠANTEK, B. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 289-311, 2018.

CADETE, R. M., SANTOS, R. O., MELO, M. A., MOURO, A., GONÇALVES, D. L., STAMBUK, B. U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A. ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9(8), p.1338-1342. 2009.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **Plos One**. v.7. p. 43135-11. 2012.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; ; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B.U.; LACHANCE, M-A; ROSA, C. A. *Spathaspora brasilienses* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov, *Spathaspora xylofermentans* sp. nov, four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie Van Leeuwenhouek**. v. 103, p. 421-23, 2013.

CADETE, R.M.; DE LAS HERAS, L.M.; SANDSTRÖM, A.G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M.; ROSA, C.A.; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1. 2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 167, p. 1-14, 2016.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T., ANTUNES, F. A. F., LUIZ DA COSTA FREITAS, W., DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M., DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; SILVA, M. B.; SILVÉRIO DA SILVA, S. The realm of cellulases in biorefinery development. **Critical reviews in biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 187-202, 2012.

CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. Lignin utilization: a review of lignin depolymerization from various aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 232-249, 2019.

CHOMVONG, K.; BENJAMIN, D. I.; NOMURA, D. K.; & CATE, J. H. Cellobiose consumption uncouples extracellular glucose sensing and glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **American Society for Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 10.1128/mbio. 00855-17, 2017.

CHUNDAWAT, S. P.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121-145, 2011.

CLAES, A.; DEPARIS, Q.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-

generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. **Metabolic engineering**, v. 59, p. 131-141, 2020.

COCSETTI, P.; NICASTRO, R.; TRIPODI, F. Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell**, v. 5, n. 11, p. 482, 2018.

COLOMBO, S.; RONCHETTI, D.; THEVELEIN, J. M.; WINDERICKX, J.; MARTEGANI, E. Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46715-46722, 2004.

CONG, L., & ZHANG, F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. **Chromosomal mutagenesis**. Humana Press, New York, NY, p. 197-217, 2015.

CONRAD, M.; SCHOTHORST, J.; KANKIPATI, H. N.; VAN ZEEBROECK, G.; RUBIO-TEXEIRA, M.; THEVELEIN, J. M. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 2, p. 254-299, 2014.

CUNHA, J. T.; SOARES, P. O.; ROMANÍ, A.; THEVELEIN, J. M.; DOMINGUES, L. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for biofuels**, v.12(1), p.1-14. 2019.

DARAN-LAPUJADE, P.; ROSSELL, S.; VAN GULIK, W. M.; LUTTIK, M. A.; DE GROOT, M. J.; SLIJPER, M.; ...; BAKKER, B. M. The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, n. 40, p. 15753-15758, 2007.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

DE SALES, B. B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D. L.; KNYCHALA, M. M.; MATSUSHIKA, A.; BON, E. P. S.; STAMBUK, B. U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing d-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1973-1982, 2015.

DE SOUZA, W. R. Microbial degradation of lignocellulosic biomass. In: CHANDEL, A. & DA SILVA, S. S. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization. **BoD-Books on Demand**, p. 207-247, 2013.

DEBUS, D.; METHNER, H.; SCHULZE, D.; DELLWEG, H. Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 287-291, 1983.

DELLA-BIANCA, B. E., DE HULSTER, E., PRONK, J. T., VAN MARIS, A. J. GOMBERT, A. K., 2014. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 8, p. 1196-1205, 2014.

DEN, W., SHARMA, V. K., LEE, M., NADADUR, G., VARMA, R. S. Lignocellulosic biomass transformations via greener oxidative pretreatment processes: access to energy and value-added chemicals. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 141, 2018.

DIAS, M. O., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ROSSELL, C. E., ... & BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

DIAS, M. O., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., PAVANELLO, L. G., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ... & BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72-78, 2013.

DOS SANTOS, L.V.; DE BARROS, G.M.C.; GALLARDO, J.C.M.; PIROLLA, R.A.S.; CALDERÓN, L.L.; DE CARVALHO-NETTO, O.V.; PARREIRAS, L.S.; CAMARGO, E.L.O.; DREZZA, A.L.; MISSAWA, S.K.; TEIXEIRA, G.S.; LUNARDI, I.; BRESSIANI, J.; PEREIRA, G.A.G. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 40-57, 2016.

DOS SANTOS, A. A. **Engenharia genômica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* visando prevenir a endocitose de transportadores de açúcares e aumentar a produção de etanol**. Tese (Doutorado) em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel d-xylose- specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 11, p. 2150-2156, 2010.

DU, J.; YUAN, Y.; SI, T.; LIAN, J.; & ZHAO, H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 18, p. e142-e142, 2012.

DU PREEZ, J.C.; VAN DER WALT, J.P. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 5, p. 357-362, 1983.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33-48, 2014.

DUNN, R. & HICKE, L. Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor mediated and fluid-phase endocytosis. **Molecular Biology of the Cell**. v.12, p.421-435, 2001.

ENTIAN, KARL-DIETER & KÖTTER, PETER. 23 yeast mutant and plasmid collections. **Methods in microbiology**, v. 26, p. 431-449, 1998.

ERDEI, B.; HANCZ, D.; GALBE, M.; ZACCHI, G. SSF of steam-pretreated wheat straw with the addition of saccharified or fermented wheat meal in integrated bioethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2013.

