

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

Estudio de bioprocesos para la fermentación de pentosas empleando *Saccharomyces* y levaduras no convencionales

Bruna Cunha Bolzico

Director de Tesis: Raúl N. Comelli

Lugar de realización: Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería
Ambiental - Departamento de Medio Ambiente - Facultad de Ingeniería
y Ciencias Hídricas - Universidad Nacional del Litoral

-2025-

A los que hoy me acompañan desde otro lugar

Aos que hoje me acompanham de outro lugar

Agradecimientos

Llegar hasta esta instancia fue el resultado de un camino lleno de aprendizajes. Quiero agradecer a quienes me acompañaron, me motivaron y estuvieron presentes de diferentes maneras.

Gracias a las instituciones que me dieron la posibilidad de formarme: a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A mi director, Raúl Comelli, gracias por introducirme al mundo de las levaduras y las fermentaciones, y por darme la oportunidad de investigar un tema que me apasiona. Aprecio haber contado con la libertad para desenvolverme, el espacio para equivocarme y aprender, y el acompañamiento a lo largo de todos estos años.

A los miembros del GPBIA, Jorge, Lisandro, Flor, Abril, Sofi y Vicky Macagno, gracias por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por el ambiente divertido y el compañerismo. En especial a Mary Benzzo, gracias por acompañarme durante los primeros pasos en micro, por transmitirme tu forma tan dedicada y responsable del trabajo en el laboratorio, y por estar siempre que lo haya necesitado. A Rodri Leonardi y a Martín Rolón, gracias por darme el espacio y permitirme colaborar con ustedes. Rodri, gracias por tu compañerismo, por tu apoyo durante el procesamiento de datos, por los intercambios de ideas y discusiones científicas, ha sido un placer aprender de un gran profesional de los bioprocesos. Martín, gracias por transmitirme el lado ingenieril de las ciencias, las diluciones exactas, el apoyo con las técnicas analíticas, por hacerme ver que no todo lo que fallaba en el lab era tan grave y que había solución si se miraban las cosas desde otra perspectiva. Ari Tomassi, gracias por transmitirme las bases de la biología molecular desde un conocimiento increíble. Agradezco todos los secretos que me fuiste compartiendo, que hacen que (hasta el momento) los clonados no fallen.

To all the members of TMB, thank you. It was truly a pleasure to share my time there with you. I would have never imagined that in such an important lab I would also find such an incredible group of friendly and kind people. I will be forever grateful for all the shared moments: fika times, after-lab events, board game nights, hikes, dinners, partys and with some of you even the conference trip. Thank you for the fun times in the lab, for introducing me to Swedish culture, to cinnamon buns, and to the importance of taking breaks and enjoying a good fika. A special thanks to Marie Gorwa-Grauslund for the amazing opportunity, for saying yes to the project, for your trust and guidance through the exciting signaling topic. I really appreciate you taking the time to review and provide feedback on the article. I enjoyed every scientific discussion, every piece of advice and especially learning from you. You genuinely are an inspiration. To Viktor Persson, an amazing colega, I was so lucky to collaborate and learn from you. I am grateful for your patience, for your enthusiasm, for all the time and knowledge you dedicated to the project, for making me feel so welcomed in the lab, for your support with the flow cytometer, for inviting me to the funniest activities, for sharing your culture with me, and

for introducing me to Amanda. You are not only a great scientist and an outstanding writer, but also a very good friend. Thank you for showing me the extra fun side of science as well. Isabel Erb, I cannot thank you enough for being an incredibly good friend and support during my year in Sweden. Thank you for your kindness, for always being there, for organizing and sharing Midsummer, for the trip to Germany, and for making me feel at home. To my office mates, Fredrik Lund, Nina Muratovska, Lisa Lindhal, Isabel Erb and Matilda Johansson, thank you for creating such a nice place to work, and for all the talks and fun moments. Krishnan Sreenivas, it was really nice getting to know you better during those late evenings in the lab. Thank you for all your technical help, for the fun times, shared meals, trips, Friday movies after work, and all the great talks. Tova Lindh, I really appreciate your generosity, the knowledge you shared during qPCR assays, being an incredible host, and for baking the best cookies to enjoy fika. Fredrik, thank you for your kindness. You made me feel very welcome in the lab and in the office. Matilda, I am grateful for your good company, your positivity and for showing me how nice it is to celebrate even the small achievements in the lab. A dos grandes personas españolas que tuve la suerte de encontrar, Raquel Perruca Foncillas e Iria Feijóo Rey, gracias por animar el lab, por su buena predisposición y amabilidad siempre, y por los bailes en las fiestas. Daniel Brink, thank you for the short but very inspiring discussions about xylose signaling (and about Swedish horses too), and for your generosity in making the biosensor strains available for others to work with. Thank you to all the seniors at TMB for the warm welcome, and especially to Magnus Carlquist for making it possible for me to go back.

Às minhas amigas do Brasil, que chegaram no inverno sueco para me fazer sentir um pouco mais perto de casa, Gisele de Lima Palermo e Isabela Mendes Bonfim, muito obrigada por tudo. Gisele, foi um enorme prazer compartilhar o mesmo tema de pesquisa com você. Obrigada pelo companheirismo nas longas noites no lab, por sempre criar um ambiente tão agradável, por todas as risadas compartilhadas e pela sua enorme gentileza. Isabela, obrigada infinitamente por estar sempre presente, especialmente nos momentos mais difíceis, por ter sido um grande apoio, por me transmitir todo o seu conhecimento de qPCR e por me fazer acreditar que tudo ia dar certo. Você é um grande exemplo de cientista.

A mis dos grandes amigas que me dio la Facultad, Belén y Joaquina, gracias por todos los momentos compartidos, por estar siempre y por una amistad que no cambia pese a la distancia. A mis amigas de toda la vida, Mechi, Luchi, Cami, Mica, Anto, Sashi, Flor, Vicu, Emi, gracias por ser mi escape, mi lugar seguro y por todos los años compartiendo juntas.

A mi familia, por el cariño incondicional y por ser mi sostén. A mi hermano Pedro, gracias por tu ayuda, por enseñarme a ver el lado más descontracturado y libre de las cosas. A mi hermana Luzia, por estar siempre presente, por los viajes juntas y por tu dedicación admirable. A mi mamá, por apoyarme en cualquier decisión, por nuestras risas compartidas, por ser tan divertida y por hacerme sentirte cerca sin importar la distancia. A mi papá, por ayudarme a cumplir sueños, por tu apoyo constante, por darme los mejores consejos, por transmitirme el interés por diferentes culturas y por ser mi ejemplo a seguir. A mi abuela Tita y a Ceci, gracias por esperarme siempre con una sonrisa.

Aportes Científico-Tecnológicos

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones científicas:

Glucose receptor deletion and engineering: impact on xylose sensing and utilization in *Saccharomyces cerevisiae*

Bolzico, B.C., Persson, V.C., Comelli, R.N., & Gorwa-Grauslund, M.F. (2025). *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf040>

Exploring xylose metabolism in non-conventional yeasts: kinetic characterization and product accumulation under different aeration conditions

Bolzico, B.C., Racca, S., Khawam, J.N., Leonardi, R. J., Tomassi, A. H., Benzzo, M. T., & Comelli, R. N. (2024). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 51. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae023>

Multi-response optimization of thermochemical pretreatment of soybean hulls for 2g-bioethanol production

Gil Rolón, M., Leonardi, R. J., Bolzico, B. C., Seluy, L. G., Benzzo, M. T., & Comelli, R. N. (2023). *Fermentation*, 9(5), 454. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050454>

Índice

Agradecimientos	3
Aportes Científico-Tecnológicos	5
Índice	6
Abreviaturas y símbolos	10
Resumen	12
Abstract	14
Introducción general	16
1. Aprovechamiento de la lignocelulosa	17
1.1 Estructura y distribución	17
1.2 Opciones de bioconversión	18
2. Bioproceso lignocelulósico: etapas y desafíos	19
2.1 Pretratamiento, hidrólisis y fermentación de la biomasa	21
3. Utilización de pentosas	22
3.1 Reconstrucción de rutas metabólicas C5 en <i>S. cerevisiae</i>	25
3.2 Interés en levaduras no convencionales	27
4. Enfoque y estructura de la tesis	27
Objetivos	30
1. Objetivo general	30
2. Objetivos específicos	30
Materiales y métodos generales	31
1. Materiales generales	31
1.1 Levaduras empleadas	31
1.2 Cepa de <i>Escherichia coli</i>	31
1.3 Medios de cultivo para la proliferación de levaduras	32
2. Métodos generales	32
2.1 Reacción en cadena de la polimerasa	33
2.2 Digestión del ADN con enzimas de restricción	33
2.3 Reacción de ligación	33
2.4 Transformación de <i>Escherichia coli</i> y obtención de plásmidos	34
2.5 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	34
Capítulo 1. Detección de la xilosa extracelular en <i>S. cerevisiae</i>	36
1. Introducción	37

1.1 Mecanismos de transducción de señales.....	37
1.1.1 Vía Rgt2p/Snf3p de inducción por glucosa.....	39
1.1.2 Integración de señales en la regulación de genes <i>HXT</i>	41
1.2 Monitoreo de señales: biosensores fluorescentes	42
1.2.1 Cuantificación de la fluorescencia por citometría de flujo.....	44
1.3 Respuesta no fermentativa de <i>S. cerevisiae</i> hacia la xilosa	46
2. Objetivos.....	48
3. Materiales y métodos	49
3.1 Materiales	49
3.1.1 Oligonucleótidos utilizados para PCR y secuenciación	49
3.1.2 Plásmidos utilizados y construidos	49
3.1.3 Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	50
3.2 Métodos.....	52
3.2.1 Ingeniería genética de levaduras mediante CRISPR-Cas9.....	52
3.2.2 Deleción de receptores y transportadores	54
3.2.3 Sobreexpresión del receptor <i>SNF3</i>	55
3.2.4 Construcción de plásmidos integrativos	56
3.2.5 Mutagénesis dirigida del receptor quimérico	57
3.2.6 Integración de casetes de expresión	58
3.2.7 Citometría de flujo.....	58
3.2.8 Extracción de ARN y análisis por RT-qPCR	60
3.2.9 Fusión a la GFP	61
3.2.10 Análisis por microscopía de fluorescencia	62
3.2.11 Caracterización fisiológica de cepas recombinantes	62
4. Resultados.....	64
4.1 Efecto de la xilosa en la señalización por Snf3p/Rgt2p	64
4.1.1 La xilosa extracelular es percibida por el receptor Snf3p	64
4.1.2 La xilosa extracelular no induce señales a través de la vía Rgt2p	70
4.2 Ingeniería de la vía Rgt2p/Snf3p: receptores quiméricos	71
4.2.1 Diseño y construcción.....	72
4.2.2 Análisis funcional del receptor quimérico derivado de Snf3p.....	73
4.2.3 Análisis funcional del receptor quimérico derivado de Rgt2p	77
4.3 Impacto metabólico de la detección de xilosa por Snf3p	78
5. Discusión	81
5.1 Señales de la xilosa en <i>S. cerevisiae</i>	81
5.2 Una respuesta diferenciada hacia la xilosa	85
5.3 Sensores homólogos en levaduras no convencionales	86
Capítulo 2. Captación de pentosas mediante nuevos transportadores expresados en <i>S. cerevisiae</i>	88
1. Introducción	89
1.1 Transporte de azúcares en levaduras	89

1.1.1 Transportadores Hxtp de <i>S. cerevisiae</i> : promiscuidad y limitaciones en el transporte de pentosas	90
1.1.2 Transportadores de levaduras no convencionales y su expresión en <i>S. cerevisiae</i>	92
1.2 Regulación y degradación de transportadores	94
2. Objetivos	96
3. Materiales y métodos	97
3.1 Materiales	97
3.1.1 Oligonucleótidos utilizados para PCR y secuenciación	97
3.1.2 Plásmidos y cepas de <i>S. cerevisiae</i>	97
3.2 Métodos	99
3.2.1 Identificación y análisis <i>in silico</i> de candidatos	99
3.2.2 Clonado de transportadores y construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> recombinantes	100
3.2.3 Mutagénesis de residuos de lisina	101
3.2.4 Fusión a la GFP	102
3.2.5 Caracterización funcional de transportadores putativos	102
3.2.6 Microscopía de fluorescencia	103
4. Resultados	104
4.1 Análisis filogenético y conservación de residuos revelan posible especificidad de los nuevos transportadores	104
4.2 Caracterización funcional de los candidatos a transportadores de xilosa	108
4.3 Caracterización funcional del candidato a transportador de arabinosa	111
4.4 Mutaciones en las lisinas del extremo C-terminal incrementan la estabilidad del transportador AraSp	113
4.4.1 El nuevo transportador optimizado de <i>Sp. passalidarum</i> mejora el consumo de arabinosa	115
5. Discusión	117
5.1 Particularidades de los nuevos transportadores de <i>Sp. passalidarum</i>	118
5.2 Importancia de obtener variantes estabilizadas	121
Capítulo 3. Metabolismo de azúcares lignocelulósicos en diversas especies de levaduras	125
1. Introducción	126
1.1 Diversidad de levaduras	126
1.2 Características principales del metabolismo de xilosa en levaduras	127
1.2.1 El efecto Crabtree y la dependencia del oxígeno	129
1.2.2 Acoplamiento metabólico de co-sustratos	131
1.3 Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos	132
1.4 Consorcios microbianos y la división de labores	133
2. Objetivos	137
3. Materiales y métodos	138
3.1 Materiales	138

3.1.1	Especies de levaduras utilizadas	138
3.2	Métodos	139
3.2.1	Fermentaciones en medio rico con levaduras no convencionales	139
3.2.2	Fermentaciones en hidrolizado lignocelulósico de cascarilla de soja.....	140
3.2.3	Cuantificación de azúcares y derivados metabólicos	141
3.2.4	Cálculo de parámetros cinéticos	141
3.2.5	Análisis filogenético.....	143
4.	Resultados.....	144
4.1	Aspectos filogenéticos de levaduras consumidoras de xilosa.....	144
4.2	Impacto de la aireación en el metabolismo de xilosa	146
4.2.1	Comparación de los perfiles de crecimiento y de consumo de xilosa	147
4.2.2	Comparación de los perfiles de acumulación de etanol y de xilitol.....	151
4.3	Impacto del glicerol como co-sustrato del metabolismo de xilosa	154
4.4	Impacto del hidrolizado lignocelulósico en la fermentación	157
4.4.1	Aplicación de levaduras industriales de <i>Saccharomyces</i>	158
4.4.2	Desempeño de <i>Sp. passalidarum</i> sobre hidrolizado de cascarilla de soja y co-cultivo con <i>S. bayanus</i>	159
5.	Discusión	162
5.1	Factores influyentes en el metabolismo de la xilosa	162
5.2	<i>Sp. passalidarum</i> y su potencial aplicación en bioprocesos	164
5.2.1	Cultivos mixtos.....	166
5.3	Acoplamiento del glicerol al metabolismo de la xilosa	166
5.4	Robustez frente a hidrolizados lignocelulósicos.....	168
5.4.1	Cepas industriales de <i>Saccharomyces</i>	168
5.4.2	Levaduras <i>non-Saccharomyces</i>	169
	Conclusiones globales	174
1.	Hallazgos más relevantes	174
2.	Consideraciones finales y futuras.....	176
	Apéndice I.....	178
	Apéndice II.....	183
	Apéndice III.....	186
	Referencias bibliográficas	188

Abreviaturas y símbolos

1G	Primera generación
2G	Segunda generación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Difosfato de adenosina
AI	Arabinosa isomerasa
ALE	Evolución adaptativa de laboratorio (<i>Adaptive laboratory evolution</i>)
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN guía
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local
CBP	Bioproceso consolidado
CCR	Represión por catabolito de carbono (<i>Carbon catabolite repression</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
DHA	Dihidroxiacetona
DHAK	Dihidroxiacetona quinasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F1,6BP	Fructosa-1,6-bisfosfato
FSC	Detector de dispersión frontal (<i>Forward Scatter</i>)
G3P	Glicerol-3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
GAL2mut	Transportador mutante con especificidad incrementada por xilosa
Gal2mut-RT	Fusión entre transportador Gal2mut y sensor Rgt2
Gal2mut-ST	Fusión entre transportador Gal2mut y sensor Snf3
GC	Cromatografía de gases
GCY	Glicerol deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
HDR	Reparación dirigida por homología

HMF	5-Hidroximetilfurfural
HOG	Vía del glicerol de alta osmolaridad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IF	Intensidad de fluorescencia
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Kmut	Mutación puntual en uno o varios residuos de lisina
LAD	L-arabitol deshidrogenasa
LXR	L-xilulosa reductasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Yoduro de propidio
PKA	Proteína quinasa A
PPP	Ruta de las pentosas fosfato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RE	Ribulosa-5-fosfato epimerasa
RK	Ribulosa quinasa
SSC	Detector de dispersión lateral (<i>Side scatter</i>)
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
WT	Fenotipo salvaje (<i>wild-type</i>)
XDH	Xilitol deshidrogenasa
XI	Xilosa isomerasa
XK	Xilulosa quinasa
XR	Xilosa reductasa
yEGFP	Proteína verde fluorescente mejorada para levadura (<i>Yeast-enhanced green fluorescent protein</i>)

Resumen

En búsqueda de procesos más respetuosos con el medio ambiente, la biomasa lignocelulósica se perfila como un recurso renovable con potencial para sustituir al petróleo en la producción de materiales, químicos y energía. A partir de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa que componen estas biomásas, es posible obtener azúcares simples que pueden convertirse en compuestos con valor agregado utilizando microorganismos. Entre estos productos, el etanol es uno de los biocombustibles de mayor demanda en la actualidad y su producción radica en las levaduras como plataformas fermentativas. *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo etanológico de preferencia en los procesos fermentativos tradicionales. Sin embargo, las materias primas lignocelulósicas contienen altas proporciones de las pentosas xilosa y arabinosa, azúcares que *S. cerevisiae* no puede fermentar directamente. A lo largo de los años, se han implementado diversos recursos genéticos para modificar el metabolismo de las pentosas en *S. cerevisiae*, pero la utilización de estos azúcares todavía requiere optimizaciones considerables para que el proceso sea viable económicamente. Como alternativa a este panorama, las levaduras no convencionales que naturalmente utilizan las pentosas se posicionan como modelos atractivos para el estudio de sus habilidades metabólicas.

Dos factores claves pueden suponer una restricción en el uso de pentosas por parte de *S. cerevisiae*: una red regulatoria poco comprendida e inadaptada al reconocimiento de la xilosa y un sistema de transporte inadecuado para la captación de pentosas. Además, la integración de las levaduras no convencionales en bioprocesos se dificulta, ya que el metabolismo fermentativo de las pentosas es altamente variable entre especies y apenas se ha comparado en condiciones equivalentes. Sistemáticamente, estas limitaciones motivaron el enfoque central de esta tesis: la comprensión de los determinantes moleculares asociados a los procesos de detección, transporte y metabolismo de las levaduras para mejorar la utilización de azúcares pentosas.

Se encontró que *S. cerevisiae* detecta la xilosa extracelular a través del receptor de membrana Snf3p, incluso sin un metabolismo activo. No obstante, el reconocimiento por el receptor parece ser inespecífico y las señales de la xilosa se intensifican al incluir una ruta recombinante para su asimilación. Para guiar una respuesta adecuada hacia la xilosa extracelular, se diseñó e implementó una estrategia de ingeniería basada en receptores quiméricos. Aunque resultados iniciales mostraron una mejora sutil en la detección de la xilosa, las construcciones finales requieren de ajustes considerables

para poder aplicarse en el futuro y reducir así la dependencia de los mecanismos de señalización de la glucosa en *S. cerevisiae*.

La búsqueda de nuevos transportadores permitió aislar por primera vez una proteína de la especie *Spathaspora passalidarum* con características deseables para la captación de arabinosa. El transportador, denominado AraSp, fue sometido a una estrategia racional de mutagénesis para mejorar su estabilidad. Al expresarse en una cepa industrial recombinante de *S. cerevisiae*, el transportador mutante sustentó de manera incrementada el consumo de arabinosa en comparación con un transportador endógeno, con actividad preferencial por la glucosa. Un transportador mejorado, como AraSp, podría favorecer el uso de las pentosas residuales que suelen permanecer en las etapas posteriores al consumo de la glucosa en las fermentaciones industriales.

Finalmente, los mecanismos metabólicos de las levaduras no convencionales fueron explorados como soluciones paralelas a la optimización de cepas de *S. cerevisiae* recombinantes para la fermentación de pentosas. Las distintas especies analizadas mostraron una alta dependencia del metabolismo fermentativo con respecto a la oxigenación. Las levaduras con tendencia a fermentar la xilosa a etanol, en lugar de acumular xilitol, fueron las más eficientes y las menos afectadas por las condiciones restrictivas de aireación. Dentro de este grupo, la levadura *Sp. passalidarum* se desempeñó mejor en la fermentación de la xilosa que una cepa recombinante de *S. cerevisiae*. Desafortunadamente, la especie no convencional no resultó lo suficientemente robusta para tolerar las condiciones industriales de fermentación de xilosa en hidrolizados lignocelulósicos.

En conclusión, la presente tesis contribuye a la comprensión de los factores que limitan la utilización de las pentosas por levaduras y establece vías para su optimización. Las estrategias abarcan respuestas de señalización molecular de la xilosa, mecanismos de captación de pentosas y condiciones que impactan en su metabolismo. Se espera que estos avances impulsen el desarrollo de cepas y configuraciones de bioprocesos más eficientes para la conversión de pentosas en bioproductos con valor agregado.

Abstract

In the search for more environmentally-friendly processes, lignocellulosic biomass has shown promise as a renewable resource that could replace petroleum in the production of key materials, chemicals and energy. From the constituent polysaccharides of such biomass, cellulose and hemicellulose, it is possible to release sugar monomers that can be bioconverted into value-added compounds using microorganisms. Among these compounds, bioethanol stands out as a highly demanded biofuel. Yeasts are the preferred workhorses in conventional fermentation processes, with *Saccharomyces cerevisiae* being the classical ethanologenic microbe. However, pentose sugars such as xylose and arabinose are abundant in lignocellulosic biomass and are not readily fermented by wild-type *S. cerevisiae* strains. Many genomic resources have been implemented to engineer pentose metabolism in *S. cerevisiae*, but its utilization efficiency still needs to be improved to achieve commercial feasibility. At the same time, the diversity of non-conventional yeasts that naturally utilize pentoses can also be explored to uncover their metabolic potential.

Two major factors are thought to limit efficient pentose assimilation in *S. cerevisiae*: a poorly understood and suboptimal regulatory response to xylose, and an inadequate transport system for pentose sugars. Furthermore, the integration of non-*Saccharomyces* yeasts into lignocellulosic bioprocessing remains challenging, as their fermentative pentose metabolism is highly variable and has been scarcely evaluated under comparable conditions. These limitations were systematically addressed in this thesis, which aimed to elucidate the molecular determinants of signaling, transport, and metabolism in yeasts for improved pentose utilization.

It was found that *S. cerevisiae* could detect extracellular xylose through the Snf3p membrane receptor, even without an active metabolism. However, recognition by the receptor was likely non-specific, and xylose signals were intensified when a recombinant pathway for its assimilation was included. To trigger a proper response to extracellular xylose, an engineering strategy based on chimeric receptors was designed and implemented. Although preliminary results showed a subtle improvement in xylose detection, the final constructs require a substantial redesign in order to be applied in the future and reduce dependence on glucose signaling mechanisms in *S. cerevisiae*.

The search for novel pentoses transporters resulted in the isolation of a *Spathaspora passalidarum* protein exhibiting desirable properties for arabinose uptake. The newly identified transporter, AraSp, underwent rational mutagenesis to enhance its stability. When expressed in a recombinant arabinose-utilizing industrial *S. cerevisiae* strain, the mutant transporter enabled increased arabinose consumption relative to an

endogenous glucose-preferring transporter. An improved transporter like AraSp could unlock the use of residual pentoses remaining in the post-glucose phase of industrial fermentations.

Finally, the metabolic traits of non-conventional yeasts were investigated as parallel solutions to the optimization of recombinant *S. cerevisiae* strains for pentose fermentation. Xylose catabolism in the screened species was strongly dependent on oxygen availability. Yeasts favoring ethanol over xylitol accumulation were the most efficient xylose utilizers and least affected by oxygen restriction. Within this group, the yeast *Sp. passalidarum* out-performed a recombinant *S. cerevisiae* strain in xylose fermentation. Unfortunately, this non-conventional species was not yet robust enough to cope with more demanding conditions of xylose fermentation in lignocellulosic hydrolysates.

In conclusion, this thesis broadens the understanding of factors that can hinder pentose utilization and proposes ways to optimize them strategically. Optimization strategies encompass signaling responses towards xylose, pentoses uptake mechanisms, and the conditions affecting the metabolic features of yeasts. Together, these advances are expected to aid the development of more efficient strains and bioprocessing methods for the conversion of pentoses into lignocellulosic-based bioproducts.

Introducción general

La dependencia mundial de los combustibles fósiles debe migrar progresivamente hacia alternativas más limpias y sostenibles. El uso masivo de recursos fósiles—particularmente del petróleo crudo, cuyo consumo supera los 100 millones de barriles por día—intensifica las emisiones de gases de efecto invernadero, acelera el cambio climático y anticipa el agotamiento de las reservas no renovables (Rapier et al., 2024; Attfield et al., 2025). Atendiendo a la necesidad de encontrar alternativas innovadoras a la industria petroquímica, las biorrefinerías se consolidan como procesos industriales que aprovechan biomasa vegetal renovable para la generación de compuestos con valor agregado. Entre estos, los biocombustibles pueden reducir las emisiones de gases de efecto invernadero al reemplazar la dependencia de los combustibles fósiles tradicionales, ya que funcionan dentro de un ciclo de carbono cerrado. Teóricamente, en este ciclo, el CO₂ emitido de los biocombustibles es nuevamente incorporado por la biomasa vegetal que sirve como sustrato para la producción de energía (European Environment Agency, 2024).

El bioetanol se considera la alternativa más conveniente para sustituir la gasolina convencional. En la actualidad, su producción se basa en la fermentación microbiana de carbohidratos provenientes de cultivos azucareros, como la caña de azúcar y la remolacha, o liberados a partir de cultivos amiláceos, como el maíz y el trigo. Aproximadamente el 70 % del bioetanol proviene de los granos de maíz y el 28 % de la caña de azúcar, materias primas asociadas a los productores globales líderes, Estados Unidos y Brasil, respectivamente (Industry Research, 2024). El proceso se denomina bioetanol de primera generación o 1G y su principal limitación radica en la disponibilidad de los cultivos de partida, que compiten con la producción de alimentos. Alternativamente, los residuos agroindustriales y forestales—denominados biomasa lignocelulósica—representan un material no comestible, económico y abundante para la generación de etanol y de otros productos de valor agregado (Sánchez & Cardona, 2008; Zoghalmi & Paes, 2019). En biorrefinerías, tal proceso se conoce como bioetanol de segunda generación o 2G. La presente tesis aborda aspectos claves de este bioproceso desde una perspectiva molecular de las levaduras, reconocidas como las plataformas productivas esenciales en la generación del bioetanol.

1. Aprovechamiento de la lignocelulosa

1.1 Estructura y distribución

La biomasa lignocelulósica es rica en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, y en el polímero aromático lignina. En conjunto, estos biopolímeros conforman la estructura compleja y recalcitrante de la pared celular de plantas, con una disposición precisa a nivel nanoestructural (Figura 1). El contenido específico de cada fracción está determinado por la especie y la variedad vegetal, aunque puede aproximarse a una proporción de 40-50% en peso seco de celulosa, 25-30% de hemicelulosa y 15-20% de lignina (Bahtia et al., 2020).

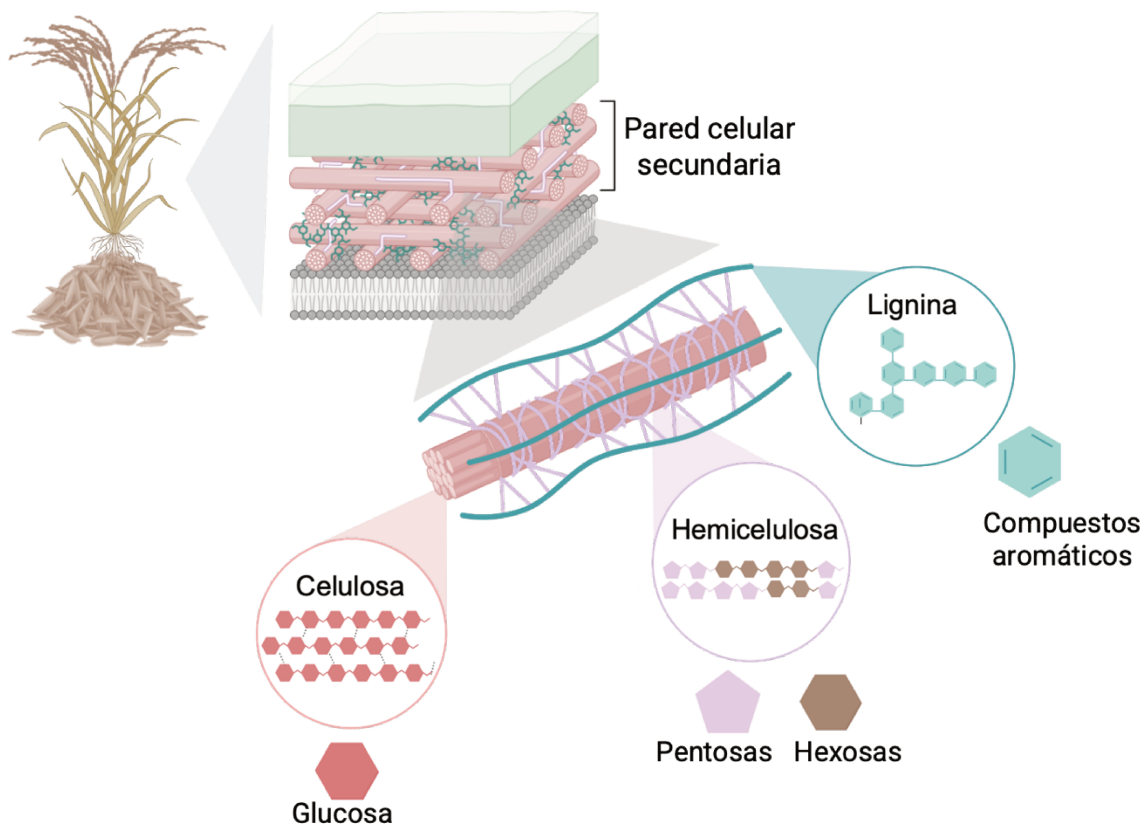


Figura 1. Representación esquemática de los componentes principales de la lignocelulosa.

La celulosa y la hemicelulosa representan las fuentes de azúcares para los procesos fermentativos microbianos. La celulosa es un homopolímero lineal cuya unidad estructural son monómeros de D-glucosa, mientras que la hemicelulosa es un heteropolímero más corto, lineal y altamente ramificado, compuesto por varios monómeros, incluyendo las pentosas (C5) D-xilosa y L-arabinosa, y las hexosas (C6) D-glucosa, D-manosa y D-galactosa (Bahtia et al., 2020). La cadena principal de la

hemicelulosa en biomásas como el bagazo de la caña de azúcar, la pulpa de remolacha, y la paja de arroz y de trigo está formada mayoritariamente por xilanos (Mäki-Arvela et al., 2010). La unidad de repetición del xilano corresponde principalmente a monómeros de xilosa—alrededor del 90 %—y, en menor proporción, a monómeros de arabinosa (Zabed et al., 2016). La lignina, en cambio, está constituida por compuestos de naturaleza aromática y proporciona rigidez estructural al formar parte del complejo lignocelulósico (Figura 1).

La disponibilidad de los materiales lignocelulósicos para su bioprocesamiento varía según la región, ya que depende de los tipos de cultivos predominantes, del clima y de las industrias agrícolas e industriales locales. Brasil, por ejemplo, lidera la producción del bagazo de la caña de azúcar como principal residuo agrícola (Moreira et al., 2016). En Argentina, los recursos biomásicos de base celulósica más abundantes incluyen la paja de arroz, el bagazo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz y sorgo y los subproductos del procesamiento de la soja, entre otros (Secretaría de Energía de la Nación, 2008). En el presente trabajo de Tesis, la cascarilla de soja fue evaluada como insumo lignocelulósico para la generación de bioetanol, ya que sus componentes mayoritarios son la celulosa, de la cual se libera la glucosa en altas cantidades, y el xilano, del cual se recupera el azúcar xilosa (Gil-Rolón et al., 2023).

1.2 Opciones de bioconversión

En el caso específico de cada tipo de biomasa lignocelulósica, las biorrefinerías buscan valorizar la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, mediante su conversión biológica empleando microorganismos. Además del bioetanol, al que se alude a lo largo de esta tesis, otros compuestos de interés industrial pueden considerarse al explotar el potencial de los sustratos lignocelulósicos y de las diversas capacidades metabólicas microbianas. Los ácidos orgánicos, como el succínico, el láctico, y el levulínico, que poseen aplicaciones industriales variables, pueden derivarse de la biomasa celulósica abarcando estrategias más limpias, reemplazando de esta manera su síntesis química convencional (Devi et al., 2022; Kim et al., 2024a). Las propiedades endulzantes y los usos en cosmética de los polioles los convierten en productos con valor agregado (Kumari et al., 2025). Resulta entonces factible producir alternativamente el xilitol y el arabitol a través de rutas fermentativas de los azúcares de cinco carbonos presentes en materiales vegetales ricos en hemicelulosa (Baptista et al., 2024; Kumari et al., 2025).

La celulosa y la hemicelulosa suelen transformarse en un mismo proceso, dando lugar a los medios azucarados para las actividades fermentativas microbianas. Aunque la celulosa aporta la mayor parte de los azúcares fácilmente fermentables,

principalmente glucosa, las pentosas representan un contribución significativa que no puede ignorarse si se pretende que la utilización de las materias primas lignocelulósicas sea económicamente viable. Por otro lado, la lignina—fracción también desafiadora debido a su complejidad estructural—necesita de tecnologías diferentes para su aprovechamiento. Se han logrado ciertos avances en la generación de precursores de bioplásticos mediante bacterias que metabolizan compuestos aromáticos de la despolimerización de la lignina (Ali et al., 2024). Durante el bioprocesamiento de las fracciones azucaradas, la lignina residual puede quemarse y destinarse a la generación de energía en las plantas industriales de obtención de bioetanol (Sethupathy et al., 2022).

2. Bioproceso lignocelulósico: etapas y desafíos

Para el etanol "convencional" o 1G, actualmente derivado de la fermentación de azúcares simples de cultivos ricos en hexosas, la tecnología se encuentra plenamente desarrollada y existen más de 600 plantas operables comercialmente (Hoang & Nghiem, 2021). La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* domina este tipo de industrias, para las cuales existen cepas especialmente adaptadas a distintas materias primas y a condiciones de fermentación, que permiten mejorar el rendimiento global del bioproceso (Attfield et al., 2025). La implementación de industrias 2G, que valorizan la biomasa residual en lugar de los recursos destinados a la alimentación, se encuentra en etapa de consolidación para su plena comercialización. Actualmente, solo unas pocas plantas funcionan activamente a nivel mundial, como Raizen y GranBio en Brasil, las cuales transforman los desechos de la caña de azúcar en bioetanol (Pinheiro et al., 2025). No obstante, la producción mundial de bioetanol 2G equivale a menos del 1 % de la alcanzada mediante los procesos 1G (Jansen et al., 2017).

Considerando que la producción de etanol celulósico todavía no llega a satisfacer los niveles previstos en las proyecciones iniciales, existe un amplio margen para investigaciones encaminadas a su optimización tecnológica y escalado comercial (Hoang & Nghiem, 2021). La tecnología 2G enfrenta desafíos vinculados con los altos costos y la complejidad de las etapas del bioproceso (Figura 2). Específicamente, la recalcitrancia de la biomasa, la presencia de compuestos con efectos inhibitorios microbianos, la liberación de mezclas complejas de azúcares y la falta de un microorganismo chassis que reúna todas las características deseables siguen siendo los principales obstáculos (Cunha et al., 2020; Nair & Verma, 2025). Para mitigarlos, se consideran estrategias de acondicionamiento de la biomasa más eficientes y la

optimización de la utilización de los azúcares C5 y C6 por levaduras robustas (Figura 2).

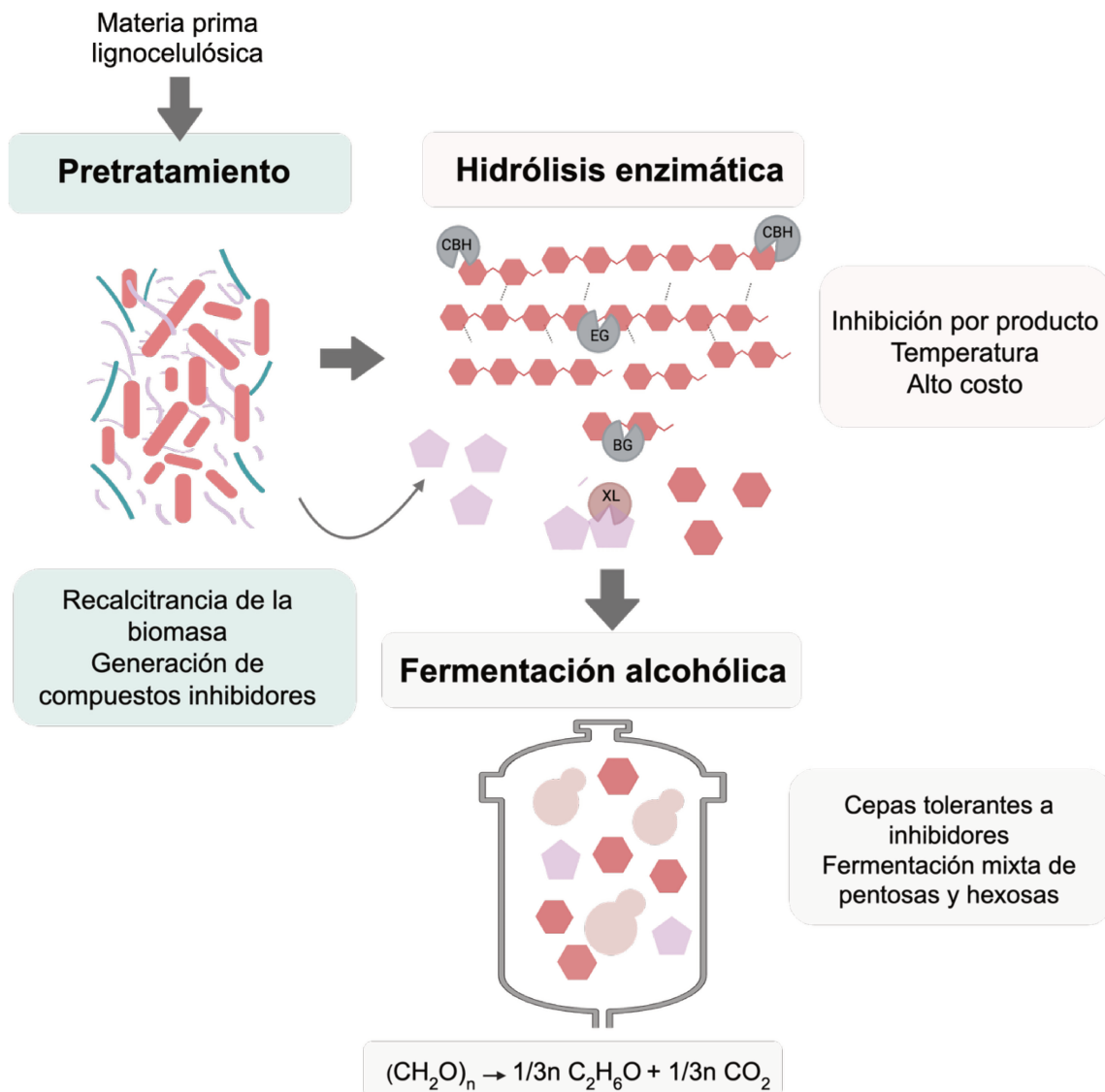


Figura 2. Etapas y principales limitaciones en el proceso de conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol. El esquema muestra el pretratamiento, la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica mediada por levaduras. Al final del proceso, el etanol generado se recupera mediante destilación. Las enzimas celulolíticas se abrevian de la siguiente manera: EG, endoglucanasa; CBH, celobiohidrolasa; BGH, β -glucosidasa; y las xilanasas se indican de forma general como XL.

2.1 Pretratamiento, hidrólisis y fermentación de la biomasa

La desconstrucción de los polímeros estructurales de las biomásas lignocelulósicas en monosacáridos solubles es un paso crítico previo a la etapa de fermentación, y se lleva a cabo aplicando metodologías de pretratamiento y de hidrólisis (Figura 2).

El pretratamiento busca separar los polímeros estructurales de la matriz lignocelulósica a través de la disrupción de las asociaciones moleculares, con una máxima recuperación de la celulosa y de la hemicelulosa y la remoción de la lignina (Zabed et al., 2016). Al aplicar un pretratamiento, la estructura de la lignocelulosa se altera, lo que reduce la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, e incrementa el área superficial y la porosidad de la biomasa. Estas modificaciones favorecen la accesibilidad y reactividad de las enzimas hidrolíticas (Banu et al., 2021; Nair & Verma, 2025). No existe un pretratamiento universal para todos los tipos de biomasa, y generalmente un método, como el acondicionamiento mecánico, se combina con otras tecnologías para lograr resultados más satisfactorios (Aditiya et al., 2016). Los métodos de pretratamiento son diversos y suelen clasificarse como físicos—molienda, extrusión—, químicos—uso de ácidos, álcalis o solventes orgánicos—, fisicoquímicos—explosión de vapor, explosión de fibra de amoníaco o AFEX—y biológicos—empleo de microorganismos o enzimas— (Behera et al., 2014; Aditiya et al., 2016; Das et al., 2021; Broda et al., 2022; Basak et al., 2023). Durante estos procesos, parte de la celulosa, de la hemicelulosa y de la lignina inevitablemente se degradarán, generando compuestos secundarios como el furfural, el 5-hidroximetilfurfural, ácidos orgánicos y derivados fenólicos (Jönsson & Martín, 2016). La cantidad y el perfil de los subproductos dependerán de la naturaleza de la biomasa y del método aplicado, aunque también de las condiciones operativas (Jönsson & Martín, 2016; Zabed et al., 2016). La presencia de tales compuestos de degradación tiende a limitar el rendimiento enzimático y microbiano de las etapas posteriores; en consecuencia, los pretratamientos más eficaces son aquellos que aumentan la disponibilidad de azúcares y minimizan la formación de inhibidores (Zabed et al., 2016; Aditiya et al., 2016).

La hemicelulosa suele hidrolizarse parcial o totalmente durante el pretratamiento, liberando las pentosas, mientras que la mayor recuperación de la glucosa contenida en la celulosa se logra por la digestión enzimática de la biomasa pretratada (Figura 2) (Brown et al., 2024). En esta etapa interviene una mezcla de enzimas celulasas que actúan sinérgicamente para descomponer la celulosa (Figura 2). Dichas enzimas pueden producirse *in situ* mediante microorganismos que las secretan al medio, o adquirirse como *cocktails* comerciales de actividad conocida y reproducible, opción más

frecuente (Zabed et al., 2016). El sistema enzimático también puede incluir hemicelulasas (xilanasas) que hidrolizan la hemicelulosa cuando esta sufre una despolimerización incompleta durante el pretratamiento. Al ser la sacarificación enzimática una de las etapas más costosas (20–30 % del total; Broda et al., 2022), resulta esencial optimizar la conversión de todos los azúcares recuperados en etanol, para maximizar el rendimiento y lograr un balance económico más favorable del bioproceso.

Los hidrolizados lignocelulósicos obtenidos constituyen los medios de fermentación, en los que la glucosa se encuentra en mayor proporción junto con cantidades apreciables de pentosas. La xilosa suele ser la pentosa dominante (aproximadamente 10–25%), seguida por la arabinosa, presente en cantidades inferiores (cerca del 2–3 %) (Jansen et al., 2017). Sin embargo, en algunos tipos de biomasa, como la pulpa de remolacha y la fibra de maíz, el contenido de arabinosa puede incrementarse y alcanzar hasta un 20% del total de los azúcares (Mäki-Arvela et al., 2010; Guo et al., 2023). Esta naturaleza mixta de los hidrolizados plantea desafíos adicionales para la fermentación, ya que dicho proceso va a depender de una levadura etanológica que sea capaz de metabolizar sustratos de tipo C6 y C5 (Figura 2). La levadura industrial de preferencia *S. cerevisiae*—altamente eficiente en la fermentación de la glucosa presente en medios convencionales—, carece naturalmente de esta habilidad.

3. Utilización de pentosas

Entre los microorganismos que fermentan pentosas se encuentran los hongos filamentosos, algunas bacterias y levaduras. Los bioprocesos alcoholeros se inclinan principalmente por las levaduras, ya que las bacterias son inhibidas por bajas concentraciones de azúcares y por el etanol. Por otro lado, los hongos filamentosos presentan una productividad ineficiente que no les permite competir en términos industriales (Skoog & Hahn-Hagerdal, 1988; Hahn-Hägerdal et al., 2006).

A diferencia de la glucosa, las pentosas exhiben una mayor complejidad en su asimilación y fermentación, gobernada por mecanismos bioquímicos propios de los azúcares C5 (Jeffries, 1983; Skoog & Hahn-Hagerdal, 1988). De acuerdo con su origen microbiano, existen al menos cinco rutas por las cuales la xilosa puede ser metabolizada (Zhao et al., 2020). Aquellas que se ramifican hacia la vía de las pentosas fosfato (PPP) para generar intermediarios de la glicólisis son la ruta de isomerización de la xilosa y la ruta oxidorreductiva (Figura 3) (Jeffries, 1983). La xilulosa es el intermediario compartido

en ambas rutas y es posteriormente fosforilado a xilulosa-5-fosfato, mientras que la principal diferencia entre ellas radica en las etapas iniciales (Figura 3).

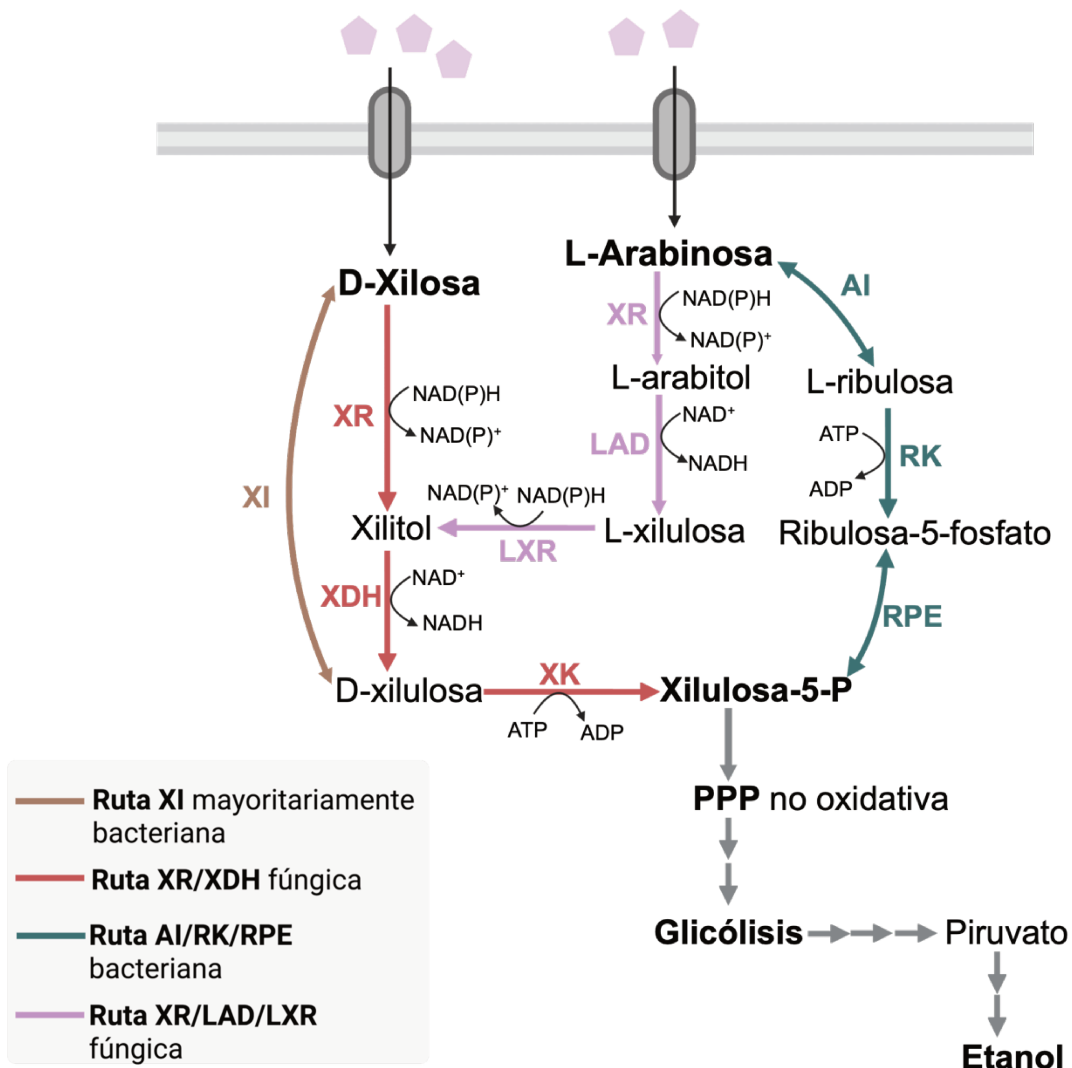


Figura 3. Rutas metabólicas nativas de la xilosa y de la arabinosa en microorganismos. Estas rutas se han introducido en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para canalizar de forma recombinante las pentosas hacia la generación de etanol, a través de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y de la glicólisis. Abreviaturas: XI, xilosa isomerasa; XR, xilosa reductasa; XDH, xilitol deshidrogenasa; XK, xilulosa quinasa; LAD, L-arabitol deshidrogenasa; LXR, L-xilulosa reductasa; AI, arabinosa isomerasa; RK, ribulosa quinasa; RE, ribulosa-5-fosfato epimerasa.