ERIKSEN, D. T.; HSIEH, P. C. H.; LYNN, P.; ZHAO, H. Directed evolution of a cellobiose utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously engineering multiple proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

- FERNÁNDEZ-GARCÍA, P.; PELÁEZ, R.; HERRERO, P.; MORENO, F. Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 42151-42164, 2012.
- FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, 28(7), 547-554. 2011.
- FERREIRA, D.; NOBRE, A.; SILVA, M. L.; FARIA-OLIVEIRA, F.; TULHA, J.; FERREIRA, C.; LUCAS, C. XYLH encodes a xylose/H⁺ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 7, p.585- 596, 2013.
- FREER, S. N. Fermentation and aerobic metabolism of cellodextrins by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 655-659, 1991.
- FREITAS, C. R., CARVALHO, R. A., OVIEDO, A. F. P. O financiamento da gestão ambiental no Brasil: uma avaliação a partir do orçamento público federal. **Instituto Socioambiental**, pp. 1-62, 2022
- FUJII, T.; YU, G.; MATSUSHIKA, A.; KURITA, A.; YANO, S.; MURAKAMI, K.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -xylosidase. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 6, p. 1140-1146, 2011.
- GAJEWSKA, B.; KAMIŃSKA, J.; JESIONOWSKA, A.; MARTIN, N. C.; HOPPER, A. K.; ŻOŁĄDEK, T. WW Domains of Rsp5p Define Different Functions: Determination of Roles in Fluid Phase and Uracil Permease Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v.157, p.91-101, 2001.
- GALAZKA, J. M., TIAN, C., BEESON, W. T., MARTINEZ, B., GLASS, N. L., CATE, J. H. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. **Science**, v. 330, n. (6000), p. 84-86, 2010.
- GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.
- GÁRDONYI, M.; OSTERBERG, M.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HAGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**. v.3, p.45-52, 2003.
- GATTI, L. V.; BASSO, L. S.; MILLER, J. B.; GLOOR, M.; GATTI DOMINGUES, L.; CASSOL, H. L.; ...; NEVES, R. A. Amazonia as a carbon source linked to deforestation and climate change. **Nature**, v. 595, n. 7867, p. 388-393, 2021.
- GIETZ, R. D. & WOODS, R. A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. **Yeast Protocol**. Humana Press, Totowa, NJ, 2006. p. 107-120.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.
- GOLDEMBERG, J. & NOGUEIRA, L. A. H. Sweetening the biofuel sector: The history of sugarcane ethanol in Brazil. **Bioenergy connection**, v. 3, p. 37-41, 2014.

GOMBERT, A. K. & VAN MARIS, A. J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 81-86, 2015.

GONÇALVES, D.L.; MATSUSHIKA, A.; BELISA, B.; GOSHIMA, T.; BON, E.P.; STAMBUK, B. U. Xylose and xylose/glucose cofermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 63, p.13–20. 2014.

GORE, J.; YOUK, H.; VAN OUDENAARDEN, A. Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 253-256, 2009.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. Molecular cloning. **A Laboratory Manual 4th**, 2012.

GU, Y.; GORDON, D. M.; AMUTHA, B.; PAIN, D. A GTP: AMP Phosphotransferase, Adk2p, in *Saccharomyces cerevisiae*: ROLE OF THE C TERMINUS IN PROTEIN FOLDING/STABILIZATION, THERMAL TOLERANCE, AND ENZYMATIC ACTIVITY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 19, p. 18604-18609, 2005.

GUAN, L. & KABACK, H. R. Lessons from lactose permease. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 35, p. 67-91, 2006.

GURGU, L.; LAFRAYA, Á.; POLAINA, J.; MARÍN-NAVARRO, J. Fermentation of cellobiose to ethanol by industrial *Saccharomyces* strains carrying the β -glucosidase gene (BGL1) from *Saccharomycopsis fibuligera*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5229-5236, 2011.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HA, S. J.; GALAZKA, J. M.; KIM, S. R.; CHOI, J. H.; YANG, X.; SEO, J. H.; JIN, Y. S. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p.504-509, 2011.

HA, S. J.; GALAZKA, J. M.; OH, E. J.; KORDIĆ, V.; KIM, H.; JIN, Y. S.; CATE, J. H. Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrin transporters. **Metabolic engineering**, v. 15, p. 134-143, 2013a.

HA, S. J.; KIM, H.; LIN, Y.; JANG, M. U.; GALAZKA, J. M.; KIM, T. J.; CATE, J. H. D, JIN, Y. S. Single amino acid substitutions in HXT2. 4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1500-1507, 2013b.

HA, S. J.; KIM, S. R.; KIM, H.; DU, J.; CATE, J. H.; JIN, Y. S. Continuous co-fermentation of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**, v. 149, p. 525-531, 2013c.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 933-943, 1994.