La xilosa puede convertirse directamente a xilulosa por la enzima xilosa isomerasa (XI), o bien reducirse a xilitol y luego este oxidarse a xilulosa por las enzimas xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH) (Figura 3). La vía XI se asocia comúnmente a orígenes procariontes y, muy raramente, a eucariotes. A la inversa, las enzimas XR y XDH son habituales en levaduras y hongos filamentosos con habilidad de crecer en xilosa (Jeffries, 1983; Zhao et al., 2020). Existen, además, rutas alternativas del catabolismo de la xilosa, conocidas como oxidativas, que evitan la fosforilación y el desvío metabólico

hacia la PPP, dirigiendo en su lugar los intermediarios hacia el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Estas rutas, como las de Weimberg y Dahms, no se consideran en el presente trabajo de tesis, ya que son relevantes principalmente para la producción aeróbica de compuestos con valor agregado distintos al etanol (Dahms, 1974; Borgström et al., 2019; Zhao et al., 2020).

La arabinosa, que se encuentra de forma natural en su isómero L, también se integra en la PPP a través de su conversión a xilulosa-5-fosfato (Figura 3) (Jeffries, 2000). De manera análoga a la xilosa, su catabolismo puede llevarse a cabo por rutas bacterianas o fúngicas (Jeffries, 2006; Fonseca et al., 2007). En levaduras, el metabolismo de la arabinosa está menos explorado que el de la xilosa. La secuencia catabólica apunta a un solapamiento parcial entre las rutas de ambas pentosas, aunque con dos reacciones redox adicionales para el caso de la arabinosa (Figura 3) (Fonseca et al., 2007). En ellas, la enzima XR reduce la L-arabinosa a L-arabitol, que a su vez es convertido a L-xilulosa por la acción de la L-arabitol-4-deshidrogenasa (LAD) (Figura 3). La presencia de una L-xilosa reductasa (LXR) genera xilitol, que posteriormente continúa por la vía de degradación de la xilosa (Figura 3) (Fonseca et al., 2007; Ruchala & Sibirny, 2021). La ruta bacteriana involucra las enzimas L-arabinosa isomerasa (AI), L-ribulosa quinasa (RK), y L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (RE), que convierten la arabinosa en xilulosa-5-fosfato sin que se generen reacciones redox (Figura 3).

La xilulosa-5-fosfato es un intermediario clave en la ruta fermentativa de las pentosas, al conectarse con la glicólisis a través de la fase no oxidativa de la PPP (Figura 3). En este ciclo, los compuestos resultantes de tres y seis carbonos entran en la ruta glicolítica, donde el piruvato—intermediario final—puede desviarse hacia la conversión a etanol (Figura 3) (McMillan, 1993).

En la reacción fermentativa global, se requieren tres moles de xilosa para generar completamente cinco moles de etanol, con una ganancia teórica de 5 ATP. Esto corresponde a un rendimiento óptimo de 1,67 mol de etanol por mol de xilosa (McMillan, 1993). De todos modos, la eficiencia energética de la fermentación de la xilosa resulta menos favorable que la de la glucosa, cuyo metabolismo fermentativo es más directo (McMillan, 1993). A ello se suman otros factores, como variaciones en la regulación metabólica, el transporte de pentosas, la disponibilidad de cofactores y la formación de metabolitos secundarios (Jeffries et al., 1983; McMillan, 1993). En cuanto a la arabinosa, la capacidad intrínseca de las levaduras para fermentarla a etanol es aún más infrecuente. Las pocas especies reportadas con esta característica—entre ellas *Ambrosiozyma monospora*—lo hacen con muy baja eficiencia (Dien et al., 1996; Fonseca et al., 2007).

3.1 Reconstrucción de rutas metabólicas C5 en *S. cerevisiae*

Una forma de incrementar la eficiencia fermentativa de las pentosas en el bioproceso se fundamenta en la modificación genética de la levadura *S. cerevisiae*. Como se ha mencionado, la asimilación de pentosas no es una característica nativa de esta especie. Aunque en su genoma se ha reportado la presencia de genes ortólogos que codifican enzimas involucradas en la vía oxidorreductiva, sus niveles de expresión son mínimos y las actividades enzimáticas prácticamente nulas, lo cual impide el uso de xilosa como sustrato (Toivari et al., 2004; Attfield & Bell, 2006; Nalabothu et al., 2023).

La importancia biotecnológica de *S. cerevisiae* en los procesos de obtención de etanol radica en sus notables atributos fermentativos a partir de hexosas. A esto se le suma su capacidad de afrontar diversos factores de estrés industrial. La levadura se destaca por sus rápidas cinéticas fermentativas, sus altos rendimientos en etanol, su elevada tolerancia al mismo y a bajos niveles de pH, y la relativa facilidad con la que puede ser manipulada genéticamente (Parapouli et al., 2020). Por estos motivos, *S. cerevisiae* ha sido objeto de intensos esfuerzos de ingeniería para reconducir su metabolismo hacia la fermentación de xilosa, y en menor grado, de arabinosa (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Wisselink et al., 2007; Moysés et al., 2016; Wagner & Gasch, 2023).

Los genes exógenos que codifican las enzimas XR y XDH provenientes de levaduras nativas fermentadoras de xilosa—como *Spathaspora passalidarum* y *Scheffersomyces stipitis*—han sido exitosamente expresados en diversas cepas de *S. cerevisiae* (Kötter & Ciriacy, 1993; Hahn-Hägerdal et al., 2007; Cadete et al., 2016). Actualmente, las enzimas de *Sp. passalidarum* son preferidas en la ingeniería porque la reacción que catalizan está mejor equilibrada desde el punto de vista redox, aspecto importante en condiciones anaeróbicas de fermentación (Cadete et al., 2016). Alternativamente, también es considerada la inserción heteróloga de la ruta XI—naturalmente redox neutral—utilizando genes eucariotas, como el de *Pyromyces* sp. (Kuyper et al., 2005), y bacteriano, como el de *Clostridium phytofermentans* (Brat et al., 2009). En cepas de *S. cerevisiae* recombinantes, la expresión de la enzima XI se acompaña comúnmente de la delección del gen nativo *GRE3*, para evitar la acumulación de xilitol y la consiguiente inhibición del proceso (Moysés et al., 2016).

La adopción del metabolismo de la arabinosa en *S. cerevisiae* se logra también mediante la expresión heteróloga, siendo la ruta de naturaleza bacteriana generalmente más eficaz que la ruta fúngica para sostener la fermentación (Richard et al., 2002; Becker & Boles, 2003; Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Para permitir el catabolismo completo de la xilosa y de la arabinosa, el aumento del flujo a través de la PPP debe acompañarse como modificación sistemática, ya que la actividad de esta ruta en *S. cerevisiae* se mantiene relativamente limitada (Johansson & Hahn-Hagerdal, 2002). Este paso—estándar en la reconfiguración del metabolismo C5—se sustenta mediante la sobreexpresión del gen endógeno de la xilulosa quinasa (XK) y de genes que codifican enzimas de la rama no oxidativa de la PPP, incluyendo transaldolasas y transcetolasas (Johansson & Hahn-Hagerdal, 2002; Kuyper et al., 2005; Hahn-Hägerdal et al., 2007; Wisselink et al., 2010; Kobayashi et al., 2018).

3.1.1 La ingeniería del catabolismo C5 en *S. cerevisiae* no es suficiente

La mera incorporación de las rutas metabólicas y la optimización de los flujos a través de la vía central del carbono no parecen ser suficientes para promover un desempeño fermentativo competente de *S. cerevisiae* ante las pentosas. A pesar de que las cepas recombinantes pueden fermentar la xilosa a etanol, incluso alcanzando rendimientos cercanos al máximo teórico, las tasas de consumo y las productividades siguen siendo inferiores en comparación con la glucosa (Osiro et al., 2019; Sharma & Arora, 2020; Brink et al., 2021; Wagner & Gasch, 2023). A esto se suma que las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* no suelen co-utilizar glucosa y pentosas, a causa de un proceso conocido como represión catabólica, lo que retrasa la fermentación de los sustratos C5 (Kim et al., 2013; Kayikci & Nielsen 2015; Brink et al., 2021).

Los aspectos que limitan a *S. cerevisiae* frente al uso de pentosas pueden tener diferentes orígenes: i) una contradicción al "forzar" el metabolismo de azúcares no nativos y la incapacidad de la levadura para reconocerlos como sustratos fermentables; ii) la ausencia de un sistema de transporte especializado para pentosas; y iii) una sobrecarga metabólica debido a la inserción y el ajuste simultáneo de rutas nuevas y endógenas en una única cepa (Lee et al., 2002; Osiro et al., 2019; Sharma & Arora, 2020; Shin et al., 2024). La presente tesis aborda estas problemáticas considerando sus causas y proponiendo modificaciones menos obvias que trascienden la introducción de rutas metabólicas. El Capítulo 1 explora la naturaleza de las señales moleculares inducidas por la xilosa y contempla si es posible modificar componentes de la señalización para orientar una respuesta más específica. El Capítulo 2 aborda la búsqueda, caracterización y optimización de transportadores alternativos para una captación más eficiente de pentosas en *S. cerevisiae*. Parte del Capítulo 3 considera la división del metabolismo de glucosa y de xilosa entre levaduras salvajes especializadas.

Esta estrategia plantea una alternativa a concentrar los esfuerzos de ingeniería metabólica en una misma plataforma microbiana.

3.2 Interés en levaduras no convencionales

Teniendo en cuenta que muchas de las limitaciones del metabolismo recombinante de pentosas están arraigadas a la biología de *S. cerevisiae*, una opción complementaria consiste en explorar la fisiología de las levaduras no tradicionales. Estas levaduras—también denominadas *non-Saccharomyces*—han seguido trayectorias evolutivas distintas y varias especies han adquirido competencias para el catabolismo de sustratos C5 (Geijer et al., 2022; Nalabothu et al., 2023; Ndubuisi et al., 2023). Este rasgo no solo implica la diversificación en las rutas metabólicas, sino también en la organización intrínseca de los sistemas regulatorios y de transporte (Hittinger et al., 2015). Por estas razones, las levaduras no convencionales representan reservorios de genes de proteínas transportadoras y enzimas que pueden ser transferidos a *S. cerevisiae*. Al mismo tiempo, surgen como plataformas microbianas particularmente atractivas para los bioprocesos no tradicionales, como los basados en la lignocelulosa (Geijer et al., 2022; Vasylyshyn et al., 2025).

Si bien las especies diferentes a *S. cerevisiae* no suelen emplearse como cultivos únicos a escala industrial, el estudio de su fisiología es un punto de partida relevante para su incorporación en configuraciones complementarias de bioprocesos. Entre este tipo de configuraciones se encuentran los bioprocesos consolidados (CBP, *consolidated bioprocessing*), en los cuales la sacarificación enzimática y la fermentación se integran parcial o completamente en una sola etapa (Periyasamy et al., 2023). Para tal fin, se puede recurrir a una única especie o a un consorcio microbiano (Periyasamy et al., 2023). En este último caso, los microorganismos involucrados asumen roles metabólicos diferenciados, como la división en la fermentación de los azúcares C6 y C5, para lo cual las levaduras no convencionales resultan aptas (Llamas et al., 2023). Con el propósito de avanzar en esta dirección, en el Capítulo 3 de la presente tesis se aborda la caracterización del metabolismo de xilosa en diversas levaduras.

4. Enfoque y estructura de la tesis

Debido a la importancia de los azúcares pentosas en bioprocesos sustentables de base lignocelulósica, su utilización por las levaduras debe considerarse en un contexto integrador (Figura 4).

Como se ha referido previamente, las pentosas no forman parte del repertorio natural de sustratos fermentables por *S. cerevisiae*. En la presente tesis, esta limitación se aborda desde diferentes perspectivas con la ambición de promover un uso más eficiente de los azúcares xilosa y arabinosa. En el Capítulo 1 se profundiza acerca de los mecanismos de señalización de la xilosa en *S. cerevisiae*, con foco en la percepción del azúcar a través de receptores de membrana. En esta instancia se evalúa si es posible redirigir la actividad de estos receptores y aumentar su sensibilidad por la xilosa (Figura 4). Los sistemas de transporte en *S. cerevisiae* muestran, por otro lado, afinidad residual hacia las pentosas. En el Capítulo 2 se incluye la caracterización de nuevas proteínas con actividad de transporte, junto con modificaciones orientadas a sostener y a potenciar el ingreso de azúcares pentosas al interior celular.

Finalmente, se investigan características metabólicas de levaduras no convencionales que pueden favorecer bioprocesos basados en sustratos C5. Ante tal fin, en el Capítulo 3 se consideran distintas variables que influyen sobre la utilización de la xilosa y se desarrolla una evaluación comparativa del proceso fermentativo en distintas especies. Se explora también una estrategia basada en cultivos mixtos como posible vía para distribuir las funciones metabólicas entre distintas especies de levaduras.

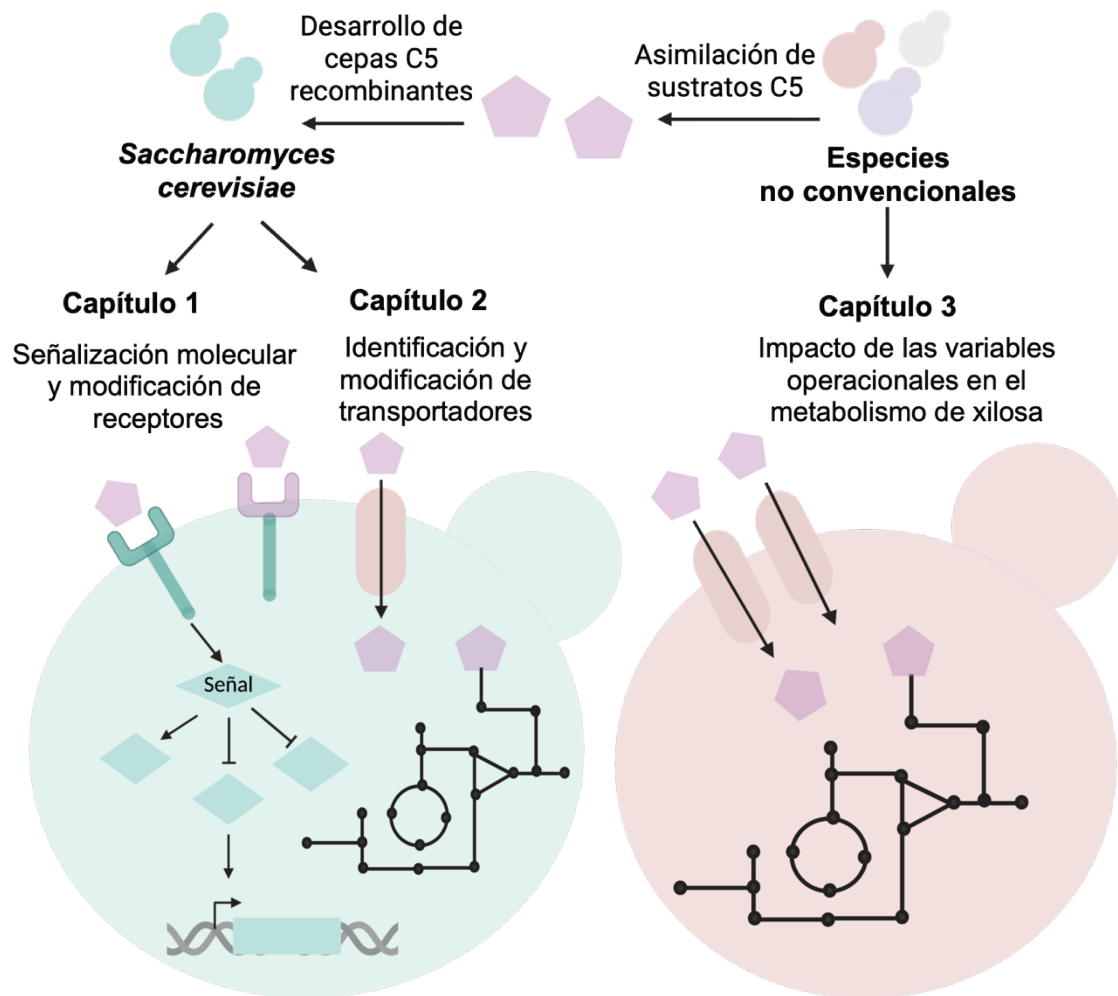


Figura 4. La presente tesis se estructura en el análisis de tres niveles moleculares que impactan la utilización de pentosas en las levaduras: señalización (Capítulo 1), transporte (Capítulo 2) y metabolismo (Capítulo 3).

Objetivos

1. Objetivo general

Desarrollar estrategias que contribuyan a bioprocesos robustos de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica empleando levaduras como plataformas productivas. Se propone abordar la mejora del uso de pentosas mediante la caracterización e ingeniería de los procesos moleculares involucrados en su reconocimiento, transporte y metabolismo, considerando *S. cerevisiae* y especies de levaduras no convencionales.

2. Objetivos específicos

- Analizar las respuestas de transducción de señales desencadenadas por la xilosa en cepas de *S. cerevisiae* nativas y recombinantes mediante biosensores fluorescentes, e investigar su reprogramación a través de la ingeniería de receptores de membrana (Capítulo 1).
- Identificar y caracterizar transportadores de pentosas de levaduras no convencionales y optimizar su expresión en cepas industriales recombinantes de *S. cerevisiae*, incluyendo variantes con mutaciones dirigidas para mejorar la captación de xilosa y de arabinosa (Capítulo 2).
- Evaluar y comparar el potencial fermentativo de levaduras no convencionales al utilizar xilosa en condiciones relevantes para los bioprocesos, considerando variaciones operacionales y la presencia de compuestos inhibidores propios de la biomasa lignocelulósica (Capítulo 3).
- Explorar la fermentación mixta entre levaduras con capacidades metabólicas complementarias como prueba de concepto para estrategias alternativas en el aprovechamiento de pentosas y de glucosa derivadas de la biomasa lignocelulósica (Capítulo 3).

Materiales y métodos generales

1. Materiales generales

1.1 Levaduras empleadas

En el presente trabajo de tesis se emplearon distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Capítulos 1, 2 y 3), así como diversas especies de levaduras no convencionales (Capítulo 3) (Tabla 1). Considerando que las construcciones genéticas y estrategias experimentales varían según los objetivos planteados en cada caso, las características específicas de cada levadura y sus condiciones de cultivo se presentan de manera individual en los respectivos capítulos.

Tabla 1. Principales levaduras utilizadas

Capítulo	Linaje/especie de levadura	Características relevantes y modificaciones
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303	Cepas nativas y recombinantes XR/XDH del catabolismo de xilosa. Introducción de biosensores transcripcionales basados en GFP para estudios de señalización molecular
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2	Cepas recombinantes XI del catabolismo de xilosa y AI/RK/RE del catabolismo de arabinosa. <i>Background</i> industrial. Delección del sistema de transporte de hexosas (<i>hxt-null</i>) para la expresión y caracterización de transportadores heterólogos
3	Especies no convencionales	Levaduras con capacidades nativas de asimilación de xilosa
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. Ethanol Red y <i>Saccharomyces bayanus</i>	Cepas con antecedentes industriales en bioprocesos de generación de etanol a partir de glucosa

1.2 Cepa de *Escherichia coli*

Se empleó *E. coli* NEB5 α (New England Biolabs, MA, USA) para la clonación, el almacenamiento y la preparación de plásmidos. El medio de cultivo utilizado fue LB (Luria-Bertani), que consistió en triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L, pH 7,0. La selección de transformantes se llevó a cabo en medio sólido (LB + 15 g/L de agar) adicionando ampicilina en una concentración final de 50 μ g/mL.

1.3 Medios de cultivo para la proliferación de levaduras

Se utilizaron medio mínimo sintético (YNB) o medio rico (YP) según el ensayo específico. Los medios sólidos se obtuvieron mediante el agregado de agar en una concentración final de 15 g/L.

Medio YNB (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos)

Composición: YNB 6,7 g/L (Becton–Dickinson and Company), tamponado con 50 mM de hidrogenoftalato de potasio (KHP) a pH 5,5. Este medio se utilizó para el análisis de levaduras mediante citometría de flujo y para la caracterización fisiológica de cepas de *S. cerevisiae* en estudios relacionados con las vías de señalización de los azúcares (Capítulo 1). Las fuentes de carbono se añadieron en las siguientes cantidades: glucosa 1 g/L, 5 g/L, 10 g/L y 40 g/L, y xilosa 50 g/L, según los requerimientos del ensayo.

Medio SC-Ura (sintético completo sin uracilo)

Composición: YNB 6,7 g/L (Becton–Dickinson and Company); 400 mg/L de *drop out* completo de aminoácidos sin uracilo. Este medio se usó en la selección de transformantes de *S. cerevisiae* por auxotrofia (Capítulo 2). Se añadieron distintos azúcares en diferentes cantidades para caracterizar posibles sustratos de transportadores. Las cepas *hxt-null* se cultivaron en maltosa 20 g/L para asegurar su crecimiento en ausencia de transportadores de hexosas.

Medio YP (medio rico)

Composición: extracto de levadura 10 g/L; peptona 20 g/L. El medio suplementado con 20 g/L de glucosa (YPD) se utilizó para el mantenimiento, la proliferación de cepas de *S. cerevisiae* y la selección de transformantes con 200 µg/L de geneticina (G418) y/o 100 µg/mL de nourseotricina (clonNAT) (Capítulo 1). En los experimentos del Capítulo 3, el medio YP modificado (extracto de levadura 5 g/L; peptona 3 g/L) suplementado con xilosa 10 g/L o 20 g/L (YPX) o glucosa 20 g/L (YPD) se empleó para la caracterización del desempeño fermentativo de levaduras no convencionales.

2. Métodos generales

En esta sección se presenta una descripción de las técnicas de biología molecular y metodologías comunes utilizadas a lo largo de la tesis. Cabe destacar que los

procedimientos específicos, así como cualquier modificación de las técnicas generales, se describen de manera detallada en los capítulos correspondientes.

2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Los fragmentos de ADN para expresión y delección de genes fueron amplificados por PCR utilizando la ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Por otro lado, los chequeos de inserción y delección de genes en *S. cerevisiae* y la verificación del ensamblado de plásmidos en *E. coli* se llevaron a cabo mediante PCR de colonia con la Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific). En ambos casos, se siguieron las indicaciones para una reacción de 50 μ L y se configuraron los programas de acuerdo con lo establecido por el fabricante. En cada uno de los capítulos se especifican los oligonucleótidos utilizados. La temperatura de *annealing* o hibridización de cada primer fue determinada utilizando la herramienta *online* Tm Calculator (<https://tmcalculator.neb.com>) especificando la polimerasa y el buffer utilizado. Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. Previo a las etapas de digestión y/o ligación, todos los productos de PCR que amplificaron una sola banda fueron purificados con el kit GeneJET PCR (Thermo Fisher Scientific).

2.2 Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas a lo largo del trabajo pertenecieron a Thermo Fisher Scientific. Para llevar a cabo las reacciones en 20 μ L finales, se procedió conforme a las especificaciones del fabricante. En casos puntuales, la enzima *DpnI* fue utilizada para remover el ADN plasmídico original empleado como molde en la reacción de PCR, previo a las reacciones de ligación y transformación de *E. coli*. Después de digerir el ADN, se incubaron las enzimas sensibles a la inactivación térmica a la temperatura y durante el tiempo especificados para cada enzima en particular. Los fragmentos de ADN digeridos se extrajeron del gel de agarosa y purificaron con el kit Gene-Jet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) antes de la reacción de ligación.

2.3 Reacción de ligación

La enzima T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) fue empleada para la ligación de insertos con vectores y para la re-circularización de plásmidos amplificados por PCR con oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5'. Las reacciones tuvieron lugar en un volumen final de 10 μ L con

1 U de enzima, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h antes de la transformación bacteriana. Para determinar la cantidad de ADN necesaria para la ligación, se estableció una relación molar entre vector e inserto de 1:3.

2.4 Transformación de *Escherichia coli* y obtención de plásmidos

El procedimiento descrito por Inoue et al. (1990) se empleó para la generación de células competentes y para su transformación. Las células se transformaron en un volumen de 50 μ L por el método clásico con 5 μ L de la mezcla de ligación. Los transformantes se seleccionaron en medio LB agarizado con 50 μ g/mL del antibiótico ampicilina. La extracción y purificación de plásmidos se realizó con el kit GeneJET plasmid MiniPrep (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Previamente, los clones positivos se cultivaron a 37 °C en 4 mL de medio LB suplementado con ampicilina entre 12 y 16 h. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 6000 x g durante 5 min para proceder con el protocolo de preparación plasmídica. La secuencia de todos los plásmidos originados se confirmó mediante secuenciación. Las cepas resultantes fueron almacenadas con el antibiótico a -80 °C en 25% (v/v) de glicerol.

2.5 Transformación de *S. cerevisiae*

El protocolo de transformación con acetato de litio de Gietz & Schiestl (2007) fue empleado para las transformaciones de *S. cerevisiae*. El método se modificó añadiendo un 10% (v/v) de DMSO antes del choque térmico (Hill et al., 1991). El día previo a la transformación, colonias aisladas de las cepas de levaduras se incubaron en 10 ml de medio rico a 30 °C durante toda la noche con agitación constante a 180 rpm. Las levaduras se transfirieron con una DO_{620nm} inicial de 0,4 a 25 ml de medio rico nuevo con o sin la adición de antibiótico, según cada transformación. Los cultivos se dejaron crecer en las mismas condiciones durante 4-5 h hasta un mínimo de 1,5 divisiones. Las células se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 3220 x g y se realizó un lavado del pellet celular con agua estéril. Las células se resuspendieron usando 1 mL de solución LATE (acetato de litio 100 mM; Tris-HCL 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) para proceder con el protocolo mencionado (Gietz & Schiestl, 2007). Se emplearon 50 μ L de células competentes por cada transformación, las cuales se incubaron con 36 μ L de acetato de litio 1M; 8 μ L de TRIS-HCL 0,5M (pH 7,5); 4 μ L de EDTA 100 mM y 50 μ L de

la solución de ADN correspondiente. Además, se añadieron 25 μL de una solución 5X de espermatozoides de salmón (Thermo Fisher Scientific) desnaturalizado a cada tubo de transformación. Las levaduras se transformaron con plásmidos y también se generaron cepas recombinantes mediante co-transformación de un vector junto con fragmentos lineales de ADN. En este caso particular, después del shock térmico a 42 °C durante 20 min, se dejaron recuperar las células resuspendidas en 1 mL de medio YPD entre 2-6 h con agitación constante. Finalmente, las células se resuspendieron en agua estéril, se sembraron en el medio selectivo correspondiente y se dejaron crecer a 30 °C durante 2-4 días hasta la aparición de colonias. La correcta inserción en el genoma fue analizada mediante PCR de colonia. Todos los clones positivos se almacenaron en su respectivo medio selectivo a -80 °C en glicerol al 25% (v/v).

Capítulo 1.

Detección de la xilosa extracelular en *S. cerevisiae*



1. Introducción

1.1 Mecanismos de transducción de señales

En levaduras, la asimilación de nutrientes es un proceso fundamental que permite el crecimiento, la reproducción y la ejecución de diversas funciones metabólicas. La glucosa es la fuente de carbono preferencial y de más rápida asimilación en *S. cerevisiae* (Dickinson & Schweizer, 2004). Cuando este carbohidrato está presente en el medio de cultivo, las células inducen su transporte y su metabolismo (Dickinson & Schweizer, 2004). Esto se debe a que la levadura ha desarrollado mecanismos moleculares complejos de señalización, que provocan reorganizaciones en el patrón de inducción y represión génica—regulación a nivel transcripcional—y modificaciones en la actividad, estabilidad y/o localización de proteínas—regulación a nivel post-traducciona l y alostérico—(Gancedo, 2008). La señal de presencia de glucosa se desencadena extracelularmente, mediante el reconocimiento por receptores de membrana, e intracelularmente, a través de su internalización, su fosforilación y la acumulación de intermediarios metabólicos (Figura 5). Las rutas de transmisión de señales de *S. cerevisiae* actúan de forma coordinada e integrada, estableciéndose un vínculo entre procesos regulatorios y metabólicos (Rolland et al., 2001).

Mediante el mecanismo de represión catabólica o CCR (por las siglas en inglés de *carbon catabolite repression*), la levadura prioriza el uso de la glucosa frente a otras fuentes de carbono presentes en medios de cultivo mixtos (Gancedo, 1998). Esto ocurre, en parte, a causa de vías de señalización que reprimen la expresión de genes de proteínas esenciales implicadas en la captación y en el metabolismo de sustratos alternativos (Kayikci & Nielsen, 2015). Además, la cinética intrínseca de los principales transportadores favorece la captación de la glucosa frente a otro tipo de azúcares (Apel et al., 2016).

Cuando la ingeniería de *S. cerevisiae* se limita a la inserción de nuevas capacidades metabólicas, sin considerar los mecanismos regulatorios, la producción de metabolitos de interés puede resultar ineficiente, dado que ambos procesos están relacionados (Gopinarayanan & Nair, 2018a). En el caso de la glucosa, se han caracterizado las vías moleculares de transducción de señales, pero la respuesta de la levadura frente a sustratos que no son nativos, como la xilosa, no está del todo esclarecida. Resulta entonces relevante comprender en profundidad los mecanismos moleculares que están detrás de la detección de la xilosa o, en su defecto, la posible

ausencia de dichos mecanismos. Este capítulo se enfocó específicamente en elucidar el efecto de la xilosa extracelular a nivel de receptores de membrana.

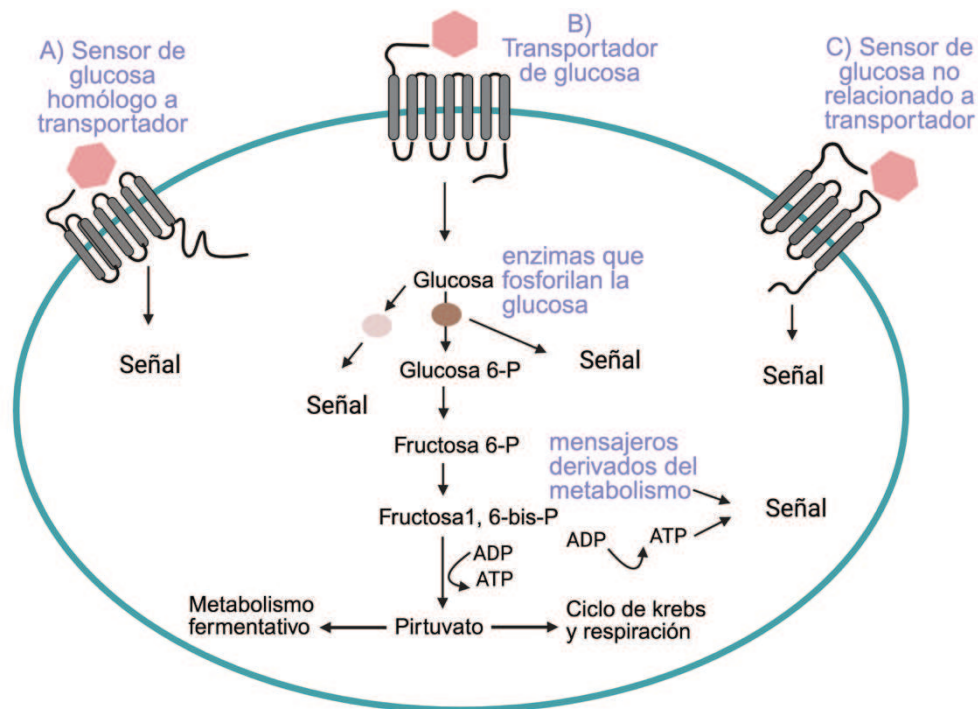


Figura 5. Los orígenes de señalización de glucosa en *S. cerevisiae* son diversos. La presencia de glucosa en el medio activa la señalización a través de : a) su reconocimiento en la superficie celular por sensores de membrana homólogos a transportadores de glucosa; b) su internalización mediante transportadores y posterior metabolización; c) su interacción con un receptor de membrana estructuralmente diferente a las proteínas transportadoras. Figura modificada de Rolland et al. (2001).

Los mecanismos de señalización de glucosa en *S. cerevisiae* se clasifican generalmente en tres rutas principales (Figura 6): (a) la vía Rgt2p/Snf3p de detección de glucosa extracelular e inducción de genes de transportadores *HXT*; (b) la vía AMPc/PKA de control y regulación del crecimiento, el metabolismo y la respuesta a estrés; y (c) la vía SNF1/Mig1p, responsable de la represión por la glucosa y del control del uso de fuentes de carbono alternativas (Peeters & Thevelein, 2014; Brink et al., 2021). Dichas vías convergen en la regulación de la expresión de genes diana a través de la modificación de represores y/o activadores de la transcripción, los cuales son controlados por una o más señales moleculares.

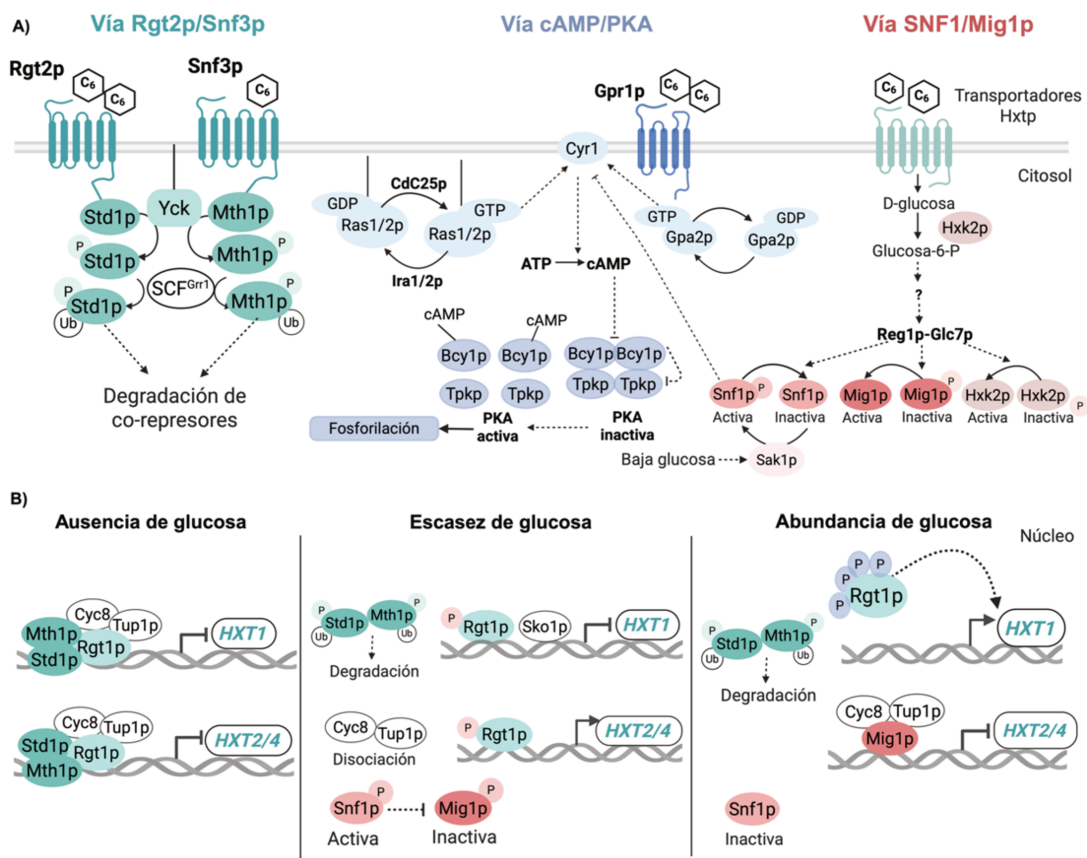


Figura 6. Panorama general de la detección de glucosa y mecanismos de señalización en *S. cerevisiae*. A) La vía de inducción de los genes de transportadores *HXT* está controlada por los receptores de membrana Snf3p y Rgt2p (cian), que detectan niveles bajos y altos de glucosa extracelular, respectivamente. La vía de represión por glucosa mediada por SNF1/Mig1p (rojo) controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo de sustratos alternativos. La vía que conduce a la síntesis de AMPc y a la activación de PKA (azul) activa enzimas glicolíticas, induce genes relacionados con el crecimiento y reprime genes asociados a estrés. B) Mecanismos de represión e inducción por glucosa de los genes *HXT* en diferentes condiciones, mediados principalmente por las señales de Rgt2p/Snf3p, aunque también intervienen señales de la ruta AMPc/PKA y SNF1/Mig1p. Figura adaptada de Bolzico et al. (2025).

A continuación, se resume la ruta de detección de la glucosa que se tomó como base para el análisis de la xilosa. Posteriormente se describe la tecnología empleada para monitorear dichas señales.

1.1.1 Vía Rgt2p/Snf3p de inducción por glucosa

En *S. cerevisiae*, la glucosa extracelular es detectada por los receptores de membrana Rgt2p y Snf3p, que transducen la señal al interior celular y regulan de manera diferencial la expresión de los genes de transportadores de hexosas *HXT*, optimizando así la entrada del azúcar (Özcan & Johnston, 1999). El receptor Rgt2p percibe niveles

elevados de glucosa (>~10 g/L), lo que induce la expresión de transportadores de glucosa de alta capacidad y baja afinidad, como *HXT1*. En cambio, el sensor Snf3p responde a concentraciones limitantes de glucosa (~1-3 g/L) y estimula la transcripción de genes de transportadores de mediana afinidad, como *HXT2* y *HXT4* (Figura 6) (Özcan & Johnston, 1995; Kim et al., 2013).

Las proteínas Rgt2p y Snf3p pertenecen a la familia de transportadores de hexosas (Hxtp) y, aunque no internalizan la glucosa, presentan secuencias de aminoácidos muy similares a la de los transportadores/facilitadores. Se ha sugerido que los sensores evolucionaron a partir de los transportadores Hxtp y adquirieron en su lugar un papel regulador en la detección de la glucosa extracelular (Özcan et al., 1996; Donzella et al., 2023). Las proteínas de la familia Hxtp se caracterizan estructuralmente por poseer 12 dominios transmembrana. Los sensores se distinguen de los transportadores principalmente por sus colas citoplasmáticas largas presentes en el extremo C-terminal (Figura 7), implicadas en la transmisión de la señal (Özcan et al., 1996). El receptor Rgt2p posee una cola de aproximadamente 200 aminoácidos con un motivo repetitivo de 25 residuos, mientras que Snf3p presenta una cola más larga de aproximadamente 300 residuos con dos copias del dominio conservado (Figura 7) (Özcan et al., 1996; Busti et al., 2010). La delección de estos dominios citosólicos elimina por completo la transducción de la señal (Özcan et al., 1998). Por otro lado, la fusión de la cola del receptor a un transportador funcional de la misma familia restaura la señalización (Özcan et al., 1998; Kim et al., 2024b), mientras que la sobreexpresión de los receptores sin cola genera una señal parcial (Moriya & Johnston, 2004). En su conjunto, estos hallazgos sugieren que las colas citoplasmáticas participan en la amplificación, estabilización y la transducción completa de la señal molecular que desencadena la presencia de glucosa.

En general, se acepta que la detección de glucosa mediada por Snf3p y Rgt2p funciona de manera análoga a la de los receptores de superficie de ligandos en células de mamíferos (Özcan et al., 1998; Johnston & Kim, 2005). Según el modelo establecido, la glucosa se uniría a los dominios transmembrana de Snf3p y Rgt2p, generándose un cambio conformacional en los sensores que activa a las proteínas caseína quinasas Yck1/2p, ancladas a la membrana plasmática (Moriya & Johnston, 2004; Johnston & Kim, 2005). Esta activación desencadena la fosforilación de los co-represores transcripcionales Std1p y Mth1p, los cuales interaccionan con las colas citoplasmáticas de los receptores (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000; Moriya & Johnston, 2004). La fosforilación de Std1p y Mth1p permite su posterior ubiquitinación por el complejo SCF-Grr1p y, por tanto, su degradación en el proteasoma (Flick et al., 2003; Moriya & Johnston, 2004) (Figura 6).

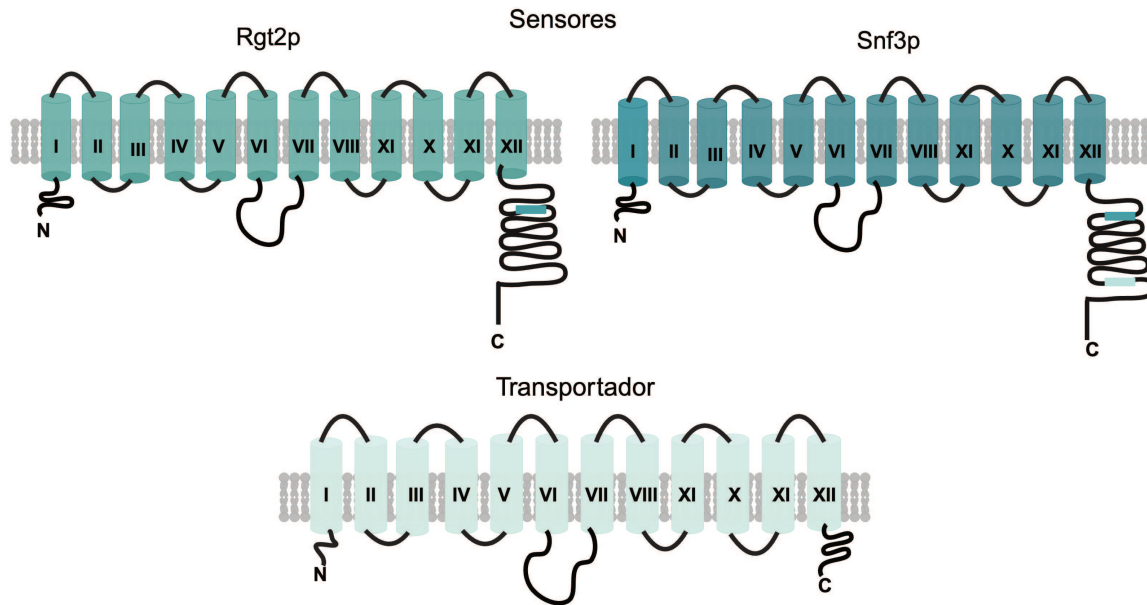


Figura 7. Estructura de las proteínas sensoras de glucosa, Rgt2p y Snf3p, y de las transportadoras de hexosas de la familia Hxt. Las proteínas poseen 12 dominios transmembrana, representados mediante los cilindros enumerados del I al XII, los cuales presentan un alto grado de conservación. Por el contrario, las colas citoplasmáticas en el extremo C terminal difieren considerablemente en longitud y composición de aminoácidos. Los sensores se caracterizan por poseer colas largas, también denominadas dominios de señalización, involucrados en la respuesta celular. Los recuadros representan los motivos repetitivos, con dos copias para Snf3p y una para Rgt2p. Figura adaptada de Bolzico et al. (2025).

En ausencia de glucosa, Sth1p y Mth1p forman en el núcleo un complejo con el represor Rgt1p, que a su vez recluta a los co-represores Cyc8p y Tup1p, inhibiendo la transcripción de los transportadores *HXT* (Figura 6B) (Lakshmanan et al., 2003; Gancedo, 2008, Roy et al., 2013). En condiciones de disponibilidad de glucosa, las señales transducidas por los receptores inducen la degradación de Mth1p y Std1p, lo que libera al complejo represor y permite la expresión de los genes de transportadores.

1.1.2 Integración de señales en la regulación de genes *HXT*

La desrepresión completa de los genes *HXT*, así como la selectividad del transportador que se expresa en condiciones de alta o baja glucosa, también dependen de señales originadas por otras rutas regulatorias, entre ellas la vía de la PKA, la ruta SNF1/Mig1p y la vía HOG de alta osmolaridad a través de Sko1p (Figura 6) (Busti et al., 2010; Conrad et al., 2014; Brink et al., 2021).

Uno de los puntos de intersección clave es la modulación del estado de fosforilación del factor de transcripción Rgt1p. Una vez liberado el complejo represor Mth1p/Std1p-Cyc8p-Tup1p, Rgt1p se vuelve susceptible a la fosforilación (Palomino et

al., 2006; Jouandot et al., 2011). En condiciones de alta glucosa, Rgt1p es hiperfosforilado por la quinasa PKA, que está activa en este contexto, convirtiendo a Rgt1p en un activador de la transcripción de *HXT1* (Kim & Johnston, 2006; Palomino et al., 2006; Roy et al., 2013) (Figura 6B). Al mismo tiempo, la expresión de *HXT2* y *HXT4* es reprimida en estas condiciones por acción de Mig1p de la vía SNF1/Mig1p (Westholm et al., 2008; Brink et al., 2021). Este mecanismo opera cuando la glucosa es abundante y la quinasa SNF1 permanece inactiva, con su target Mig1p desfosforilado, lo que mantiene la represión transcripcional de los genes *HXT2/4* (Conrad et al., 2014) (Figura 6B). En contraste, cuando los niveles de glucosa escasean, se induce la expresión de los transportadores de afinidad moderada *HXT2/4*, ya que todos sus represores son inactivados: Mth1p/Std1p por la vía del receptor de membrana Snf3p, y Mig1p mediante la acción de la quinasa SNF1 (Figura 6B) (Brink et al., 2021). Esto da lugar a la fosforilación parcial de Rgt1p y a su disociación de los co-represores Cyc8p-Tup1p (Roy et al., 2013), permitiendo la transcripción. No obstante, la fosforilación de Rgt1p bajo limitación de glucosa es controversial: no hay evidencia directa de que la PKA sea responsable de este proceso, aunque sí hay indicios de la participación de la quinasa SNF1 (Palomino et al., 2006), la cual se encuentra activa en estas condiciones.

1.2 Monitoreo de señales: biosensores fluorescentes

Un biosensor se puede definir como una construcción diseñada para monitorear un proceso celular, una función biológica específica o un analito de interés, traduciendo una señal medible, como puede ser la fluorescencia, la colorimetría o una medida electroquímica (Zhou et al., 2015; Tellechea-Luzardo et al., 2023). Los biosensores combinan un componente de detección o sensado y un componente reportero que traduce dicha señal. Particularmente, los biosensores basados en proteínas fluorescentes se han aplicado para estudiar diversos eventos fisiológicos en levaduras, como cambios en el pH intracelular, en los niveles de ATP y el balance redox (Knudsen et al., 2014; Pianale et al., 2022; Foncillas et al., 2023; Sreenivas et al., 2024). También se han utilizado para explorar rutas de transducción de señales moleculares en *S. cerevisiae* (Chambers et al., 2004; Brink et al., 2016; Osiro et al., 2018).

Los biosensores fluorescentes diseñados para monitorear vías de señalización se basan en el control de la expresión de una proteína fluorescente, como la GFP (*Green Fluorescent Protein*), mediante promotores de genes diana que responden o son regulados por una vía determinada. Otros tipos de construcciones reporteras, como las fusiones promotor-lacZ, en lugar de fluorescencia, cuantifican la inducción transcripcional midiendo la actividad β -galactosidasa (Özcan & Johnston, 1995). Brink et al. (2016) desarrollaron y validaron un panel de biosensores fluorescentes basados en GFP capaces de reportar la actividad de las tres vías principales de señalización de la glucosa en *S. cerevisiae*: Rgt2p/Snf3p (promotores *HXT1p/HXT2p*), AMPc/PKA (promotor *TPS1p*) y SNF1/Mig1p (promotor *SUC2p*). Las construcciones promotor-GFP se integraron individualmente en un locus definido del genoma, generando cepas reporteras estables de *S. cerevisiae* (Brink et al., 2016). De esta manera, al exponer las cepas a diferentes fuentes de carbono, es posible determinar indirectamente la activación o represión de una vía específica a través de la cuantificación de fluorescencia.

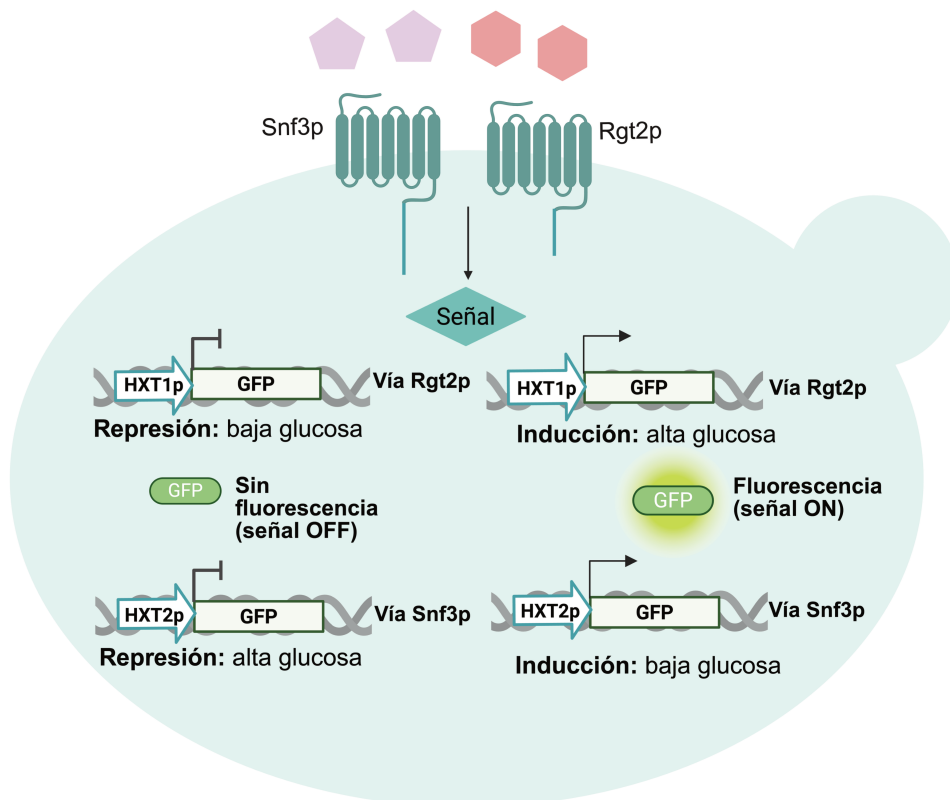


Figura 8. Biosensores basados en GFP que indican la actividad de las vías controladas por los receptores Rgt2p y Snf3p. Se indican las condiciones normales de inducción o represión de cada biosensor según las reportadas en Brink et al. (2016). Baja glucosa corresponde a concentraciones del azúcar de 1 g/L y alta glucosa de 40 g/L. En este sistema, los promotores de genes representativos de cada ruta se activan o reprimen frente a los diferentes azúcares, reflejando un aumento o disminución de la fluorescencia, respectivamente.

A lo largo de este capítulo se emplearon los biosensores *HXT1p-GFP* y *HXT2p-GFP* (Figura 8), establecidos para reportar la actividad de los receptores Rgt2p y Snf3p, respectivamente (Brink et al., 2016). Esto permite analizar la respuesta de las células de *S. cerevisiae* frente a la xilosa extracelular. En el caso de que estos receptores detecten xilosa, la señal molecular se transduce, se liberan los reguladores negativos de los promotores *HXT*, lo que conduce a la expresión de la GFP y, en consecuencia, a un incremento en la emisión de fluorescencia (Figura 8). Cabe resaltar que las interconexiones con otras rutas regulatorias añaden un nivel adicional de complejidad a la interpretación de los datos, aspecto que será considerado durante el análisis de los resultados presentados.