- HANSEN, J. Inactivation of MXR1 abolishes formation of dimethyl sulfide from dimethyl sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3915-3919, 1999.
- HEDBACKER, K. & CARLSON, M. SNF1/AMPK pathways in yeast. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 2408, 2008.
- HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane helix transporters. **Current opinion in cell biology**, v. 5, n. 4, p. 708-721, 1993.
- HENRISSAT, B. & DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 7, p. 637–644, 1997.
- HERPOEL-GIMBERT, I.; MARGEOT, A.; DOLLA, A.; JAN, G.; MOLLÉ, D.; LIGNON, S.; MATHIS, H.; SGOILLOT, J.-C.; MONOT, F.; ASTHER, M. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* Rut-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for Biofuels**. v. 1, n. 1, p.18-30, 2008.
- HOLLATZ, C. & STAMBUK, B.; U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 46, n. 3, p. 253-259, 2001.
- HONG, S. P.; LEIPER, F. C.; WOODS, A.; CARLING, D.; CARLSON, M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8839-8843, 2003.
- HORÁK, J.; WOLF, D. H. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 5, p. 1541-1549, 1997.
- HORÁK, J. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1614, n. 2, p. 139-155, 2003.
- HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Current genetics**, v. 59, p. 1-31, 2013.
- HOVSEPIAN, J.; DEFENOUILLE, Q.; ALBANÈSE, V.; VÁCHOVÁ, L.; GARCIA, C.; PALKOVÁ, Z.; LÉON, S. Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. **Journal of Cell Biology**. v.6, p.1811-1831, 2017.
- HUBAU, W.; LEWIS, S. L.; PHILLIPS, O. L.; AFFUM-BAFFOE, K.; BEECKMAN, H.; CUNÍ-SANCHEZ, A.; ...; ZEMAGHO, L. Asynchronous carbon sink saturation in African and Amazonian tropical forests. **Nature**, v. 579, n. 7797, p. 80-87, 2020.
- INESC. **Subsídios aos combustíveis fósseis no Brasil (2022): conhecer, avaliar, reformar**, v. 1, p. 35, 2022. Disponível em: < https://www.inesc.org.br/wp-content/uploads/2022/11/ESTUDO-COMBUSTIVEIS_final-1.pdf>. Acesso 25 jun 2023.
- INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Monitoramento do desmatamento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite - PRODES**.

Disponível em: <<http://www.obt.inpe.br/OBT/assuntos/programas/amazonia/prodes>>. Acesso em: 25 de setembro de 2022.

IPCC (Intergovernmental panel on climate change). **Climate change 2022: Impacts, adaptation and vulnerability**. IPCC Sixth Assessment Report. (2022). Disponível em:

<https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg2/downloads/report/IPCC_AR6_WGII_SummaryVolume.pdf>. Acesso em 22 de jun 2023.

JEFFRIES, T. W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology letters**, v. 3, n. 5, p. 213-218, 1981.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p.320-326, 2006.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.S.U.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 319-326, 2007.

JEPPSSON, M.; TRÄFF, K.; JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v.3(2), p.167-175. 2003.

JIANG, Z. Q.; DENG, W.; ZHU, Y. P.; LI, L. T.; SHENG, Y. J.; HAYASHI, K. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. (4), p. 207-213, 2004.

JIN, M.; DA COSTA SOUSA, L.; SCHWARTZ, C.; HE, Y.; SARKS, C.; GUNAWAN, C.; ...; DALE, B. E. Toward lower cost cellulosic biofuel production using ammonia based pretreatment technologies. **Green Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 957-966, 2016.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels*, **Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 2, p. 164-174, 2016.

JÖNSSON, L.J. & MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

JORDAN, D. B. & WAGSCHAL, K. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1647-1658, 2010.

KAFRI, M.; METZL-RAZ, E.; JONA, G.; BARKAI, N. The cost of protein production. **Cell reports**, v. 14, n. 1, p. 22-31, 2016.

KANIAK, A.; XUE, Z.; MACCOOL, D.; KIM, J. H.; JOHNSTON, M. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 1, p. 221-231, 2004.

KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R. G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose

isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial cell factories**, v.6(1), p.1-10. 2007.

KARHUMAA, K.; WU, B.; KIELLAND-BRANDT, M. C. Conditions with high intracellular glucose inhibit sensing through glucose sensor Snf3 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of cellular biochemistry**, v. 110, n. 4, p. 920-925, 2010.

KASAHARA T. & KASAHARA M. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. **Biochemical Journal**, v. 372, p. 247-252, 2003.

KASAHARA T.; ISHIGURO M.; KASAHARA M. Comprehensive chimeric analysis of amino acid residues critical for high affinity glucose transport by Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 30274-30278, 2004.

KATAOKA, Tohru; BROEK, Daniel; WIGLER, Michael. DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. **Cell**, v. 43, n. 2, p. 493-505, 1985.

KAYIKCI, Ö. & NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, p. fov068, 2015.

KELLEY, L. A., MEZULIS, S., YATES, C. M., WASS, M. N., STERNBERG, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, 2015.

KIM, S.R.; SKERKER, J.M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A.P.; JIN, Y.S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**. v.8, p.e57048, 2013.

KIM, H.; LEE, W. H.; GALAZKA, J. M.; CATE, J. H.; JIN, Y. S. Analysis of cellodextrin transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 1087-1094, 2014.

KIM, J. S., LEE, Y. Y., KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.

KIM, H.; OH, E. J.; LANE, S. T.; LEE, W. H.; CATE, J. H.; JIN, Y. S. Enhanced cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutant cellodextrin facilitator and cellobiose phosphorylase. **Journal of biotechnology**, v. 275, p. 53-59, 2018.

KNOSHAUG, E.P.; VIDGREN, V.; MAGALHÃES, F.; JARVIS, E.E.; FRANDEN, M.A.; ZHANG, M.; SINGH, A. Novel transporters from *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia guilliermondii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* enable growth on L-arabinose and D-xylose. **Yeast**, v. 32, n. 10, p. 615-628, 2015.