1.2.1 Cuantificación de la fluorescencia por citometría de flujo

Existen diversas técnicas que permiten cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida por la GFP u otras proteínas fluorescentes. Entre ellas se encuentran la fluorimetría, mediante el uso de espectrofluorímetros o lectores de placas; la microscopía de fluorescencia, que permite medir la señal fluorescente con resolución subcelular, y la citometría de flujo. El potencial de la citometría de flujo radica en la cuantificación individual de la fluorescencia emitida por cada célula de una población (*single cell analysis*). Esta característica permite generar distribuciones poblacionales y detectar heterogeneidad en la fluorescencia en condiciones específicas. Esta técnica se utilizó en el presente trabajo para analizar los perfiles fluorescentes de las cepas reporteras. Las células de levaduras se cultivan en ciertas condiciones y se analizan en el citómetro, permitiendo una detección rápida y en tiempo real de la actividad de los promotores *HXT* que componen los biosensores (Figura 9).

El principio básico de la técnica consiste en que las células en suspensión son conducidas mediante un sistema de fluidos, atravesando uno o varios rayos láser, lo que genera una dispersión de la luz que es registrada por un conjunto de detectores (Figura 9). La dispersión de la luz visible se detecta en dos direcciones: el forward scatter (FSC) que es relativo al tamaño celular y el side scatter (SSC) que refleja la complejidad de la célula. Simultáneamente, la fluorescencia emitida por distintos marcadores en las células como la GFP o la RFP, se detecta en canales específicos correspondientes al espectro de emisión de cada proteína (McKinnon, 2018).

Cada evento (célula) genera una señal y, en su conjunto, las poblaciones celulares se analizan según los parámetros SSC, FSC e intensidad de fluorescencia (IF). Los datos se representan en gráficos de dos parámetros (*dot plots*), por ejemplo,

FSC vs. IF, o en histogramas (Figura 9). También pueden registrarse los valores medios de la intensidad de fluorescencia y del tamaño de la población.

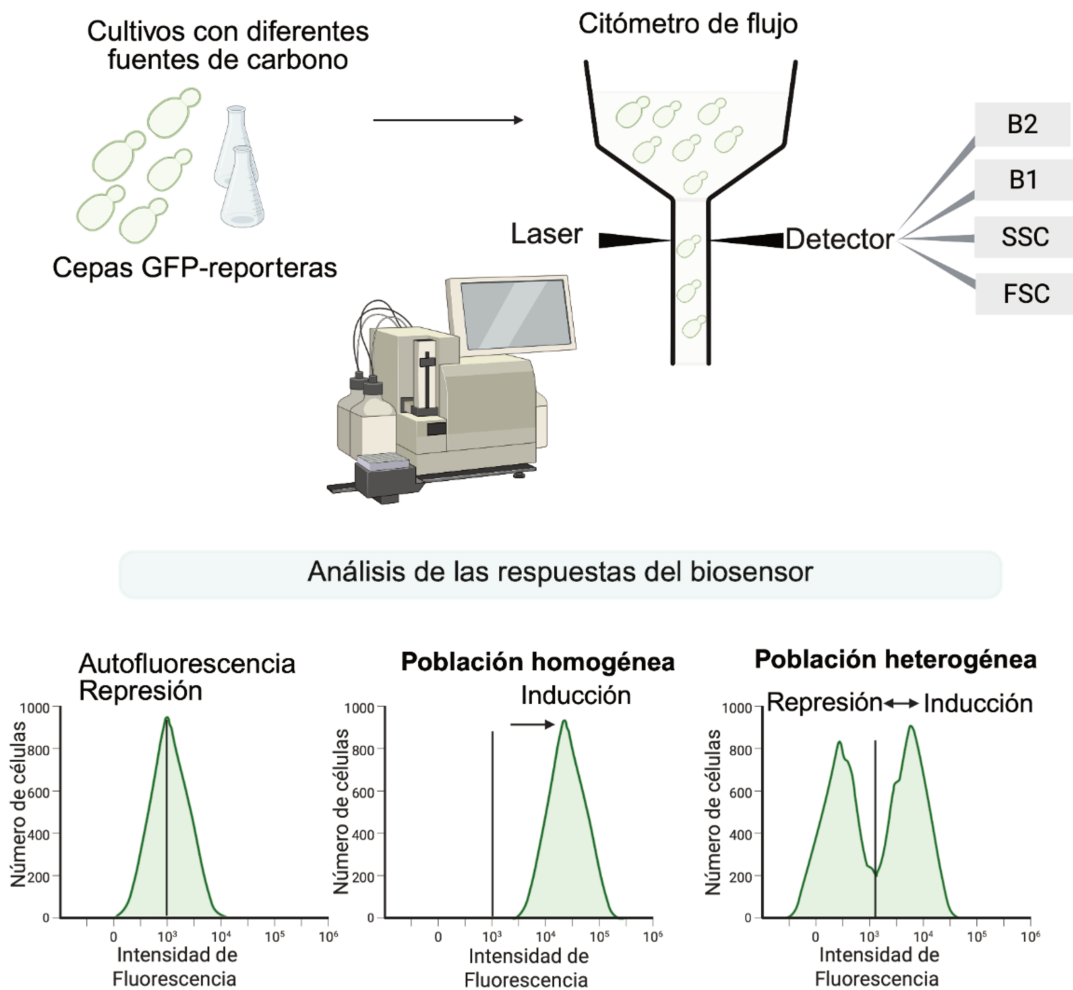


Figura 9. Representación de la técnica de citometría de flujo utilizada en este trabajo para detectar la fluorescencia de los biosensores y analizar las respuesta de las cepas frente a distintos azúcares. Los resultados se presentan habitualmente en gráficos de histograma, como se ejemplifica en la figura. La línea recta indica la autofluorescencia de la cepa.

A lo largo de este capítulo, las respuestas de los biosensores *HXT1p-GFP* y *HXT2p-GFP* se representan en forma de histogramas (Figura 9). En primer lugar, siempre se detecta la señal de autofluorescencia inherente a las células—es decir, en cepas que no portan GFP ni otro reportero—, la cual se indica con una línea de referencia (Figura 9). Un aumento en la intensidad de fluorescencia debido a la inducción del biosensor se refleja en un desplazamiento del pico hacia la derecha (Figura 9). Contrariamente, la represión del biosensor ocurre cuando su señal se solapa con la autofluorescencia o cuando se da un corrimiento del pico hacia la izquierda

(Figura 9). La aparición de dos subpoblaciones con diferentes intensidades de fluorescencia (una inducida y otra reprimida) evidencia la existencia de heterogeneidad dentro de la población celular.

1.3 Respuesta no fermentativa de *S. cerevisiae* hacia la xilosa

Como se mencionó anteriormente, las estrategias de mejoramiento de *S. cerevisiae* han permitido incorporar transportadores optimizados para la captación de xilosa y rutas funcionales para su asimilación (Demeke et al., 2013; Cadete et al., 2016; Kwak & Jin, 2017). Aun así, el proceso de fermentación de xilosa por cepas recombinantes de *S. cerevisiae* es menos eficiente que cuando se trata de la glucosa, lo que obstaculiza el aprovechamiento de los sustratos lignocelulósicos para la generación de etanol. Estudios precedentes han hipotetizado sobre la ausencia de un sistema específico que perciba la xilosa y que desencadene una respuesta acorde a la fermentativa (Brink et al., 2016; Osiro et al., 2018; Osiro et al., 2019; Brink et al., 2021). La xilosa influye en cierta medida en las rutas de señalización descritas para glucosa (Brink et al., 2021). No obstante, los mecanismos nativos permiten a la levadura regular y optimizar rápidamente su metabolismo para fermentar la glucosa, pero no la preparan para responder de manera competitiva ante una fuente de carbono inusual.

Indicios de una respuesta regulatoria peculiar frente a la xilosa se evidenciaron en función de los siguientes aspectos: i) inducción de respuestas típicas de inanición (*starvation*) en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Salusjärvi et al., 2006); ii) predominio de una respuesta respiratoria sobre fermentativa, incluso en condiciones de oxígeno limitante (Jin et al., 2004; Salusjärvi et al., 2008; Matsushika et al., 2014; Zeng et al., 2016); y iii) aumento en la expresión de genes asociado a estrés y a la gluconeogénesis, acompañado de una disminución en la expresión de genes glicolíticos (Salusjärvi et al., 2008; Matsushika et al., 2014; Zeng et al., 2016). De manera consistente, se ha comprobado una reducción de la actividad de la enzima PKA en presencia de xilosa (Brink et al., 2016; Osiro et al., 2018; Osiro et al., 2019). En conjunto, estas observaciones indican que cuando las células de *S. cerevisiae* se enfrentan a la xilosa, los mecanismos regulatorios adoptan un patrón opuesto al fermentativo, lo cual podría impedir un catabolismo eficiente de este azúcar. Es importante resaltar que la señal de inanición, o de "falta de nutrientes", observada con xilosa no parece depender únicamente de este sustrato. Un patrón similar se ha detectado durante el crecimiento de *S. cerevisiae* con el disacárido celobiosa (Chomvong et al., 2017), otro sustrato que

solo puede asimilarse por vías recombinantes. Esta respuesta generalizada podría asociarse entonces con el metabolismo de azúcares no nativos, que simulan un estado de escasez de glucosa en la célula.

La respuesta celular a la xilosa parece diferir de la provocada por la glucosa, pero los mecanismos moleculares implicados aún no están del todo claros, lo que subraya la necesidad de estudios adicionales (Gopinarayanan & Nair, 2018a; Brink et al., 2021). Trabajos previos en cepas de *S. cerevisiae* modificadas con la vía XR/XDH mostraron que la xilosa, cuando se metaboliza, ejerce un efecto de señalización similar al de la exposición a concentraciones limitantes de glucosa, activando la vía SNF1/Mig1p (Osiro et al., 2018; Osiro et al., 2019). Esta respuesta podría deberse, en parte, a un flujo limitante en la vía de asimilación de la xilosa y/o a una activación incompleta de la ruta AMPc/PKA (Osiro et al., 2018; Borgström et al., 2022). Cuando la xilosa no se metaboliza, su presencia extracelular prácticamente no provoca ninguna respuesta en la célula (Brink et al., 2016). Sin embargo, estos autores registraron una inducción parcial del gen reportero *HXT2p*, pero en ese momento se excluyó la posibilidad de una detección directa de la xilosa por el receptor Snf3p (Brink et al., 2016). En su lugar, atribuyeron dicha inducción a la xilosa endógena, hipotetizando que esta podría activar la transcripción de *HXT2p* como resultado de una internalización inespecífica y estocástica a través de transportadores promiscuos (Brink et al., 2016). En este trabajo de tesis se planteó una hipótesis alternativa: Snf3p podría sensor inespecíficamente la xilosa y generar una señal que desencadene la transcripción de *HXT2p*. Algunos autores sugieren que esto es posible, aunque también asignan un rol menor al receptor Rgt2p (Wu et al., 2020), mientras que otros sostienen que Snf3p no es capaz de detectar xilosa (Dietvorst et al., 2010). Esta discrepancia requiere ser aclarada mediante ensayos alternativos.

Atendiendo a lo expuesto, resultó de particular interés evaluar de manera sistemática si los receptores de membrana podían reconocer la xilosa, tanto en cepas de *S. cerevisiae* que pueden metabolizarla como en aquellas que no poseen esta capacidad. A lo largo de este capítulo, se analizarán: i) los efectos de modular los niveles de los receptores Rgt2p y Snf3p sobre la respuesta a la xilosa; ii) la posibilidad de dirigir un sensado específico de xilosa mediante receptores quiméricos y iii) el impacto de la activación de los receptores en el metabolismo de la pentosa.

Las actividades descritas en este capítulo se llevaron a cabo en la *Division of Biotechnology and Applied Microbiology* (anteriormente TMB) de la Universidad de Lund, Suecia. Parte de los resultados fueron publicados por Bolzico et al. (2025) en el artículo titulado "*Glucose receptor deletion and engineering: impact on xylose sensing and utilization in Saccharomyces cerevisiae*".

2. Objetivos

- Dilucidar el efecto de la xilosa sobre las vías de señalización dependientes de la glucosa en cepas nativas y genéticamente modificadas de *S. cerevisiae*, mediante biosensores de fluorescencia.
- Evaluar el efecto de la xilosa extracelular en la vía Snf3p/Rgt2p de *S. cerevisiae* salvaje mediante la inactivación de los receptores de membrana.
- Analizar las diferencias entre las señales de la xilosa y las inducidas por la glucosa en la vía Snf3p/Rgt2p.
- Comparar el efecto de la delección y sobreexpresión de *SNF3* en variantes de *S. cerevisiae* sin y con capacidad de metabolizar xilosa.
- Diseñar e implementar receptores de membrana quiméricos como estrategia de ingeniería de transducción de señales.
- Dilucidar el rol de la internalización de xilosa en la inducción de *HXT2* mediante la construcción de variantes truncadas de un transportador.
- Determinar si las señales de la vía Snf3p influyen en el desempeño fisiológico de una cepa recombinante de *S. cerevisiae* cuando metaboliza xilosa.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Oligonucleótidos utilizados para PCR y secuenciación

Los oligonucleótidos se adquirieron en la empresa Eurofins Genomics (Bersberg, Alemania). La secuencia y descripción de cada cebador se detalla en la Tabla 1 del Apéndice I.

3.1.2 Plásmidos utilizados y construidos

En el desarrollo de este capítulo se utilizaron plásmidos integrativos de levaduras sin marcador de selección (de la serie "EasyClone-MarkerFree"; Jessop-Fabre et al., 2016), que permitieron la integración estable de construcciones génicas en sitios definidos del genoma de *S. cerevisiae* mediante el sistema CRISPR-Cas9. Además, se utilizaron y generaron plásmidos que expresan los ARN guías necesarios para llevar a cabo las modificaciones genéticas propuestas, tanto inserciones (la secuencia diana en el genoma pertenece a una región intergénica definida) como deleciones génicas (la secuencia diana pertenece al gen a deleccionar). Las características de los vectores se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Vectores usados y construidos en este trabajo para expresión y deleción de genes en *S. cerevisiae*

Plásmido	Características relevantes	Referencias
pBB01	AmpR; <i>SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-SNF3tail- SNF3t</i>	SynBio
pBB02	AmpR; <i>RGT2p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-RGT2tail- RGT2t</i>	SynBio
<i>Vectores integrativos</i>		
pCfB3035	X-4-MarkerFree backbone	Jessop-fabre et al. (2016)
pCfB3036	XI-1-Markerfree backbone	Jessop-fabre et al. (2016)
YIplac128 GAL2-N376F	TDH3p-GAL2^{N376F}-CYC1t	Osiro et al. (2018)
pBB01INT	pCfB3036; SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-SNF3tail- SNF3t	Esta tesis
pBB02INT	pCfB3035; RGT2p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-RGT2tail- RGT2t	Esta tesis
pBB03INT	pBB01INT; SNF3p-GAL2^{N376/M435I}-SNF3t	Esta tesis
pBB04INT	pBB01INT; SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-SNF3t	Esta tesis
pBB05INT	pBB01INT; SNF3p-GAL2^{N376Y/435I}trunc CT-SNF3t	Esta tesis

pBB06INT	pBB01INT; SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I/F377V/S379F}trunc-SNF3tail-SNF3t	Este trabajo
<i>Vectores replicativos</i>		
pCfB2312	TEF1p-Cas9-CYC1t; kanMX	Jessop-fabre et al. (2016)
pCfB3042	SNR52p-gRNA_X4-CYC1t; natMX	Jessop-fabre et al. (2016)
pRS42n	TEF1p-natMX-ADH1t	Taxis & Knop (2006)
pUC57 + ClnXI	pUC57; TEF1p- LpXImut2 -GPM1t	Persson et al. (2023)
YIpGFP	yEGFP3-PGK1t	Brink et al. (2016)
pBBg1	SNR52p-gRNA_SNF3-CYC1t; natMX	Esta tesis
pBBg2	SNR52p-gRNA_SNF3-CYC1t; natMX	Esta tesis
pBBg3	SNR52p-gRNA_SNF3-CYC1t; natMX	Esta tesis
pBBg7	SNR52p-gRNA_RGT2-CYC1t; natMX	Esta tesis
pBBg8	SNR52p-gRNA_RGT2-CYC1t; natMX	Esta tesis
pBBg9	SNR52p-gRNA_RGT2-CYC1t; natMX	Esta tesis
pBBg12	SNR52p-gRNA_XI-1-CYCt; natMX	Esta tesis
pBBg13	SNR52p-gRNA_GAL2-CYCt; natMX	Esta tesis
pBBg14	SNR52p-gRNA_GAL2-CYCt; natMX	Esta tesis
pBB07	SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-GFP-SNF3t; natMX	Esta tesis
pBB08	SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}-GFP-SNF3t; natMX	Esta tesis
pBB09	pBB07; TDH3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc-SNF3tail-GFP-SNF3t	Esta tesis
pBB10	pBB08; TDH3p-GAL2^{N376Y/M435I}-GFP-SNF3t	Esta tesis
pBB11	pUC57; TEF1p-SNF3-GPM1t	Esta tesis

3.1.3 Cepas de *S. cerevisiae*

Las cepas reporteras utilizadas en este capítulo, tanto el linaje que integra el biosensor *HXT2p-GFP* (TMB37X3) como el linaje que integra *HXT1p-GFP* (TMB37X2), fueron desarrolladas por Brink et al. (2016) y Osiro et al. (2018). Las cepas TMB3713 y TMB3712 no poseen capacidad de metabolizar xilosa (denominadas cepas *background*). La cepa TMB3723 internaliza eficientemente la xilosa mediante la expresión del transportador Gal2^{N376F}, pero no la metaboliza. La cepa TMB3753 expresa el mismo transportador y la vía-óxido reductiva del catabolismo de la xilosa XR/XDH, junto con los genes *TAL1* y *TKL1* de la ruta PPP. En este trabajo, dichas cepas fueron sometidas a las siguientes modificaciones genéticas para analizar la detección de la xilosa en mayor profundidad: delección de los receptores nativos *RGT2* y *SNF3*, sobreexpresión del receptor *SNF3*, delección del transportador nativo *GAL2*, inserción de receptores quiméricos transportador-sensor e inserciones de diversas variantes del transportador *GAL2^{N376Y/M435I}*, al que se refiere como *GAL2mut*. La Tabla 3 proporciona

las especificaciones de cada cepa generada. Además, se indican los controles de autofluorescencia (cepas sin GFP) necesarios para el análisis por citometría de flujo.

Tabla 3. Lista de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas y generadas para evaluar la activación de las vías de señalización mediadas por los receptores de membrana Rgt2p y Snf3p.

Cepa	Biosensor	Genotipo	Origen
Cepas background			
TMB3700		W303-1A <i>TRP1 HIS3; ura3::M3499 (ADE2)</i>	Brink et al. (2016)
TMB3711	Control	TMB3700; <i>can1::Ylp211; SPB1/PBN1::Ylp128</i>	Brink et al. (2016)
TMB3712	<i>HXT1p</i>	TMB3700; <i>can1::YlpGFP-HXT1p; SPB1/PBN1::Ylp128</i>	Brink et al. (2016)
TMB3713	<i>HXT2p</i>	TMB3700; <i>can1::YlpGFP-HXT2p; SPB1/PBN1::Ylp128</i>	Brink et al. (2016)
Inserción del transportador GAL2^{N376F}			
TMB3721	Control	TMB3700; <i>can1::Ylp211; SPB1/PBN1::Ylp128 GAL2^{N376F}</i>	Osiro et al. (2018)
TMB3723	<i>HXT2p</i>	TMB3700; <i>can1::YlpGFP-HXT2p; SPB1/PBN1::Ylp128 GAL2^{N376F}</i>	Osiro et al. (2018)
Inserción de la vía metabólica de la xilosa XR/XDH			
TMB3751	Control	TMB3721; <i>Vac17/MRC::TKL-TAL^a; ChrX-2/XI-5/XII-4::XR-XDH-XK^b</i>	Osiro et al. (2018)
TMB3753	<i>HXT2p</i>	TMB3723; <i>Vac17/MRC::TKL-TAL^a; ChrX-2/XI-5/XII-4::XR-XDH-XK^b</i>	Osiro et al. (2018)
Delección de los receptores de membrana RGT2 y SNF3			
TMBB10	<i>HXT1p</i>	TMB3712; <i>rgt2Δ</i>	Esta tesis
TMBB11	<i>HXT2p</i>	TMB3713; <i>snf3Δ</i>	Esta tesis
TMBB24	Control	TMBB11; <i>snf3Δ</i>	Esta tesis
TMBB25	Control	TMB3721; <i>snf3Δ</i>	Esta tesis
TMBB26	<i>HXT2p</i>	TMB3723; <i>snf3Δ</i>	Esta tesis
TMBB27	Control	TMB3751; <i>snf3Δ</i>	Esta tesis
TMBB28	<i>HXT2p</i>	TMB3753; <i>snf3Δ</i>	Esta tesis
Sobreexpresión de SNF3			
TMBB35	Control	TMB3711; <i>ChrX4::TEF1p-SNF3-GPM1t</i>	Esta tesis
TMBB33	<i>HXT2p</i>	TMB3713; <i>ChrX4::TEF1p-SNF3-GPM1t</i>	Esta tesis
TMBB34	<i>HXT2p</i>	TMB3753; <i>ChrX4::TEF1p-SNF3-GPM1t</i>	Esta tesis
Inserción del receptor quimérico GAL2^{N376Y/M435I}trunc-RGT2tail			
TMBB04	Control	TMB3711; <i>ChrX-4::RGT2p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc(Δ531)-RGT2tail-RGT2t</i>	Esta tesis
TMBB05	<i>HXT1p</i>	TMB3712; <i>ChrX-4::RGT2p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc(Δ531)-RGT2tail-RGT2t</i>	Esta tesis
TMBB08	<i>HXT1p</i>	TMBB05; <i>rgt2Δ</i>	Esta tesis

Inserción del receptor quimérico Gal2^{N376Y/M435I}trunc-Snf3tail y diferentes variantes

TMBB07	Control	TMB3711; ChrXI-1::SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc^c(Δ531)-SNF3tail-SNF3t	Esta tesis
TMBB06	HXT2p	TMB3713; ChrXI-1::SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc^c(Δ531)-SNF3tail-SNF3t	Esta tesis
TMBB09	HXT2p	TMBB06; snf3Δ	Esta tesis
TMBB12	HXT2p	TMB3713; ChrXI-1::SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}-SNF3t	Esta tesis
TMBB13	HXT2p	TMB3713; ChrXI-1::SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc^c(Δ531)^e-SNF3t	Esta tesis
TMBB19	HXT2p	TMB3713; ChrXI-1::SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I}trunc^cCT(Δ519)^f-SNF3t	Esta tesis
TMBB20	HXT2p	TMB3713; ChrXI-1::SNF3p-GAL2^{N376Y/M435I/F377V/S379F}trunc^c(Δ531)^e-SNF3tail-SNF3t	Esta tesis
TMBB21	HXT2p	TMBB20; snf3Δ	Esta tesis

Delección del transportador wild-type GAL2

TMBB14	HXT2p	TMB3713; gal2Δ	Esta tesis
--------	--------------	-----------------------	------------

Transportador y receptor quimérico fusionado a la GFP

TMBB29		TMB3711; pBB07	Esta tesis
TMBB30		TMB3711; pBB08	Esta tesis
TMBB31		TMB3711; pBB09	Esta tesis
TMBB32		TMB3711; pBB10	Esta tesis

^a TKL-TAL= *FBA1p-TKL1-PDC1t; TPI1p-TAL1-CPS1t*

^b XR-XDH-XK= *TDH3p-SpXYL1.2-ADH1t; TEF1p-SsXDH-GPM1t; PGI1p-XKS1-PYK1t*

^c Trunc = transportador truncado

^e(Δ531)= truncación a partir del residuo 531 de Gal2mut, eliminado los aminoácidos 531 en adelante

^f(Δ519)=truncación a partir del residuo 519 de Gal2mut, eliminando los aminoácidos 519 en adelante, delecionando completamente el dominio C-terminal

3.2 Métodos

3.2.1 Ingeniería genética de levaduras mediante CRISPR-Cas9

En este Capítulo, la herramienta CRISPR-Cas9 se aplicó para la edición genética de cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* W303, específicamente utilizando la tecnología desarrollada por Jessop-Fabre et al. (2016). Esta metodología se ha asociado con altas eficiencias de inserción y/o disrupción de genes específicos, de forma rápida y simultánea, evitando la introducción y reciclado de marcadores de selección, lo que supone una gran ventaja frente a los métodos tradicionales de ingeniería genética (Stepchenkova et al., 2023). El sistema se basa en la inducción de un corte (DSB, *double strand break*) en una región puntual del genoma mediante el complejo Cas9/ARNg.

Brevemente, la enzima Cas9 se une al *scaffold* del ARNg y es guiada hacia el sitio específico del genoma de acuerdo con la secuencia *spacer* presente en el gRNA (Figura 10). Esta secuencia, generalmente de 20 pb, es homóloga a la región del genoma a modificar (región *target*). La nucleasa Cas9 genera entonces el corte específico en el sitio PAM (5'-NGG-3') de la secuencia diana y, en el caso particular de *S. cerevisiae*, el corte es reparado preferentemente mediante el mecanismo de recombinación dirigida por homología (HDR) utilizando un fragmento exógeno de ADN molde o *donor*. Este fragmento está flanqueado en ambos extremos por regiones complementarias a la secuencia diana (Figura 10).

En este trabajo se construyeron los plásmidos ARNg que contienen secuencias dirigidas a los genes de los receptores nativos *SNF3* y *RGT2* y al del transportador *GAL2*. También se generaron los ADN *donor*, con el fin de delecionar dichos genes (sección 3.2.2). Por otro lado, se construyeron los plásmidos integrativos que permitieron la inserción de receptores quiméricos y de casetes de expresión en regiones genómicas específicas de las cepas reporteras de (sección 3.2.4).

Como método general, para llevar a cabo las modificaciones comentadas, las levaduras fueron inicialmente transformadas con 0,4 µg del plásmido pCfB2312 que contiene el casete de expresión de la Cas9 y confiere resistencia a geneticina (G418). La selección se realizó en medio YPD agarizado suplementado con 200 µg/mL de G418. Luego, se procedió a la co-transformación con 1 µg del plásmido gRNA correspondiente que confiere resistencia a nourseotricina (ClonNAT) y 1 µg del ADN donante, ya sea para delección o expresión de genes. Los clones positivos se seleccionaron en placas de YPG que contenían 200 µg/mL de G418 y 100 µg/mL de ClonNAT. La correcta inserción de casetes de expresión en regiones intergénicas definidas se evaluó mediante PCR de colonia utilizando set de primers que hibridan por fuera del sitio de recombinación. La delección de genes se confirmó mediante doble chequeo. Por un lado, se utilizaron sets de primers internos (que hibridan en los genes wt) y, por otro, primers que hibridan en el DNA donante y por fuera del lugar de recombinación (los primers se especifican en la Tabla 1 del Apéndice I). Para proceder a una nueva ronda de transformación o previo a la preparación de *stocks* de células y a los ensayos de citometría de flujo y de caracterización, se perdieron los plásmidos guías y la resistencia a ClonNAT mediante cultivos sucesivos en medio YPG + G418. La pérdida de dichos plásmidos fue confirmada mediante cultivos paralelos en medio YPD con ambos antibióticos. Las colonias individuales que solo crecieron en el medio con geneticina fueron transferidas al medio YPG líquido y cultivadas *overnight* a 30°C para obtención del *stock* del cultivo. Las cepas modificadas de *S. cerevisiae* resultantes se conservaron a -80°C en 25% (v/v) de glicerol.

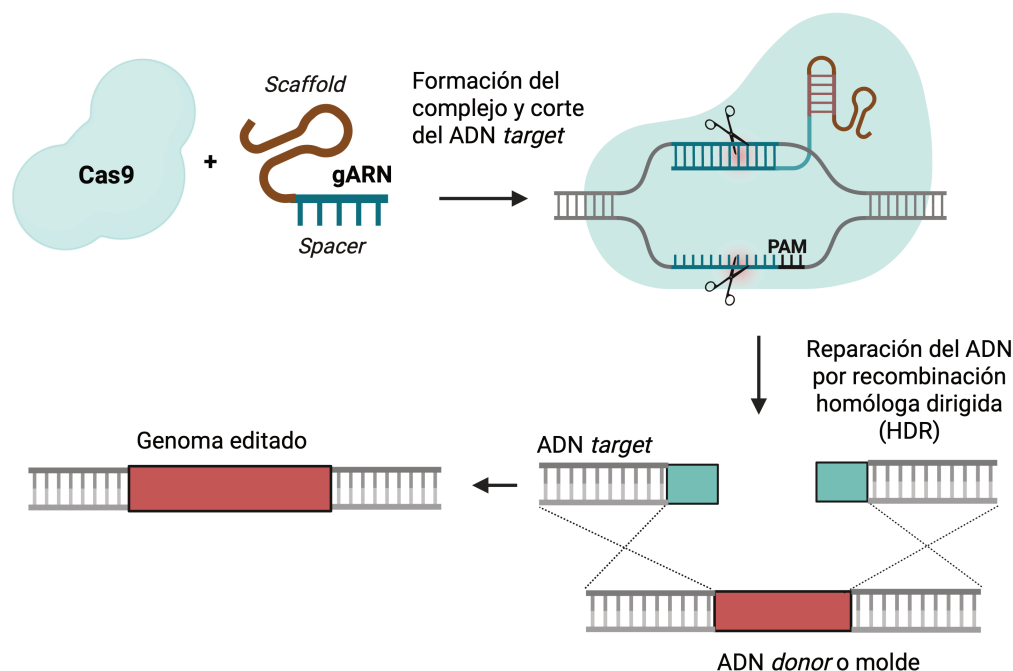


Figura 10. Representación esquemática del sistema CRISPR-Cas9 utilizado para modificar genéticamente *Saccharomyces cerevisiae*. El ARNg contiene una región *spacer* de 20 nucleótidos complementaria al gen o región diana y una región *scaffold* que permite la interacción con Cas9. La secuencia diana debe contener el motivo PAM (5'-NGG-3') para que Cas9 genere el corte. Mediante el mecanismo de reparación dirigida por homología (HDR) con un ADN *donor* que posee secuencias complementarias al sitio diana, es posible inactivar genes, introducir mutaciones puntuales o insertar nuevas secuencias de interés.

3.2.2 Delección de receptores y transportadores

Delección de receptores de membrana

Las mutantes simples del receptor de alta glucosa fueron obtenidas mediante *knockout* del gen *RGT2* en la línea de cepas reporteras que integran el biosensor *HXT1p*, TMB3712 y TMBB05, generando las mutantes TMBB10 y TMBB08, respectivamente. Por otro lado, el gen del receptor de baja glucosa, *SNF3*, se deletó en la línea de cepas reporteras que integran *HXT2p*: TMB3713, TMBB06, TMB3723, y TMB3753. Así se generaron las contrapartes mutantes TMBB11, TMBB09, TMBB26 y TMBB28, respectivamente (Tabla 3). La disrupción de *SNF3* también se realizó en las cepas control de autofluorescencia (isogénicas sin GFP): TMB3711, TMB3721 y TMB3751, generando las mutantes TMBB24, TMBB25 y TMBB27, respectivamente (Tabla 3).

Se construyeron y probaron tres plásmidos guías (ARNg) para cada receptor. El plásmido pCfB3042 (Jessop-fabre et al., 2016) sirvió como molde para amplificar por PCR los nuevos ARNg usando un único primer reverse fosforilado, BBg6, el cual hibrida

con el promotor SNR52, junto con diferentes primers forward fosforilados que introducen secuencias de 20 pb complementarias a *RGT2* y *SNF3* (Tabla 1 del Apéndice I). El diseño y elección de estas secuencias se realizó a través de las herramientas Benchling (<https://www.benchling.com/>) y CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), seleccionando como referencia el genoma de *S. cerevisiae* S288C. El uso conjunto de estas dos herramientas permite predecir sitios en el genoma con potencial efecto *off-target* y diseñar ARNg con baja complementariedad hacia secuencias no deseadas. Los ARNg lineales amplificados por PCR fueron posteriormente ligados con T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific), previa digestión con DpnI para remoción del plásmido molde, seguido de propagación en *E. coli* DH5 α . Todos los plásmidos resultantes (Tabla 2) fueron confirmados mediante secuenciación (Eurofins Genomics) usando el primer LW_8. Para reparar el corte generado por Cas9, se amplificaron por PCR dos fragmentos de ADN donante. Cada uno consistió en un fragmento de 300 pb del casete de resistencia a ampicilina, flanqueado por secuencias homólogas de 50 pb correspondientes a las regiones *upstream* (promotor) y *downstream* (terminador) de los genes y de la región del corte. Las levaduras que expresaban Cas9 fueron transformadas simultáneamente con el plásmido guía y el ADN donante correspondiente a *RGT2* o *SNF3*. Las cepas mutantes *snf3* Δ y *rgt2* Δ generadas se detallan en la Tabla 3.

Delección del transportador nativo GAL2

Se empleó la misma estrategia para la delección del ORF del transportador nativo *GAL2* en la cepa TMB3713. Para ello, se construyeron dos plásmidos guía con secuencias de 20 pb homólogas a *GAL2* y el fragmento de ADN donante con 50 pb flanqueantes al promotor y terminador del gen. de la cepa de *S. cerevisiae* resultante *gal2* Δ se denominó TMBB14.

3.2.3 Sobreexpresión del receptor *SNF3*

El ORF del gen *SNF3* se colocó bajo un promotor constitutivo fuerte y se integró genómicamente en cepas biosensoras TMB3713 y TMB3753 en el locus X-4 (Jessop-Fabre et al., 2016). El casete de sobreexpresión se construyó amplificando el gen de *SNF3* a partir del ADN genómico de *S. cerevisiae* W303 utilizando los primers BB56_Fw y BB57_Rv, introduciendo sitios de restricción SfaI y MreI, respectivamente. El inserto se digirió con dichas enzimas, se purificó y se ligó en el plásmido pUC57-ClosXI, previamente digerido con las mismas enzimas, entre el promotor *TEF1* y el terminador *GPM1*. Luego de la transformación de células de *E. coli* competentes, los clones se

verificaron por PCR de colonia. El plásmido resultante, pBB11, se verificó por secuenciación Sanger. Para permitir la integración genómica del casete de sobreexpresión de *SNF3*, se amplificaron por PCR, a partir del ADN genómico de W303, dos fragmentos de aproximadamente 500 pb correspondientes a las regiones upstream y downstream del locus X-4. Para la amplificación de estos fragmentos, se utilizaron cebadores con colas de 55 pb homólogas al promotor *TEF1* y al terminador *GPM1* (Tabla 1 del Apéndice I). Los fragmentos resultantes son complementarios a los extremos 5' y 3' del casete de sobreexpresión, lo que facilitó la recombinación homóloga doble y la integración genómica. Las cepas que portaban del plásmido de la Cas9 se co-transformaron con 1 µg del plásmido guía dirigido al locus X-4 (pCfB3042); 0,5 µg de cada uno de los fragmentos homólogos al sitio X-4 y al casete de *SNF3*; y 0,5 µg del fragmento *TEF1p-SNF3-PGM1t* liberado del vector pBB11 mediante la digestión con HindIII y KpnI. La correcta integración se verificó mediante PCR de colonia. Las cepas generadas que sobreexpresan *SNF3* se denominaron TMBB33, TMBB34 y TMBB35 (Tabla 3).

3.2.4 Construcción de plásmidos integrativos

Receptores quiméricos Gal2mut-ST y Gal2mut-RT

Los receptores quiméricos se generaron fusionando el transportador de xilosa Gal2p^{N376Y/M435I} o Gal2mut (aminoácidos 1 a 530; truncado en el extremo C-terminal) con las colas citoplasmáticas o *tails* de Rgt2p (aminoácidos 556 a 763) y Snf3p (aminoácidos 553 a 884). Para mayor simplicidad, los receptores quiméricos se denominaron Gal2trunc-ST (Gal2^{N376Y/M435I}trunc-Snf3tail) y Gal2trunc-RT (Gal2^{N376Y/M435I}trunc-Rgt2tail). Los promotores de los genes de *RGT2* (700 pb *upstream* del ORF) y *SNF3* (550 pb *upstream* del ORF) fueron seleccionados para la expresión de las quimeras. Los casetes de expresión génica fueron sintetizados por SynBio (<https://synbio-tech.com/gene-synthesis/>). Los genes de Gal2trunc-ST y Gal2trunc-RT fueron clonados en los vectores integrativos pCfB3036 y pCfB3035 (Jessop-Fabre et al., 2016), respectivamente, mediante digestión con las enzimas *AscI* y *SbfI*, resultando en los vectores pBB01INT y pBB02INT, respectivamente. Los vectores pCfB3036 y pCfB3035 permiten la integración única de genes en las regiones intergénicas XI-1 (*ChrXI; MNN4/PTK1*) y X-4 (*ChrX; GSH1/LSB6*), respectivamente, del genoma de *S. cerevisiae*. El *backbone* de pCfB3035 y de pCfB3036 se amplificaron mediante PCR con los primers 35_R, 36_R y 35-36_F para insertar los sitios *AscI* y *SbfI* y permitir la ligación de los genes. Los insertos quiméricos se clonaron entre secuencias flanqueantes presentes en el vector que permiten la recombinación homóloga en los loci mencionados. Previo

a la reacción de ligación, el vector molde fue removido mediante digestión con DpnI. Luego de la propagación en *E. coli*, el correcto ensamblado de los plásmidos integrativos, pBB01INT (*GAL2trunc-ST*; XI-1) y pBB02INT (*GAL2trunc-RT*; X-4), se verificó por PCR de colonia y mediante secuenciación de Sanger (Eurofins Genomics).

Variantes de Gal2mut-ST usadas como controles

Para un análisis más detallado de la respuesta de Gal2mut-ST, se construyeron variantes del transportador expresadas por el mismo promotor *SNF3*, pero sin el dominio citoplasmático o cola del receptor. El plásmido integrativo pBB01INT con el receptor quimérico *GAL2trunc-ST* se empleó como molde para generar las variantes mediante clonado por enzimas de restricción. La versión completa del transportador *GAL2mut* (sin truncar) se obtuvo al amplificar el fragmento faltante del dominio C-terminal usando como molde el vector YIplac128-GAL2N376F (Osiro et al. 2018) y los primers GAL2Cter_NcoI_F/GAL2_MfeI_R. Luego de la digestión con las enzimas NcoI y MfeI, el fragmento fue ligado en el vector pBB01INT clivado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pBB03INT. De manera similar, para construir pBB04INT (*GAL2mut* truncado) y pBB05INT (*GAL2mut* truncado completamente en el dominio C-terminal), se amplificaron por PCR dos fragmentos correspondientes a cada parte de la truncación (hasta los aminoácidos 530 y 518, respectivamente) con el mismo primer *forward*, GAL2_BglII_Fw, y diferentes primers *reverse*, GAL2trunc_NcoI_Rv y GAL2trunc_CT_NcoI_Rv. Los fragmentos se cortaron con BglII/NcoI y se ligaron posteriormente con el vector pBB01INT digerido con las mismas enzimas.

3.2.5 Mutagénesis dirigida del receptor quimérico

Las sustituciones aminoacídicas F377V y S379F se realizaron en la construcción quimérica Gal2trunc-ST. Para este fin, se empleó el plásmido integrativo que contiene la quimera, pBB01INT, como molde para una reacción de PCR inversa con primers fosforilados en el extremo 5'. El plásmido completo se amplificó con los primers Gal2_Mut_Fw, que contenía los dos mismatch para generar los cambios en los residuos, y Gal2_Mut_Rv. Después de la reacción de amplificación, se purificó el vector lineal y se digirió con la enzima DpnI. La re-circularización se llevó a cabo mediante incubación con DNA T4 ligasa y posterior transformación de células competentes de *E. coli*. El plásmido resultante fue verificado por secuenciación y se denominó pBB06INT.

3.2.6 Integración de casetes de expresión

La cepa *background* TMB3712 (*HXT1p*-GFP) fue utilizada para insertar la construcción quimérica Gal2trunc-RT en el locus X-4, derivando en la cepa TMBB05. Por otro lado, el receptor quimérico basado en *Snf3p*, Gal2trunc-ST, fue integrado en TMB3713 (*HXT2p*-GFP) en el locus XI-1 originando la cepa TMBB06. Así mismo, el mismo sitio intergénico de TMB3713 fue empleado para introducir individualmente el transportador Gal2mut (cepa TMBB12); la versión truncada del transportador utilizada en la quimera, pero sin cola citoplasmática (cepa TMBB13); y una versión truncada de Gal2mut con el dominio C-terminal del transportador completamente deletado (TMBB19). Además, la variante mutagenizada de la quimera con las sustituciones F377V y S379F se insertó en el mismo sitio genómico, originando la cepa TMBB20 (Tabla 3).

Las cepas de *S. cerevisiae* que expresaban la Cas9 fueron co-transformadas con los genes flanqueados en ambos extremos con secuencias para recombinación en XI-1 o X-4, obtenidos mediante linealización de los vectores integrativos con NotI. Los plásmidos guía también se incluyeron durante la misma transformación. El plásmido ARNg pCfB3042 (Jessop-Fabre et al., 2016; sitio XI-1) y el vector pBBg12 (región X-4) se usaron para facilitar los cortes respectivos en las regiones intergénicas mencionadas. En este trabajo, las cepas reporteras utilizadas derivan del linaje de *S. cerevisiae* W303. Debido a diferencias entre la secuencia diana de XI-1 presente en el vector guía pCfB3043 (Jessop-Fabre et al., 2016; diseñado para cepas con *background* CEN.PK) y de la región complementaria en el genoma de *S. cerevisiae* W303, se construyó un nuevo ARNg. Este se denominó pBBg12. Tras la transformación y selección, los clones positivos que integraron correctamente los genes quimérico y de las variantes de Gal2mut fueron identificados mediante PCR de colonia (Tabla 1 del Apéndice I). En la Tabla 3 se indican las cepas generadas y su correspondiente genotipo.

3.2.7 Citometría de flujo

La señal de fluorescencia de los biosensores de las cepas reporteras fue medida mediante citometría de flujo. Para dicho análisis, se implementó un diseño experimental similar al descrito por Brink y et al. (2016) pero con ciertas modificaciones que se describen a continuación.

Condiciones de cultivo y del análisis por citómetro

En primer lugar, se cultivó una colonia las cepas reporteras y de control de autofluorescencia en tubos Falcon con 5 mL de medio YNB suplementado con 20 g/L de glucosa para alcanzar suficiente biomasa celular. En segundo lugar, con la biomasa generada se

inocularon 25 mL de medio YNB contenido en frascos Erlenmeyer de 250 mL, en las siguientes condiciones represoras: medio con 40 g/L de glucosa para reprimir el biosensor *HXT2p* y medio con 5 g/L de glucosa para reprimir *HXT1p*. Los cultivos comenzaron con una DO_{620nm} inicial de 0,05 y se incubaron durante 12 horas a 30 °C con el fin de obtener una mejor represión de los reporteros y establecer una línea de base con la menor intensidad de fluorescencia posible antes de comenzar el análisis. Finalmente, las cepas reporteras se ensayaron para determinar la intensidad de fluorescencia (IF). Para ello, los cultivos en estado de represión de los biosensores se cosecharon y su biomasa se lavó dos veces con medio YNB. La biomasa resultante se inoculó a una DO_{620nm} inicial de 0,4 en frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 25 mL de medio YNB. Las condiciones ensayadas fueron las siguientes: medio YNB sin fuente de carbono (NS); 1 g/L de glucosa (G1); 40 g/L de glucosa (G40) y 50 g/L de xilosa (X50). Las muestras se tomaron al inicio (0 h; inmediatamente después de la inoculación) y a las 6 h de cultivo en cada condición. Cuando fue necesario, la señal de fluorescencia del biosensor se monitoreó a lo largo del tiempo.

Cada muestra se trató con 10 µg/mL de yoduro de propidio (PI) con el fin de discriminar células no viables. Las células se analizaron en el citómetro de flujo MACSquant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Los detectores B1 (525/50 nm; canal B1-A::FITC-A) y B2 (585/40 nm; canal B2-A::PI_LSS) se utilizaron para medir la fluorescencia emitida por la GFP y por el colorante fluorescente PI, respectivamente. Se colectaron 20.000 eventos por muestra y se ajustó un umbral en el canal FSC-H para incluir únicamente las células de levaduras y excluir el ruido de fondo. Todos los cultivos y mediciones se realizaron en réplicas biológicas independientes.

Análisis de los datos

Los datos en formato .FSC se extrajeron y se analizaron utilizando el software FlowJo v10 (BD Life Sciences). El procesamiento de los datos mediante *gating* se realizó de la siguiente manera: primero, se descartaron las células permeabilizadas usando el canal B2-A::PI_LSS y, luego, para el grupo de células viables, se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (IF) de la GFP en el canal B1-A::FITC-A. Se aseguraron al menos 10.000 eventos para la cuantificación. Cuando se observaron dos poblaciones con diferentes IF de GFP en cultivos con xilosa (heterogeneidad en la población), se aplicó *gating* en los gráficos de dispersión de FSC-A vs GFP-A para separar la subpoblación de baja IF (izquierda) de la de alta IF (derecha). En la Figura 11 se ejemplifica dicho proceso.

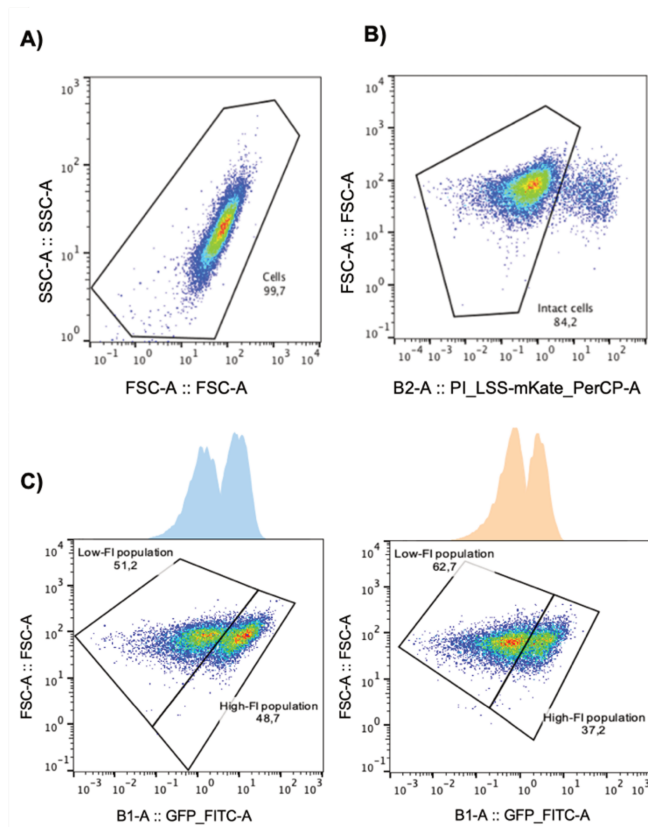


Figura 11. Ejemplo del *gating* para la selección de poblaciones específicas de células de levaduras por citometría de flujo. A) Identificación de la población total de células de levaduras. B) Separación de células intactas de las células con membranas permeabilizadas mediante fluorescencia del yoduro de propidio (PI). C) Distinción de dos subpoblaciones según la intensidad de fluorescencia del biosensor: baja (izquierda; represión) y alta (derecha; inducción).

Para evaluar la inducción o represión de cada biosensor, se calculó el *fold change* (FC) o la tasa de cambio entre la IF de la muestra a tiempo final (6h) y a tiempo inicial (0h). Los datos de IF se normalizaron según el tamaño celular (valores de FSC-A) para corregir posibles variaciones de señal debidas a diferencias de tamaño entre células cultivadas en distintos sustratos. Como control negativo, se incluyeron cepas sin biosensor ni GFP para determinar la autofluorescencia basal en las mismas condiciones experimentales.

3.2.8 Extracción de ARN y análisis por RT-qPCR

La expresión del gen *HXT2* se analizó mediante RT-qPCR. Las células se cultivaron bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente para el análisis por citometría de flujo. Las muestras se tomaron a los 15 y 45 minutos después de la inoculación en medio YNB que contenía 1 g/L de glucosa o 50 g/L de xilosa. Para detener la actividad transcripcional y metabólica de las células, las muestras de cultivo se sometieron a un proceso de *quenching* con metanol frío ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las células se

centrifugaron a 0 °C a 1800 rpm y los pellets celulares se lavaron con agua libre de ARNasas y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de la extracción de ARN. El ARN total se purificó utilizando el kit MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (Biosearch Technologies), que incluye tratamiento con DNasa I para eliminar ADN genómico contaminante. Para la síntesis de cDNA, 0,4 µg de ARN total de cada muestra se transcribieron reversamente utilizando el kit PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Bio).

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo con el kit TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROX Plus (Takara Bio) en el sistema QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). El gen *ACT1* se utilizó como referencia, ya que se ha demostrado previamente su alta estabilidad de expresión en condiciones similares (Brink et al., 2016), mientras que *HXT2* se utilizó como gen diana. Las secuencias de los primers se presentan en la Tabla 1 de Apéndice I. Para cada muestra, se incluyó un control sin transcriptasa inversa (correspondiente a la extracción de ARN) para garantizar que la amplificación fuera específica del ADNc y no del ADN genómico residual. También se incluyó un control sin *template* o blanco (NTC). Las condiciones de ciclado para ambos genes fueron: desnaturalización inicial a 96 °C por 30 s; 40 ciclos de 96 °C por 5 s y 60 °C por 30 s; seguido de análisis de curva de fusión iniciando a 60 °C por 20 s, aumentando a 95 °C a 0,15 °C/s y manteniendo 95 °C por 1 s.

El procesamiento de datos, que incluyó la determinación de valores Cq y el análisis de curvas de fusión, se llevó a cabo con el software Design & Analysis 2 (DA2), versión 2.8.0 (Thermo Fisher Scientific). Las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos se determinaron mediante curvas estándar. Los cambios relativos en la expresión génica y el análisis estadístico se realizaron con el paquete R “rtqpcr”, concretamente con la función qpcrANOVARE, que incorpora corrección por eficiencia y permite realizar el análisis multifactorial ANOVA para datos de qPCR (Ganger et al., 2017). Cada condición se analizó por triplicado biológico, con réplicas técnicas para controlar la variabilidad experimental.