KNYCHALA, M. M. **Transporte e fermentação de xilose, celobiose e xilobiose por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes**. Tese (Doutorado) em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

KNYCHALA, M. M., DOS SANTOS, A. A., KRETZER, L. G., GELSLEICHTER, F., LEANDRO, M. J., FONSECA, C., STAMBUK, B. U. Strategies for efficient expression of heterologous monosaccharide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 84, 2022.

KOC, A.; GASCH, A. P.; RUTHERFORD, J. C.; KIM, H. Y.; & GLADYSHEV, V. N. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and-independent components of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 7999-8004, 2004.

KÖTTER, P. & CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 776-783, 1993.

KRAAKMAN, L.; LEMAIRE, K.; MA, P.; TEUNISSEN, A. W.; DONATON, M. C.; VAN DIJCK, P.; ...; THEVELEIN, J. M. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1002-1012, 1999.

KRIEGEL, T. M.; RUSH, J.; VOJTEK, A. B.; CLIFTON, D.; FRAENKEL, D. G. In vivo phosphorylation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 148-152, 1994.

KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G., SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

KUYPER, M.; HARHANGI, H. R.; STAVE, A. K.; WINKLER, A. A.; JETTEN, M. S.; DE LAAT, W. T.; ... PRONK, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 1, p. 69-78, 2003.

KWAK, S. & JIN, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 82, 2017.

LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L. H.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 575-591, 2006.

LAUWERS, E.; ERPAPAZOGLU, Z.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; ANDRÉ, B. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. **Trends in Cell Biology**, v.20, p.196-204, 2010.

LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺symporter. **Biochemical Journal**, v. 395, n. 3, p.543-549, 2006.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 4, p. 511-525, 2009.

LEE, H. The Structure and Function of Yeast Xylose (Aldose) Reductases. **Yeast**, v. 14, p. 977-984, 1998

LEE, W. -J.; KIM, M. -D.; RYU, Y. -W.; BISSON, L.F.; SEO, J. -H. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p.186-191, 2002.

LEE, R. C., HRMOVA, M., BURTON, R. A., LAHNSTEIN, J., FINCHER, G. B. Bifunctional Family 3 Glycoside Hydrolases from Barley with α -L-Arabinofuranosidase and β -D-Xylosidase Activity characterization, primary structures, and cooh-terminal processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. (7), p. 5377-5387, 2003.

LEMAIRE, K.; VAN DE VELDE, S.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular cell**, v. 16, n. 2, p. 293-299, 2004.

LÉON, S. & HAGUENAUER-TSAPIS, R. Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. **Experimental Cell Research**. v.315, p.1574-1583, 2009.

LI, A., GAO, X., REN, J., JIN, C., XUE, Y. BDM-PUB: computational prediction of protein ubiquitination sites with a Bayesian discriminant method. **BDM-PUB: Computational Prediction of Protein Ubiquitination Sites with a Bayesian Discriminant Method**, 2009.

LI, X.; YU, V. Y.; LIN, Y.; CHOMVONG, K.; ESTRELA, R.; PARK, A.; JIN, Y. S. Expanding xylose metabolism in yeast for plant cell wall conversion to biofuels. **eLIFE**, v. 4, e05896, 2015.

LI, X.; PARK, A.; ESTRELA, R.; KIM, S. R.; JIN, Y. S.; CATE, J. H. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology reports**, v. 9, p. 53-56, 2016a.

LI, H., SCHMITZ, O., ALPER, H. S. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 23, p. 10215-10223, 2016b.

LIN, C.H.; MACGURN, J.A.; CHU, T.; STEFAN, C.J.; EMR, S.D. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. **Cell**. v.135, p.714–725, 2008.

LIN, Y.; CHOMVONG, K.; ACOSTA-SAMPSON, L.; ESTRELA, R.; GALAZKA, J. M.; KIM, S. R.; ...; CATE, J. H. Leveraging transcription factors to speed cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2014.

LLOPIS-TORREGROSA, V.; FERRI-BLAZQUEZ, A.; ADAM-ARTIGUES, A.; DEFFONTAINES, E.; VAN HEUSDEN, G. P.; YENUSH, L. Regulation of the Yeast Hxt6 Hexose Transporter by the Rod1 α -Arrestin, the Snf1 Protein Kinase, and the Bmh2 14-3-3 Protein. **Journal of Biological Chemistry**. v.291, p.14973–14985, 2016.

LOPES, M. R.; BATISTA, T. M.; FRANCO, G. R.; RIBEIRO, L. R.; SANTOS, A. R.; FURTADO, C., MOREIRA, R.G.; GOES-NETO, A.; VITAL, M.J.S.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C. A. *Scheffersomyces stambukii* fa, sp. Nov., a d-xylose-fermenting species isolated from rotting wood. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v.68(7), p.2306-2312. 2018.

LOSORDO, Z.; MCBRIDE, J.; ROOYEN, J. V.; WENGER, K.; WILLIES, D.; FROEHLICH, A.; ...; LYND, L. Cost competitive second-generation ethanol production from hemicellulose in a Brazilian sugarcane biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 5, p. 589-602, 2016.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACDONALD, S. S., BLAUKOPF, M., WITHERS, S. G. N-acetylglucosaminidases from CAZy family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. (8), p. 4887-4895, 2015.

MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; USHIDA, K.; KANAI, D.; KATAHIRA, S.; SRIVASTAVA, A.; KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1067, 2009.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 5, p. 500, 2009.

MARGULIS, S. **Economia da mudança do clima no Brasil: custos e oportunidades**. Ibep Gráfica, 2010.

MATSUSHIKA, A. & SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, n. 3, p. 306-309, 2008.

MAYER, C., VOCADLO, D. J., MAH, M., RUPITZ, K., STOLL, D., WARREN, R. A. J., WITHERS, S. G. Characterization of a β -N-acetylhexosaminidase and a β -N-acetylglucosaminidase/ β -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. **The FEBS journal**, v. 273, n. (13), p.2929-2941, 2006.

MCCARTNEY, R. R. & SCHMIDT, M. C. Regulation of Snf1 kinase: activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36460-36466, 2001.

MERICO, A.; SULO, P.; PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p.976-989, 2007.

MESELSON, M. & YUAN, R. DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, n. 5134, p.1110-1114, 1968.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. **Breve Descrição do Proálcool e Perspectivas Futuras para o Etanol Produzido no Brasil**. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, n. 46, Rio Branco. 2008.

MILESSI, T. S.; AQUINO, P. M.; SILVA, C. R.; MORAES, G. S.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v.119, p.277-283. 2018.

MIRZA, O.; GUAN, L.; VERNER, G.; IWATA, S.; KABACK, H. R. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 6, p. 1177-1183, 2006.

MONTEIRO, C. R. M.; ÁVILA, P. F.; PEREIRA, M. A. F.; PEREIRA, G. N.; BORDIGNON, S. E.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B. U.; OLIVEIRA, D. de; GOLDBECK, R.; POLETTO, P. Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p. 117274, 2021.

MOON, J.; LIU, Z.L.; MA, M.; SLININGER, P.J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 247-254, 2013.

MORENO, F.; AHUATZI, D.; RIERA, A.; PALOMINO, C. A.; HERRERO, P. GLUCOSE sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n.1, p. 265–268, 2005.

MOSKOVITZ, J.; BERLETT, B. S.; POSTON, J. M.; & STADTMAN, E. R. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9585-9589, 1997.

MOURO, A.; DOS SANTOS, A. A.; AGNOLO, D. D.; GUBERT, G. F.; BON, E. P.; ROSA, C. A.; FONSECA, C.; STAMBUK, B. U. Combining xylose reductase from *Spathaspora arborariae* with xylitol dehydrogenase from *Spathaspora passalidarum* to promote xylose consumption and fermentation into xylitol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Fermentation**, 6(3), 72. 2020.

MÜLLER, G. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil**. Tese (Doutorado) em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MÜLLER, G.; DE GODOY, V. R.; DÁRIO, M. G.; DUVAL, E. H.; ALVES-JR, S. L.; BÜCKER, A.; ...; STAMBUK, B. U. Improved Sugarcane-Based Fermentation Processes by an Industrial Fuel-Ethanol Yeast Strain. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 8, p. 803, 2023.

MURPHY, L.; BOHLIN, C.; BAUMANN, M. J.; OLSEN, S. N.; SØRENSEN, T. H.; ANDERSON, L.; ...; WESTH, P. Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 3, p. 163-169, 2013.

NEHLIN, J. O. & RONNE, H. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. **The EMBO journal**, v. 9, n. 9, p. 2891-2898, 1990.

NGUYEN, N.; SUH, S.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesse* sp. nov. **Mycological Research**. v. 110, p. 1232-1241, 2006.

NIJLAND, J. G., VOS, E., SHIN, H. Y., DE WAAL, P. P., KLAASSEN, P., DRIESSEN, A. J. Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016.

NIKKO, E. & PELHAM, H. R. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. **Traffic**. v.10, p.1856 -1867, 2009.

NIU, Y.; WU, L.; SHEN, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; YI, Y.; LI, Y.; BAO, X. Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. **Cellulose**, v.26(13), p.7923-7937. 2019.

O'DONNELL, A. F.; MCCARTNEY, R. R.; CHANDRASHEKARAPPA, D. G.; ZHANG, B. B.; THORNER, J.; SCHMIDT, M. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and α -arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. **Molecular and Cellular Biology**. v.35, p.939-955, 2015.

OH, E. J.; SKERKER, J. M.; KIM, S. R.; WEI, N.; TURNER, T. L.; MAURER, M. J.; ...; JIN, Y. S. Gene amplification on demand accelerates cellobiose utilization in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, v. 82, n. 12, p. 3631-3639, 2016.

OLSON, D. G., MCBRIDE, J. E., SHAW, A. J., & LYND, L. R. Recent progress in consolidated bioprocessing. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 396-405, 2012.

ØSTBY, H.; HANSEN, L. D.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G.; VÁRNAI, A. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 9-10, p. 623-657, 2020.

OZCAN, S.; DOVER, J.; ROSENWALD, A. G.; WÖLFL, S.; JOHNSTON, M. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 22, p. 12428-12432, 1996.

ÖZCAN, S.; DOVER, J.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 17, n. 9, p. 2566-2573, 1998.

ÖZCAN, S. & JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 3, p. 554-569, 1999.

ÖZCAN, S. Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46993-46997, 2002.

PAIVA, S.; KRUCKEBERG, A. L.; CASAL, M. Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**. v.373, p.737-44, 2002.

PAO, S.S.; PAULSEN, I.T.; SAIER, M.H. Major facilitator superfamily. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 1, p. 1-34, 1998.

PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M.; GLIGORIS, T.; TZAMARIAS, D. The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. **EMBO reports**, v. 5, n. 4, p. 368-372, 2004.

PATIÑO, M.G.; ORTIZ, J.P.; VELÁSQUEZ, M.; STAMBUK, U. D-Xylose consumption by non-recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Yeast**. v. 36, p.3429, 2019.

PEETERS, T.; LOUWET, W.; GELADÉ, R.; NAUWELAERS, D.; THEVELEIN, J. M.; VERSELE, M. Kelch-repeat proteins interacting with the G α protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13034-13039, 2006.

PENG, B.; SHEN, Y.; LI, X.; CHEN, X.; HOU, J.; BAO, X. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 1, p. 9-18, 2012.

PEREIRA, I. D. O., DOS SANTOS, Â. A., GONÇALVES, D. L., PURIFICAÇÃO, M., GUIMARÃES, N. C., TRAMONTINA, R., ... & IENCZAK, J. L. Comparison of *Spathaspora passalidarum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for integration of first-and second-generation ethanol production. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 6, p. foab048, 2021.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**. v. 5, p.53–63, 2002.

PETRANOVIC, D.; TYO, K.; VEMURI, G. N.; NIELSEN, J. Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. **FEMS yeast research**, v. 10, n. 8, p. 1046-1059, 2010.

PHILLIPS, O. L., & BRIENEN, R. J. Carbon uptake by mature Amazon forests has mitigated Amazon nations' carbon emissions. **Carbon Balance and Management**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2017.

PIROVANO, W., FEENSTRA, K. A., HERINGA, J. PRALINE™: a strategy for improved multiple alignment of transmembrane proteins. **Bioinformatics**, v. 24, n.(4), p. 492-497, 2008.

PIROVANO, W., & HERINGA, J. Protein secondary structure prediction. **Data Mining Techniques for the Life Sciences**, p. 327-348, 2010.

PITKÄNEN, J. P.; ARISTIDOU, A.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p.16-31, 2003.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

QIAN, Y.; YOMANO, L. P.; PRESTON, J. F.; ALDRICH, H. C.; INGRAM, L. O. Cloning, characterization, and functional expression of the *Klebsiella oxytoca* xylo-dextrin utilization operon (*xynTB*) in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5957- 5967, 2003.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource technology**, v. 101, n. 24, p. 9624-9630, 2010.

RANDEZ-GIL, F.; HERRERO, P.; SANZ, P.; PRIETO, J. A.; MORENO, F. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 425, n. 3, p. 475-478, 1998.

REIDER APEL, A., D'ESPAUX, L., WEHRS, M., SACHS, D., LI, R. A., TONG, G. J., ... & MUKHOPADHYAY, A. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 1, p. 496-508, 2017.

REZANIA, S., ORYANI, B., CHO, J., TALAIEKHOZANI, A., SABBAGH, F., HASHEMI, B., RUPANI, P. F., MOHAMMADI, A. A. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: an overview. **Energy**, v. 199, p. 117457, 2020.

RFA, Renewable Fuel Association. **Annual fuel ethanol production: U.S. and World Ethanol production**. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso 22 ago 2022.

ROLLAND, F.; DE WINDE, J. H.; LEMAIRE, K.; BOLES, E.; THEVELEIN, J. M.; WINDERICKX, J. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 2, p. 348-358, 2000.

ROY, A., KIM, Y. B., CHO, K. H., KIM, J. H. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 9, p. 2878-2885, 2014.

RUBENSTEIN, E. M.; MCCARTNEY, R. R.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; SHIRRA, M. K.; ARNDT, K. M.; SCHMIDT, M. C. Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 1, p. 222-230, 2008.

SADIE, C. J.; ROSE, S. H.; DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H. Coexpression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1373-1380, 2011.

SAHIN-TÓTH, M.; KARLIN, A.; KABACK, H. R. Unraveling the mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 20, p. 10729-10732, 2000.

SAIER, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. (2), p. 354-411, 2000.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: **Cold spring Harbor Laboratory Press**. 2001.

SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A. J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v.77(6), p. 641-648. 2002.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SCHLITZER, R. L.; AHEARN, D. G. Characterization of atypical *Candida tropicalis* and other uncommon clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 511-516, 1982.

SCHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 3, n. 2, p. 89-92, 1981.

SCHNEIDER, H.; MALESZKA, R.; NEIRINCK, L. G.; VELIKY, I. A.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K. Ethanol production from D-xylose and several other carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and other yeasts. **Pentoses and Lignin**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 57-71, 1983.

SCHUSTER, B. G. & CHINN, M. S. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic feedstocks for ethanol fuel production. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 416-435, 2013.

SEDLAK, M. & HO, N. W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, v. 21, n. 8, p. 671-684, 2004.

SEN, A.; ACOSTA-SAMPSON, L.; AHN, J.; CATE, J.; THORNER, J. W. Internalization of heterologous cellodextrin transporters is mediated by endogenous α -arrestins in *Saccharomyces cerevisiae*. **MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL**, v. 26, 2015.

SEN, A.; ACOSTA-SAMPSON, L.; ALVARO, C.G.; AHN, J.S.; CATE, J.H.D.; THORNER, J. Internalization of heterologous sugar transporters by endogenous α -arrestins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7074-7085, 2016.