3.2.9 Fusión a la GFP

Con el fin de analizar la localización subcelular de transportadores y construcciones quiméricas, la GFP se fusionó al extremo C-terminal de *GAL2mut* y de *Gal2mut-ST* mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae*, utilizando fragmentos amplificados por PCR con solapamientos homólogos. El ORF de *yEGFP* se amplificó a partir del plásmido YIpGFP (Brink et al., 2016) utilizando primers que contenían 50 pb de homología con el extremo 3' de la cola de *SNF3* (para el receptor quimérico) o con el extremo 3' del transportador *GAL2mut*. Para permitir el ensamblado, los fragmentos

homólogos resultantes se co-transformaron junto con el plásmido multicopia pRS42N, anteriormente linealizado con HindIII/EcoRI, en la cepa *S. cerevisiae* TMB3711. Tras la selección con ClonNAT, los plásmidos se extrajeron de la levadura utilizando el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research) y posteriormente se propagaron en *E. coli* DH5 α para amplificación y almacenamiento. El correcto ensamblado de las construcciones se confirmó mediante secuenciación completa de los plásmidos (Eurofins Genomics). Los vectores resultantes, denominados pBB07 y pBB08, expresan la construcción quimérica-GFP y el transportador *GAL2mut-GFP*, respectivamente, bajo el control del promotor *SNF3*.

Con el fin de incrementar las señales fluorescentes, se reemplazó el promotor *SNF3* por el promotor constitutivo fuerte *TDH3*. Para ello, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1600 pb de *TDH3p-GAL2* a partir del plásmido YIplac128 utilizando los primers *GAL2_BglIII_Rv* y *TDH3p_Sall_Fw*, el cual se digirió posteriormente con las enzimas BglIII y Sall. El inserto se purificó y se clonó en los plásmidos pBB07 y pBB08, previamente digeridos con las mismas enzimas. Tras la ligación y transformación en células competentes de *E. coli*, los plásmidos se recuperaron y se verificaron mediante PCR de colonias y secuenciación completa. Los constructos finales, denominados pBB09 y pBB10 (Tabla 2), se transformaron en *S. cerevisiae* TMB3711, lo que dio lugar a las cepas TMBB31 y TMBB32, respectivamente.

3.2.10 Análisis por microscopía de fluorescencia

Para el análisis por microscopía de fluorescencia, las cepas de *S. cerevisiae* TMBB31 y TMBB32, que expresan los constructos fusionados a GFP, se cultivaron *overnight* en 5 mL de medio YNB suplementado con 20 g/L de glucosa y 100 μ g/ mL de ClonNAT. La cepa sin GFP se incluyó como control de autofluorescencia. Posteriormente, las células se lavaron y se preparó un inóculo, el cual se transfirió a un medio fresco YNB de baja fluorescencia conteniendo 50 g/L de xilosa o 20 g/L de glucosa a una DO_{620nm} inicial entre 1,5 y 2. Los cultivos celulares se incubaron a 30 °C con agitación constante a 180 rpm durante 5 h. La fluorescencia de GFP se detectó utilizando un microscopio confocal Leica SP8 DLS. Las imágenes se adquirieron en canales separados para contraste de fase y fluorescencia, y se analizaron con el software Fiji.

3.2.11 Caracterización fisiológica de cepas recombinantes

Las cepas de *S. cerevisiae* que metabolizan la xilosa (TMB3753, TMBB28 y TMBB34) fueron cultivadas a 30 °C en 25 mL de medio YNB suplementado con 50 g/L de xilosa en frascos Erlenmeyer de 250 mL de tipo *baffled* agitados continuamente a 180 rpm. Se

tomaron muestras de duplicados biológicos independientes en diferentes intervalos de tiempo para medir la biomasa y cuantificar la cantidad de xilosa consumida y de metabolitos acumulados. La densidad óptica se determinó mediante espectrofotometría a 620 nm y, al final de los ensayos, se determinó el peso seco por triplicado usando filtros de 0,4 μm . La xilosa, el xilitol, el glicerol, el acetato y el etanol se cuantificaron mediante HPLC usando la columna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) y el detector de índice de refracción (IR). La corrida se realizó de forma isocrática a un flujo de 0,6 mL/min utilizando una fase móvil de 5 mM de H_2SO_4 a 60 °C.

4. Resultados

4.1 Efecto de la xilosa en la señalización por Snf3p/Rgt2p

Como se mencionó anteriormente, los receptores Snf3p y Rgt2p detectan distintos niveles de glucosa. En este capítulo se evalúa su posible participación en el reconocimiento de sustratos alternativos, específicamente la xilosa. Para este análisis, se evaluaron por citometría de flujo distintas cepas portadoras de los biosensores *HXT1p*-GFP (vía Rgt2p) y *HXT2p*-GFP (vía Snf3p), que incluyen también las modificaciones genéticas de estos receptores.

4.1.1 La xilosa extracelular es percibida por el receptor Snf3p

Como se ha descrito en la introducción, el transportador *HXT2* se expresa cuando *S. cerevisiae* detecta niveles bajos de glucosa extracelular por medio del receptor Snf3p. Esto activa una cascada de señalización que culmina con la desrepresión y transcripción del transportador de mediana afinidad *HXT2* (Figura 6 de la Introducción). Curiosamente, estudios previos realizados por Brink et al. (2016) mostraron que la transcripción de *HXT2* también se produce en cultivos de *S. cerevisiae* en xilosa, cuando la glucosa no está presente en el medio. En ese contexto, los autores postularon que la causa de la activación se debía a señales derivadas de la internalización de la xilosa por transportadores no específicos, indicando mecanismos endógenos en lugar de exógenos para la señalización de la xilosa por esta ruta (Brink et al., 2016). Sin embargo, en el presente trabajo se planteó la posibilidad de que el sensor Snf3p pudiera ser capaz de detectar xilosa, considerando su promiscuidad previamente demostrada hacia azúcares hexosas (Dietvorst et al., 2010). Con el fin de explorar esta cuestión, se modularon los niveles de *SNF3* mediante su delección o sobreexpresión en cepas reporteras de *S. cerevisiae*. Se evaluó entonces si estas modificaciones alteraban la intensidad de la señal de *HXT2p* en presencia de xilosa. En estas condiciones, la inducción o represión del biosensor se cuantificó mediante citometría de flujo.

La delección de *SNF3* en cepas reporteras *HXT2p*-GFP con diferentes antecedentes genéticos—*wild-type* (TMB3713), con el transportador de xilosa Gal2p^{N376F} (TMB3723) y con la vía catabólica XR/XDH (TMB3753)—permitió discriminar entre señales mayoritariamente extracelulares, intracelulares y/o derivadas del metabolismo de la xilosa, respectivamente. La misma modificación de *SNF3* se realizó

en las cepas control de autofluorescencia—cepas isogénicas sin gen reportero—para descartar efectos sobre la morfología o el tamaño celular que pudieran influir en las señales fluorescentes (Figura 1 del Apéndice I). La inactivación del receptor no afectó significativamente la fluorescencia de fondo ni la distribución de las poblaciones (Figura 1 del Apéndice I).

Se analizó la respuesta de *HXT2p* en cepas con *SNF3* intacto y sus respectivas mutantes *snf3Δ* bajo tres condiciones: inducción con glucosa 1 g/L, xilosa 50 g/L y medio sin fuente de carbono. Los resultados obtenidos por citometría de flujo se presentan en la Figura 12, mientras que los valores de intensidad media de fluorescencia, el *fold change* relativo al tiempo inicial y las características de las subpoblaciones se resumen en las Tablas 2 y 3 del Apéndice I. Previo a medir las respuestas del biosensor en las condiciones mencionadas, se intentó reprimir su actividad en cultivos con 40 g/L de glucosa, para comenzar los ensayos con la menor fluorescencia posible. Este nivel basal se indica en los histogramas de la Figura 12 mediante las líneas de referencia correspondientes.

Tras añadir xilosa a las células *wild-type* reprimidas, aproximadamente el 30 % de la población mostró una inducción del biosensor cuando Snf3p estaba intacto, con un incremento de $3,4 \pm 0,9$ en la intensidad de fluorescencia respecto al estado inicial (Figura 12B; TMB3713), similar a lo reportado por Brink et al. (2016). Este nivel de inducción es comparable al observado en glucosa limitante (Figura 12A), respaldando la hipótesis de que Snf3p podría activarse en presencia de xilosa y desencadenar la inducción de *HXT2*. En baja glucosa (1g/L), la intensidad de fluorescencia se analizó considerando la población total, ya que la presencia de dos subpoblaciones minoritarias no afectó la interpretación (Figura 12A). En cambio, con xilosa, la inducción de *HXT2* se observó solo en una fracción de la población (Figura 12B; subpoblación derecha). Las mismas células cultivadas en medio sin azúcar añadido no generaron una inducción del biosensor (Figura 12C), lo cual indica que la activación previamente descrita depende de la disponibilidad de una fuente de carbono exógena, ya sea glucosa o xilosa, y no de una señal de Snf3p asociada a la carencia de sustrato.

Luego de la delección de *SNF3*, la fluorescencia de *HXT2p* en baja glucosa se redujo significativamente (Figura 12A; panel inferior), al igual que la subpoblación previamente inducida en xilosa (Figura 12B; panel inferior), lo que refuerza la hipótesis de que Snf3p juega un papel directo en el reconocimiento de la xilosa extracelular. El mismo efecto se observó al delecionar *SNF3* en la cepa que transporta eficientemente xilosa, donde la subpoblación de *HXT2p*-GFP solo se induce en presencia de xilosa cuando *SNF3* está intacto (Figura 12E). Esto sugiere que la señal exógena prevalece

sobre cualquier señalización endógena derivada del transporte de xilosa cuando las células no la metabolizan, contrario a la propuesta de Brink et al. (2016).

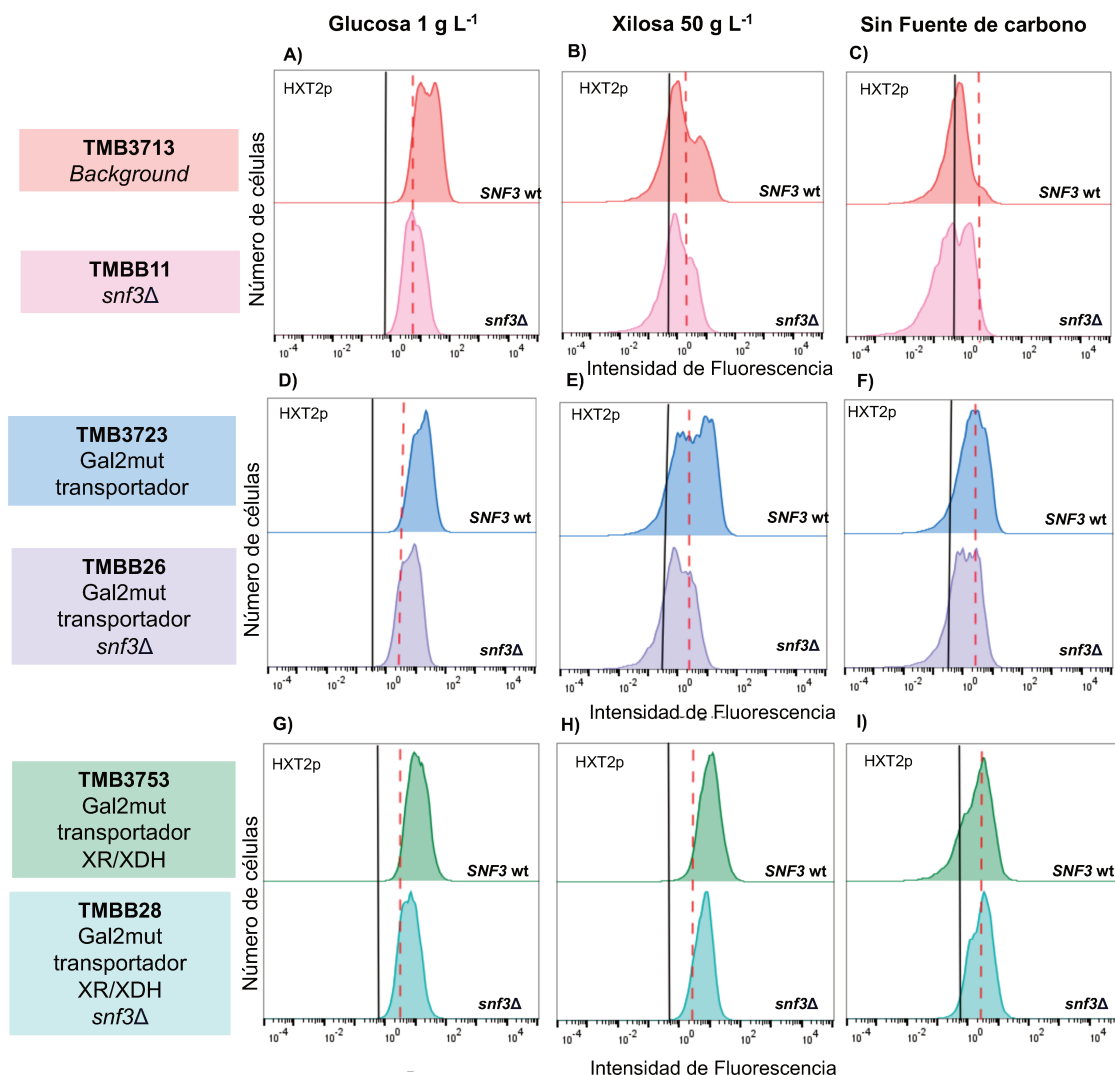


Figura 12. La expresión de *HXT2p*-GFP disminuye en presencia de alta xilosa y baja glucosa al inactivarse el receptor de membrana *Snf3p*. Se muestran los histogramas representativos del perfil de fluorescencia del biosensor *HXT2p* para las cepas TMB3713 (A-C), TMB3723 (D-F) y TMB3753 (G-I), junto con sus correspondientes mutantes del receptor, TMBB11, TMBB26 y TMBB28, respectivamente. La respuesta de la GFP se examinó en células proliferadas con 1 g/L de glucosa (la condición de inducción del biosensor), 50 g/L de xilosa y medio YNB solo (sin fuente de carbono) a las 6 h de cultivo. La línea roja punteada indica el estado de represión de la cepa TMB37X3 correspondiente a las 0 h para cada una de las condiciones. La autofluorescencia de la cepa control isogénica correspondiente, TMB37X1, se indica con la línea negra. Resultados adaptados de Bolzico et al. (2025).

En la cepa recombinante que incluye la ruta del catabolismo de la xilosa (TMB3753), la inducción de *HXT2p*-GFP en presencia de este azúcar fue homogénea en toda la población celular (Figura 12H), independientemente de la presencia de *SNF3*. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia disminuyó al deletar el receptor

(TMBB28), aunque el efecto fue más leve que en las cepas sin la vía catabólica XR/XDH. Estos resultados sugieren que la activación completa de *HXT2* depende en parte de la funcionalidad del receptor, pero que en condiciones donde la xilosa se metaboliza podrían generarse señales adicionales que contribuyen a su inducción.

Con el fin de descartar que la disminución de la señal se debiera a variaciones en la morfología celular o que ocurriese una inducción tardía de *HXT2p* tras la delección del receptor, se incluyeron dos controles: i) la normalización de todas las señales de fluorescencia respecto al tamaño de las células mediante el parámetro FSC-A (Tabla 3 del Apéndice I) y ii) el monitoreo de la fluorescencia del biosensor durante 10 horas en condiciones de xilosa y baja glucosa (Figura 13A y 13B). En la cepa mutante (TMBB11), la reducción de la señal normalizada se mantuvo constante a lo largo del tiempo en ambas condiciones de cultivo, sin inducción evidente (Figura 13B). Estas observaciones indican que el cambio en la fluorescencia del biosensor se debe a la pérdida de la señal mediada por Snf3p y no a diferencias en el tamaño celular ni a un retraso en la activación.

Para validar que la señal fluorescente del biosensor se corresponde con la regulación transcripcional nativa del gen *HXT2* en las distintas condiciones de azúcar, los niveles del ARNm endógeno se cuantificaron mediante RT-qPCR en la cepa salvaje con *SNF3* intacto (TMB3713). El gen *HXT2* se expresó en cultivos expuestos tanto a la xilosa como a la glucosa limitante (Figura 13C), lo cual concuerda con la inducción del biosensor observada en ambos azúcares. Los niveles de transcriptos de *HXT2* disminuyeron con el tiempo cuando la glucosa se usó como nutriente (Figura 13C), en línea con la señal transitoria de la GFP (Figura 13B, panel derecho). En cambio, durante el cultivo con xilosa, la expresión de *HXT2* aumentó progresivamente en el lapso de la medición. Estas observaciones sugieren que, para el caso de la glucosa, su catabolismo activo genera una adaptación rápida seguida de la regulación negativa de *HXT2* conforme se agota el azúcar. En contraste, la xilosa no es metabolizada activamente por esta cepa y su presencia extracelular continua probablemente mantiene activada la vía de señalización de Snf3p, promoviendo la transcripción sostenida de *HXT2*.

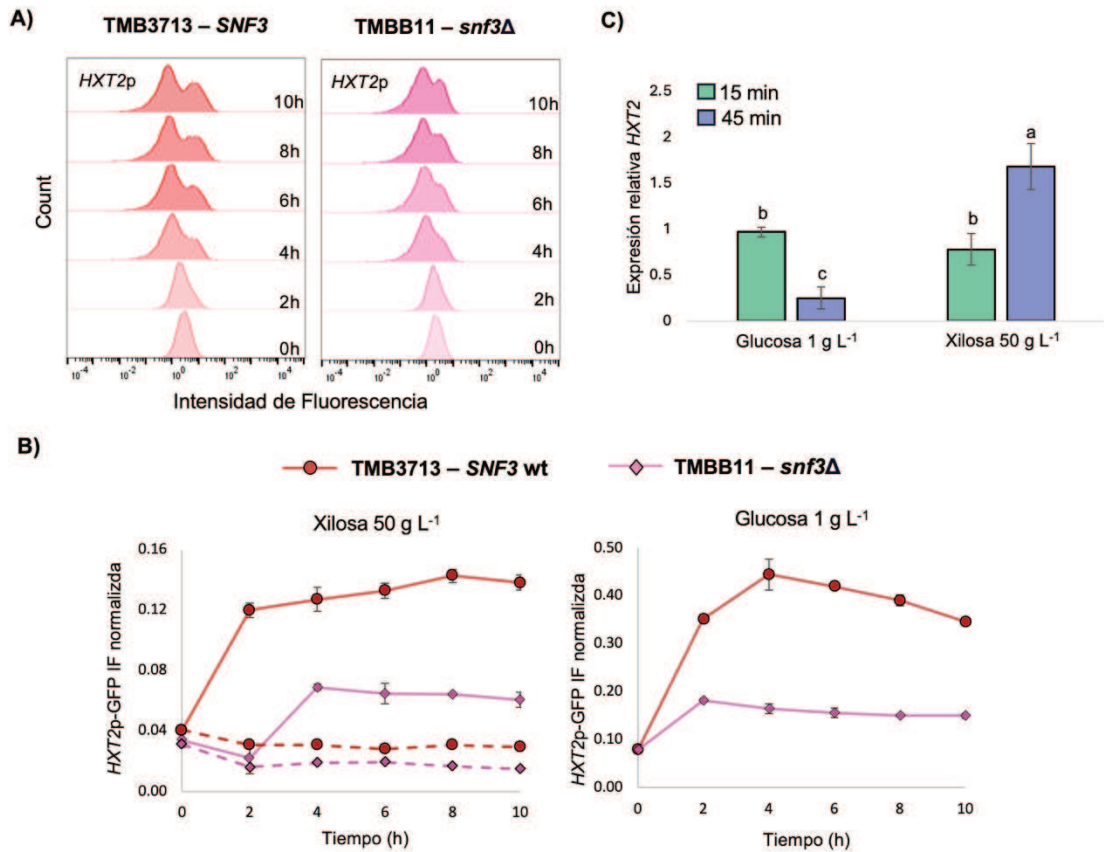


Figura 13. Cambios en la fluorescencia de *HXT2p*-GFP y en la expresión del gen *HXT2* a lo largo del tiempo en respuesta a alta xilosa y baja glucosa. A) Histogramas de fluorescencia para TMB3713 (*SNF3* wild-type) y TMBB11 (*SNF3* mutante), mostrando inicialmente poblaciones uniformes en xilosa, que posteriormente se vuelven heterogéneas. B) La inactivación de *SNF3* provoca una disminución de las señales de *HXT2p*-GFP. Se muestran los valores de intensidad de fluorescencia (IF) normalizados al tamaño celular de la población inducida (líneas sólidas) y de la población total (líneas punteadas) a lo largo del tiempo. Las cepas se cultivaron en medio YNB suplementado con xilosa 50 g/L o glucosa 1 g/L, y se tomaron muestras para citometría de flujo en distintos puntos temporales. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes. C) *HXT2* se expresa en condiciones de baja glucosa y alta xilosa en la cepa TMB3713. Los resultados se basan en análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR. Las barras de error indican el error estándar de tres réplicas biológicas independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre condiciones, determinadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey (Tukey's HSD). Resultados adaptados de Bolzico et al. (2025)

Por último, se sobreexpresó *SNF3* en cepas con y sin habilidad de metabolizar xilosa para analizar si este azúcar incrementaba la señal del biosensor, causando un fenotipo opuesto al de la delección. Dicha modificación se realizó mediante la integración genómica de una copia del casete génico que dirige la expresión de *SNF3* bajo un promotor fuerte y constitutivo. La sobreexpresión del receptor aumentó la sensibilidad general del sistema, incrementando la señal de *HXT2p* en todas las condiciones y causando una activación constitutiva en ausencia de ligando (Figura 14; condición sin fuente de carbono). La mayor inducción de *HXT2p* se observó en glucosa, lo cual es consistente con su rol como ligando principal de Snf3p (Figura 14A).

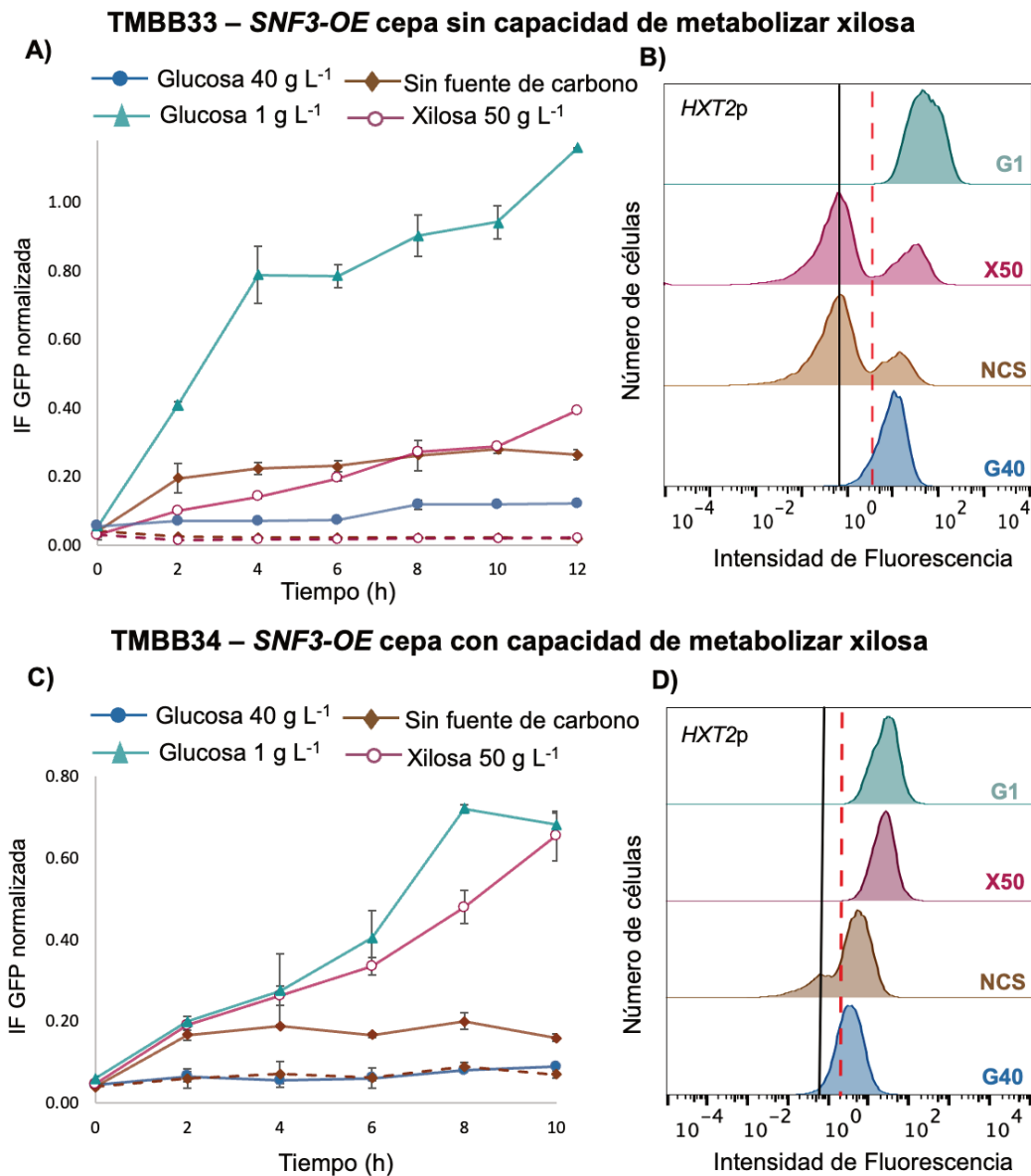


Figura 14. La sobreexpresión de *SNF3* (*SNF3-OE*) causa una señal constitutiva del biosensor *HXT2p* que se amplifica en baja glucosa y alta xilosa. El análisis por citometría de flujo se muestra para TMBB33 (TMB3713; *SNF3-OE*) en los paneles A y B y para TMBB34 (TMB3753; *SNF3-OE*) en los paneles C y D. Los gráficos de línea muestran la intensidad de fluorescencia (IF) del biosensor normalizada respecto al tamaño celular en las distintas condiciones cultivo. Las líneas punteadas indican la IF de la poblacional total mientras que las línea sólidas la de la población inducida en presencia de heterogeneidad. Los histogramas representan la distribución de fluorescencia del biosensor a las 12 h (panel B) y a las 10 h (panel D). La línea negra representa autofluorescencia y la línea roja punteada señala la represión inicial del biosensor (0 h). G40: glucosa 40 g/L; G1: glucosa 1 g/L; X50: xilosa 50 g/L; NCS: sin fuente de carbono. Todos los experimentos se realizaron en duplicados independientes. Resultados adaptados de Bolzico et al. (2025).