SHARMA, H. K., XU, C., QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 2, p. 235-251, 2019.

SHEWALE, J. G. β -Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. **International Journal of Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 435-443, 1982.

SIDERI, T. C.; WILLETTS, S. A.; AVERY, S. V. Methionine sulphoxide reductases protect iron-sulphur clusters from oxidative inactivation in yeast. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 2, p. 612, 2009.

SILVA, P. C.; CEJA-NAVARRO, J. A.; AZEVEDO, F.; KARAOZ, U.; BRODIE, E. L.; JOHANSSON, B. A novel d-xylose isomerase from the gut of the wood feeding beetle *Odontotaenius disjunctus* efficiently expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, v.11(1), p.1-12. 2021.

SIMOSSIS, V. A., KLEINJUNG, J., HERINGA, J. Homology-extended sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. (3), p. 816-824, 2005.

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SUKUMARAN, R. K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

SIPOS, B.; BENKO, Z.; DIENES, D.; RECZEY, K.; VIKARI, L.; SIIKA-AHO, M. Characterisation of Specific Activities and Hydrolytic Properties of Cell-Wall-Degrading Enzymes Produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on Different Carbon Sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p.347-364, 2009.

SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; LOMON, J. M.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Evaluation of a kinetic model for computer simulation of growth and fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* fed D-xylose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 8, p. 1532-1540, 2014.

SORDA, G.; BANSE, M.; KEMFERT, C. An overview of biofuel policies across the world. **Energy policy**, v. 38, n. 11, p. 6977-6988, 2010.

SØRENSEN, A.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S.; AHRING, B. K. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 612-631, 2013.

SORGEN, P. L.; HU, Y.; GUAN, L.; KABACK, H. R.; GIRVIN, M. E. An approach to membrane protein structure without crystals. **PNAS**. v. 99, p.14037-14040, 2002.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2017.

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D.; & SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **European journal of biochemistry**, v. 237, n. 3, p. 876-881, 1996.

STAMBUK, B. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. **Biochemical Education**, Exeter, England, v. 27, n.3, p. 177-180, 1999.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 89, n. 2, p. 212-214, 2000.

STAMBUK, B. U. Transcriptional and posttranslational regulation of a membrane nutrient transporter. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 30, n. 6, p. 388-393, 2002.

STAMBUK, B.U.; FRANDEN, M.A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology for fuels and chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 255-263, 2003.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.918-926, 2008.

STAMBUK, B. U. Yeasts: The leading figures on bioethanol production. **Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives**, 1st ed.; Treichel, H., Alves, SL, Jr., Fongaro, G., Müller, C., Eds, p. 57-91, 2019.

STASYK, O. G. & STASYK, O. V. Glucose sensing and regulation in yeasts. In: SIBIRNY, A. **Non-conventional yeasts: From basic research to application**, p. 477-519, 2019.

STERN, D. I. & KANDER, A. The Role of Energy in the Industrial Revolution and Modern Economic Growth. **The Energy Journal**. Vol. 33, No. 3, pp. 125-152. 2012

STEYFKENS, F.; ZHANG, Z.; VAN ZEEBROECK, G.; THEVELEIN, J. M. Multiple transceptors for macro-and micro-nutrients control diverse cellular properties through the PKA pathway in yeast: a paradigm for the rapidly expanding world of eukaryotic nutrient transceptors up to those in human cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 191, 2018.

SUBTIL, T. & BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p.14-26, 2012.

SWEENEY, M. D. & XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p.244-263, 2012.

TANG, W.; WU, X.; HUANG, C.; LING, Z.; LAI, C.; YONG, Q. Natural surfactant-aided dilute sulfuric acid pretreatment of waste wheat straw to enhance enzymatic hydrolysis efficiency. **Bioresource Technology**, v. 324, p. 124651, 2021.

TAVARES, J.M.; DUARTE, L.C.; AMARAL-COLLAÇO, M.T.; GÍRIO, F.M. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 9-10, p. 743-747, 2000.

TEUGJAS, H. & VÄLJAMÄE, P. Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for biofuels*, v. 6, p. 1-14, 2013 VAN RENSBURG, E.; DEN HAAN, R.; SMITH, J.; VAN ZYL, W. H.; GÖRGENS, J. F. The metabolic burden of cellulase expression by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Y294 in aerobic batch culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, p. 197-209, 2012.

THEVELEIN, J. M. Cyclic-AMP content and trehalase activation in vegetative cells and ascospores of yeast. **Archives of microbiology**, v. 138, p. 64-67, 1984.

THEVELEIN, Johan M.; DE WINDE, Johannes H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP–protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 5, p. 904-918, 1999.

THEVELEIN, J. Nutrient sensing through the plasma membrane of eukaryotic cells, Cirencester, UK, 25–29 September, 2004. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 303–305, 2004.

TODA, T.; CAMERON, S.; SASS, P.; ZOLLER, M.; WIGLER, M. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. **Cell**, v. 50, n. 2, p. 277-287, 1987.

TREITEL, M. A.; KUCHIN, S.; CARLSON, M. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 11, p. 6273-6280, 1998.

TRICHEZ, D. **Análise estrutural da permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2012.

TRICHEZ, D.; KNYCHALA, M. M.; FIGUEIREDO, C. M.; ALVES JR, S. L.; DA SILVA, M. A.; MILETTI, L. C.; ...; STAMBUK, B. U. Key amino acid residues of the AGT1 permease required for maltotriose consumption and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 2, p. 580-594, 2019.

TSUJIBO, H.; KOSAKA, M.; IKENISHI, S.; SATO, T.; MIYAMOTO, K.; INAMORI, Y. Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 4, 1029-1037, 2004.

TUSNADY, G. E., & SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 849-850, 2001.

UJWAL, M. L.; SAHIN-TÓTH, M.; PERSSON, B.; KABACK, H. R. Role of glutamate-269 in the lactose permease of *Escherichia coli*. **Molecular membrane biology**, v. 11, n. 1, p. 9-16, 1994.

VADYVALOO, V.; SMIRNOVA, I. N.; KASHO, V. N.; KABACK, H. R. Conservation of residues involved in sugar/H⁺ symport by the sucrose permease of *Escherichia coli* relative to lactose permease. **Journal of molecular biology**, v. 358, n. 4, p. 1051-1059, 2006.

VAN MARIS, A. J., ABBOTT, D. A., BELLISSIMI, E., VAN DEN BRINK, J., KUYPER, M., LUTTIK, M. A., WISSELINK, H. W., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.90, n. (4), p. 391-418, 2006.

VINUSELVI, P. & LEE, S. K. Engineering *Escherichia coli* for efficient cellobiose utilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 125-132, 2011.

VINUSELVI, P. & LEE, S. K. Engineered *Escherichia coli* capable of co-utilization of cellobiose and xylose. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 1, p. 1-4, 2012.

VYAS, V. K., BARRASA, M. I., FINK, G. R. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. **Science advances**, v. 1, n. 3, p. e1500248, 2015.

VYAS, V. K., BUSHKIN, G. G., BERNSTEIN, D. A., GETZ, M. A., SEWASTIANIK, M., BARRASA, M. I., ... & FINK, G. R. New CRISPR mutagenesis strategies reveal variation in repair mechanisms among fungi. **MSphere**, v. 3, n. 2, p. e00154-18, 2018.

WANG, Y.; PIERCE, M.; SCHNEPER, L.; GÜLDAL, C. G.; ZHANG, X.; TAVAZOIE, S.; BROACH, J. R. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. **PLoS biology**, v. 2, n. 5, p. e128, 2004.

WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; JIAO, C.; HOU, J.; ZHANG, Q.; SHEN, Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic engineering**, v. 30, p. 79-88, 2015.

WANG, Q., JIANG, F., LI, R. Assessing supply chain greenness from the perspective of embodied renewable energy—A data envelopment analysis using multi-regional input-output analysis. **Renewable Energy**, v. 189, pp. 1292-1305, 2022.

WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T.; VAN DEN BROEK, P. J. A.; VAN DIJKEN, J. P. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 4, p. 616-630, 1994

XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Proceedings of the twenty-fifth symposium on biotechnology for fuels and chemicals held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO.** Humana Press, Totowa, NJ, p. 1115-1126, 2004.

XUE, Y.; BATLLE, M.; HIRSCH, J. P. GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G α subunit and functions in a Ras-independent pathway. **The EMBO journal**, v. 17, n. 7, p. 1996-2007, 1998.

YOSHIDA, E., HIDAKA, M., FUSHINOBU, S., KOYANAGI, T., MINAMI, H., TAMAKI, H., KUMAGAI, H. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Journal**, v. 431, n. (1), p. 39-49, 2010.

YOUNG, E.; POUCHER, A.; COMER, A.; BAILEY, A.; ALPER, H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3311-3319, 2011.

YOUNG, E.; LEE, S. M. ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 24, 2010.

YUAN, Y. & ZHAO, H. Directed evolution of a highly efficient cellobiose utilizing pathway in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 11, p. 2874-2881, 2013.

YUN, C. W.; TAMAKI, H.; NAKAYAMA, R.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. G-protein coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 240, n. 2, p. 287-292, 1997.

YUN, C. W.; TAMAKI, H.; NAKAYAMA, R.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Gpr1p, a Putative G-Protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeastsaccharomyces cerevisiae. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 252, n. 1, p. 29-33, 1998.

YUN, E. J., OH, E. J., LIU, J. J., YU, S., KIM, D. H., KWAK, S.; JIN, Y. S. Promiscuous activities of heterologous enzymes lead to unintended metabolic rerouting in Saccharomyces cerevisiae engineered to assimilate various sugars from renewable biomass. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2018.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A. A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 913-919, 2012.

ZHANG, C.; ACOSTA-SAMPSON, L.; YU, V. Y.; CATE, J. H. Screening of transporters to improve xylodextrin utilization in the yeast Saccharomyces cerevisiae. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184730, 2017.

ZHANG, Y.; XU, Z.; LU, M.; DING, B.; CHEN, S.; WEN, Z.; ...; JIN, M. Rapid evolution and mechanism elucidation for efficient cellobiose-utilizing Saccharomyces cerevisiae through Synthetic Chromosome Rearrangement and Modification by LoxPsym-mediated Evolution. **Bioresource Technology**, v. 356, p. 127268, 2022.

ZHOU, H.; CHENG, J. S.; WANG, B. L.; FINK, G. R.; STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by Saccharomyces cerevisiae. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 6, p. 611-622, 2012.