En cambio, en xilosa, la señal también aumentó por encima del umbral constitutivo, aunque de manera menos pronunciada, presentando una inducción notable a las 12 h de iniciado el cultivo (Figura 14A; TMBB33). Esto indica que *Snf3p* puede

detectar xilosa, aunque con menor intensidad y de manera inespecífica, posiblemente debido a la analogía estructural entre la pentosa y la glucosa. Por otro lado, al combinar la utilización recombinante de la xilosa con la sobreexpresión de *SNF3*, se produjo la inducción máxima de *HXT2p*, alcanzando niveles comparables a los registrados con baja concentración de glucosa (Figura 14C; TMBB34). Estos resultados respaldan la hipótesis de que intermediarios del catabolismo de xilosa probablemente participen en la señalización intracelular, contribuyendo a la desrepresión completa de *HXT2p* en coordinación con la activación de *Snf3p*. El entrecruzamiento entre ambas vías de transducción de señales es analizado en mayor profundidad en la sección de Discusión.

4.1.2 La xilosa extracelular no induce señales a través de la vía Rgt2p

Con el fin de analizar el efecto de la xilosa en la ruta mediada por el receptor de baja afinidad, *Rgt2p*, la expresión del biosensor *HXT1p*-GFP se cuantificó en la cepa *RGT2* salvaje (TMB3712) y en su correspondiente mutante *rgt2Δ* (TMBB10), construida en el presente trabajo. El análisis se centró en las señales extracelulares, utilizando para ello dichas cepas que no poseen capacidad para metabolizar la xilosa. Esto se debe a que investigaciones previas demostraron que la adición del transportador de xilosa *Gal2p* mutado y la vía *XR/XDH* no modificó la señal del biosensor *HXT1p* (Osiro et al., 2018).

Al exponer las células previamente reprimidas a 40 g/L de glucosa, se observó un aumento significativo de la señal fluorescente (Figura 15; cepa TMB3712). Con concentraciones intermedias de glucosa (10 g/L), también se registró inducción del biosensor, aunque con una menor intensidad (Figura 15; cepa TMB3712). Al deletar el receptor de membrana (cepa TMBB10), la fluorescencia frente a glucosa elevada se redujo drásticamente, cerca de un 80%, confirmando que *Rgt2p* es el principal sensor responsable de la activación de *HXT1* en estas condiciones.

En xilosa, el biosensor *HXT1p* permaneció totalmente reprimido en ambas cepas (Figura 15), con niveles de fluorescencia similares a la autofluorescencia basal, a diferencia de la inducción de *HXT2p* mediada por *Snf3p*. Ante esta falta de respuesta, se optó por implementar un receptor quimérico xilosa-específico para redirigir la señalización; los resultados se describen en la sección siguiente.

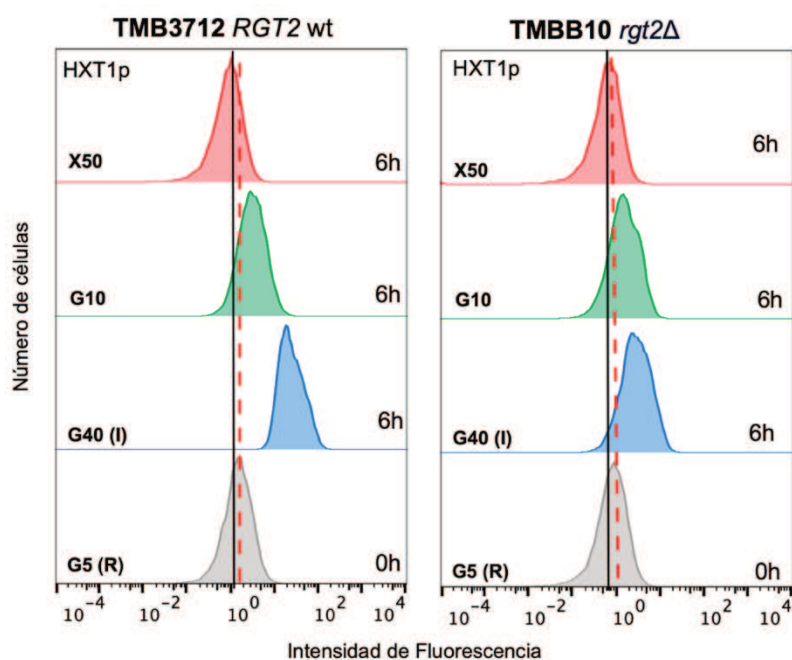


Figura 15. Perfiles de fluorescencia del biosensor *HXT1p*-GFP en cepa con la vía *Rgt2* activa (TMB3712; panel izquierdo) y en cepa mutante del receptor (TMBB10; panel derecho) tras la exposición a diferentes fuentes de carbono. La línea negra representa autofluorescencia y la línea roja punteada indica la represión inicial del biosensor (0 h). Condiciones: Inducción, G40 (glucosa 40 g/L); Represión, G5 (glucosa 5 g/L); X50 (xilosa 50 g/L); G10 (glucosa 10 g/L).

4.2 Ingeniería de la vía *Rgt2p*/*Snf3p*: receptores quiméricos

Como se expuso previamente, la señalización nativa de *S. cerevisiae* responde principalmente a la glucosa, mientras que la xilosa genera una señal débil en el caso del receptor *Snf3p* y nula en el caso de *Rgt2p*. Hasta donde se conoce, no se han reportado estrategias para redirigir la respuesta de estos receptores hacia un sustrato no convencional que carece de un sistema de reconocimiento de membrana propio.

En este trabajo se planteó la posibilidad de incluir receptores quiméricos para modificar la selectividad del sentido hacia la xilosa, lo que permitiría activar de manera controlada la expresión de transportadores putativos para su captación. Recientes trabajos señalan que un enfoque de ingeniería integrativo, basados en respuestas inducible por xilosa, resulta más efectivo para mejorar su utilización que las modificaciones constitutivas (Goinarayanan & Nair 2018b; Li et al., 2025). La estrategia de los receptores quiméricos permitió además profundizar acerca del papel estructural de los dominios responsables del reconocimiento de azúcares y de la transducción de señales. Se evaluó si los potenciales receptores quiméricos Gal2trunc-ST (derivado de

Snf3p) y Gal2trunc-RT (derivado de Rgt2p) podrían incrementar o generar, respectivamente, señales sensibles a la xilosa en *S. cerevisiae*.

4.2.1 Diseño y construcción

Los receptores híbridos propuestos combinaron un dominio de unión a xilosa procedente de un transportador con los dominios de señalización o colas citoplasmáticas de los receptores nativos. Este enfoque transportador-sensor demostró ser exitoso previamente en la detección de glucosa. Ozcan et al. (1988) y Kim et al. (2024b) acoplaron las colas citoplasmáticas de Snf3p y Rgt2p a los dominios transmembranas de los transportadores Hxt1p/2p, restableciéndose las señales de inducción cuando se deletaban los receptores nativos. En línea con esto, en este trabajo se seleccionó la proteína Gal2p para reemplazar el sitio de unión a glucosa ya que existe una variante mejorada con la mayor especificidad demostrada hacia la xilosa (Rojas et al., 2021a). Esta versión del transportador incorpora dos sustituciones aminoacídicas (N376Y y M435I) y es referida en este trabajo como Gal2mut. Además, Gal2p presenta un alta similitud de secuencia con los transportadores de hexosas previamente utilizados en las construcciones quiméricas mencionadas. Con el fin de atenuar el transporte de xilosa, se utilizó una variante truncada de Gal2mut en la que se eliminaron los aminoácidos desde la posición 531 hasta el final (Figura 16). Esta estrategia se basó en un estudio previo donde un truncamiento equivalente en Hxt1p permitió reducir la captación de azúcares (Scharff-Poulsen et al., 2018). La proteína Gal2mut truncada (residuos 1 a 530) se fusionó entonces a las colas citoplasmáticas de Rgt2p (aminoácidos 556 hasta el final) o de Snf3p (aminoácidos 553 hasta el final) (Figura 16).

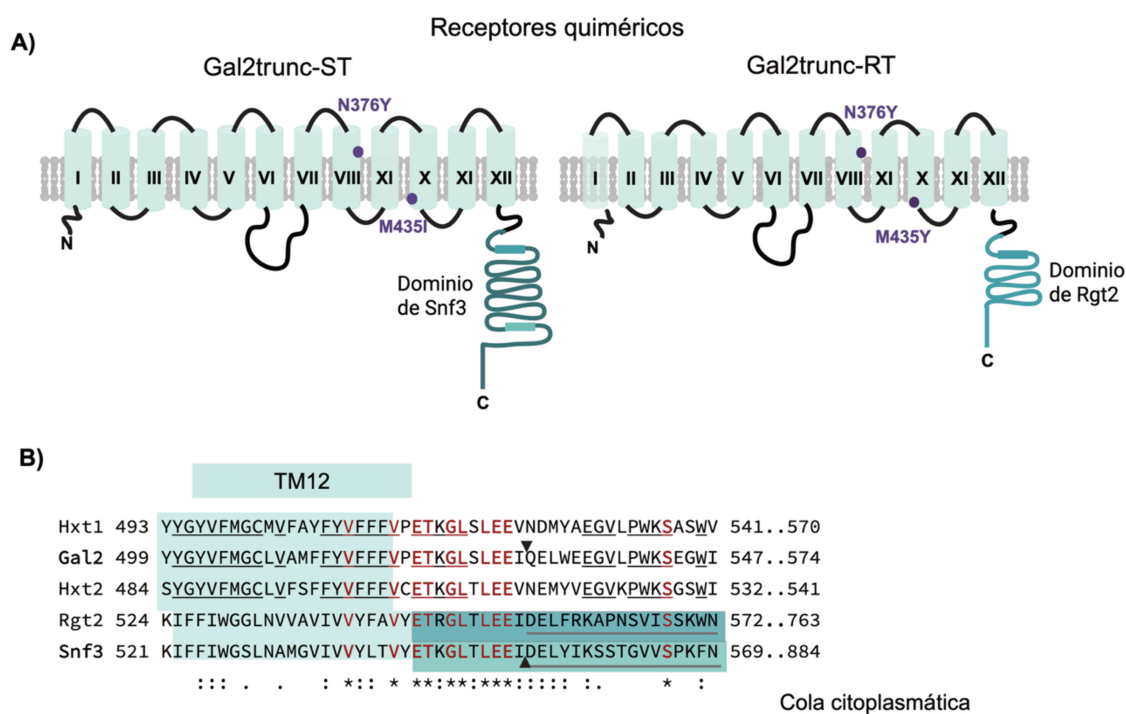


Figura 16. Estrategia basada en receptores quiméricos para la detección de xilosa. A) Representación esquemática de los receptores híbridos construidos en este trabajo. El modelo predicho del transportador incluye doce dominios transmembrana (cilindros verde claro, designados del I al XII). Las sustituciones N376Y y M435I en Gal2p (Gal2mut) confieren especificidad para xilosa (Rojas et al., 2021a). El transportador se truncó en el dominio C-terminal ($\Delta 531$; Gal2trunc) y se reemplazó por los dominios de señalización de Rgt2p y Snf3p (color cian). B) Alineamientos de secuencias (Clustal Omega) de transportadores de hexosas (Hxt1p, Hxt2p y Gal2p) y receptores (Snf3p y Rgt2p). En verde claro se resalta parte del último dominio transmembrana de las proteínas, y en cian se indican las regiones C-terminal de los receptores utilizadas en las construcciones. Los aminoácidos en rojo están conservados entre todas las proteínas, mientras que los subrayados se conservan únicamente entre los transportadores. Las flechas señalan los sitios de truncamiento del transportador y de fusión con las colas de los sensores.

Por último, la expresión de los genes quiméricos se reguló mediante los promotores nativos de *SNF3* y *RGT2*. Esta elección, en lugar de emplear promotores constitutivos, se basó en evidencia previa que mostró que la sobreexpresión de la quimera *HXT1-SNF3* provocaba una activación constitutiva de la vía, independientemente de los niveles de glucosa (Özcan et al., 1988), posiblemente debido a una sobrecarga de proteínas en la membrana.

4.2.2 Análisis funcional del receptor quimérico derivado de Snf3p

Las preguntas centrales del análisis de Gal2trunc-ST fueron: ¿puede este receptor quimérico potenciar la señal de inducción de *HXT2p* en xilosa? y, en ausencia del

receptor nativo, ¿puede restablecer la señal? Para abordarlas, la quimera se integró en la cepa reportera TMB3713 (originando TMBB06) y en un fondo carente de *SNF3* (originando TMBB09). El uso de cepas sin un catabolismo activo de la xilosa permitió evaluar con mayor objetividad la especificidad del sistema hacia la xilosa extracelular, evitando interferencias de señales derivadas de su metabolismo.

Como puede observarse en la Figura 17, la inclusión de la proteína quimérica incrementó ligeramente la señal de fluorescencia de *HXT2p*-GFP en xilosa (Figura 17E; pico de la derecha).

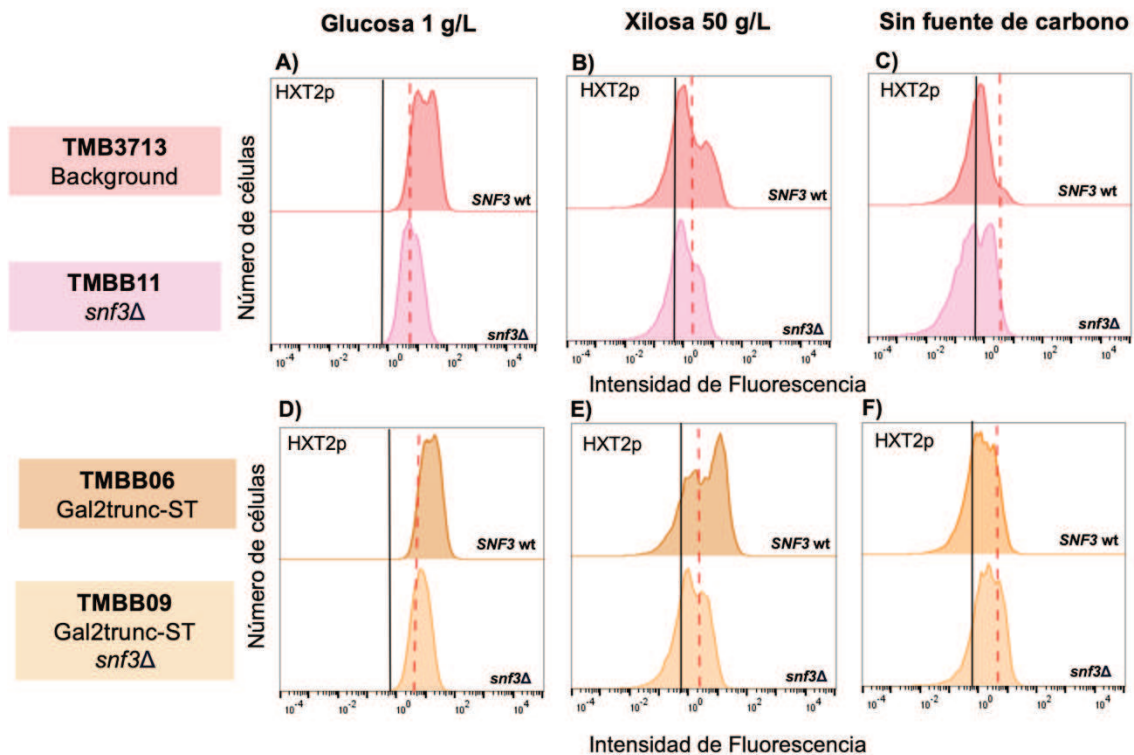


Figura 17. Efecto de la construcción quimérica derivada de Snf3p en la respuesta del biosensor *HXT2p*-GFP. Los histogramas comparan los perfiles de fluorescencia del biosensor de la cepa de referencia (A-C) con los perfiles obtenidos luego de expresar el receptor quimérico en las cepas *SNF3 wt* y *snf3Δ* (D-F). Las condiciones ensayadas fueron medio YNB suplementado con 1 g/L de xilosa (condición de inducción del biosensor), 50 g/L de xilosa y medio sin azúcar añadido. Los histogramas presentados son representativos de réplicas biológicas. Resultados adaptados de Bolzico et al. (2025).

Para esclarecer el origen preciso de la señal de inducción se incluyeron variantes estructurales como controles, todas expresadas bajo el promotor de *SNF3* en la misma cepa de fondo: i) el transportador Gal2mut completo (TMBB12); ii) la versión truncada de Gal2mut presente en la quimera, pero sin el dominio de señalización (Gal2trunc; TMBB13); y iii) una versión truncada total sin dominio C-terminal (TMBB19). El transportador sin un dominio C-terminal, como era de esperar, impide su localización en la membrana (Rojas et al., 2021b), por lo que la señal se mantuvo similar a la de la cepa

original (Figura 18). La respuesta de la quimera Gal2mut-ST fue similar a la registrada tanto para el transportador completo como para el truncado sin la cola de señalización (Figura 18A). En conjunto, estas observaciones insinúan que la quimera podría comportarse como un tranceptor, combinando captación de sustrato con señalización, más que como una proteína estrictamente receptora. La fusión con el dominio de Snf3p no pareciera magnificar la señal, aunque sí podría favorecer el tráfico o la estabilización en la membrana de Gal2p truncado en la construcción quimérica.

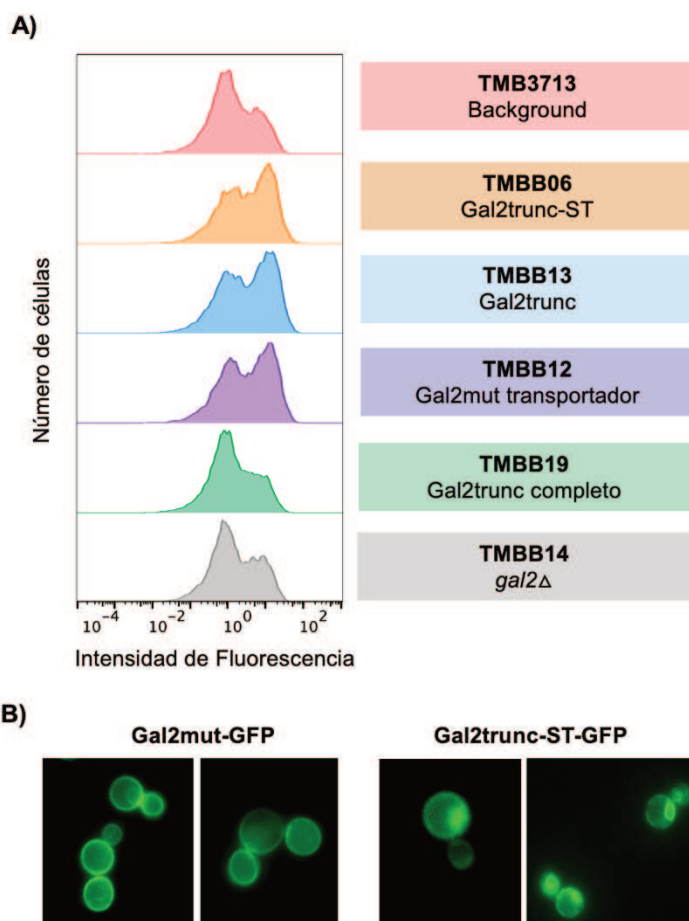


Figura 18. Perfiles de fluorescencia del biosensor *HXT2p*-GFP para Gal2pmut y sus variantes (A) y localización subcelular de Gal2pmut y de la quimera fusionadas a GFP (B). En A), las cepas se cultivaron en xilosa 50 g/L y correspondieron a: la quimera (TMBB06, Gal2pmut truncado fusionado a la cola de Snf3p), Gal2pmut truncado sin cola de Snf3p (TMBB13), Gal2pmut con el C-terminal totalmente eliminado (TMBB19) y el transportador Gal2pmut (TMBB12). Los experimentos se realizaron en duplicado biológico; se muestran histogramas representativos. En (B), la localización de Gal2pmut (panel izquierdo) y de la quimera (panel derecho) se visualizó mediante microscopía de fluorescencia con fusiones GFP en el extremo C-terminal. Resultados adaptados de Bolzico et al. (2025).

Luego se analizó la localización subcelular de la quimera y del transportador Gal2mut mediante fusiones a GFP y microscopía de fluorescencia (Figura 18B). El transportador Gal2mut se observó correctamente localizado en la membrana, mientras que Gal2mut-ST presentó una localización parcial, con señales fluorescentes

intracelulares sugerentes de mislocalización o degradación. La razón por la cual ambas construcciones generan señales de inducción de *HXT2p* similares, pese a que la quimera muestra menor estabilidad en la membrana, no pudo ser elucidada.

Paralelamente, se deletó el gen del transportador *GAL2* nativo (cepa TMBB14), pero esta disminución en el transporte no causó ningún efecto detectable sobre la señal de *HXT2p* (Figura 18A). En ensayos futuros, el uso de cepas de *S. cerevisiae* carentes de transportadores de hexosas (denominadas *hxt-null*) podría ayudar a resolver si efectivamente las construcciones quiméricas o su componente truncado conservan capacidad de transporte.

En lugar de centrarse en los incrementos de señal, se evaluó si la quimera por sí sola podía restablecer la inducción de *HXT2p*-GFP en ausencia de Snf3p. Sin embargo, la incorporación de Gal2trunc-ST no recuperó la señal en xilosa (Figura 17E; panel inferior), lo que sugiere que carece de capacidad para transducir la señal de manera independiente.

Ante la falta de respuesta, se introdujeron dos sustituciones puntuales en el dominio transmembrana de Gal2mut, reemplazando los residuos originales por los conservados en los receptores (F377V y S379F). Se evaluó si estas modificaciones mejoraban la función de señalización de la quimera en xilosa (variante Gal2mut2-ST), pero no se detectó un incremento en la señal de *HXT2p*-GFP (Figura 19). Por el contrario, la intensidad de fluorescencia fue incluso menor que la de la quimera original (Figura 19). Esto indica que dichos residuos, de manera individual, no son determinantes para conferir habilidad receptora. Es más probable que la función de detección de azúcares dependa de la interacción conjunta de múltiples residuos y de una conformación estructural específica, lo que debería contemplarse en estudios futuros.

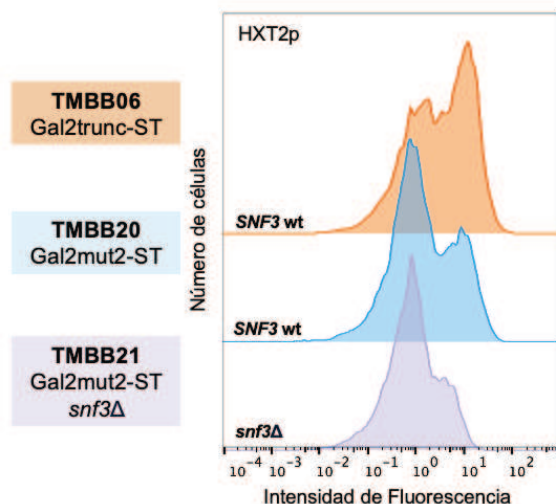


Figura 19. Respuestas del biosensor *HXT2p*-GFP en xilosa al incorporar una variante mutante de la quimera Gal2trunc-ST.

4.2.3 Análisis funcional del receptor quimérico derivado de Rgt2p

La funcionalidad de la quimera basada en Rgt2p, denominada Gal2trunc-RT, se determinó midiendo la actividad del biosensor *HXT1p*-GFP en las cepas TMBB05 (TMB3712; Gal2trunc-RT) y TMBB08 (Gal2trunc-RT; *rgt2Δ*). Con la quimera y el receptor nativo presentes, la inducción completa del biosensor *HXT1p*-GFP se observó en presencia de alta glucosa, como era esperado, y también en xilosa, aunque únicamente cuando la glucosa estaba presente en el medio (Figura 20A y 20B). Esto tiene sentido ya que la desrepresión de *HXT1* requiere no solo del receptor Rgt2p, sino también de la actividad de la PKA inducida por la glucosa, la cual fosforila a Rgt1p promoviendo su estado activador (Figura 6 de la sección Introducción). Sin embargo, al sustituir la xilosa por cantidades equimolares de sal (control glucosa + NaCl; Figura 20B), se reprodujo el mismo patrón de inducción de *HXT1p*. Este efecto sugiere la participación de una vía alternativa que influye en la actividad de *HXT1*, indicando que se trata muy probablemente de la ruta HOG de respuesta a alta osmolaridad (Brink et al., 2021).

Finalmente, no fue posible demostrar un reconocimiento específico de Gal2trunc-RT hacia la xilosa, ya que su incorporación en la cepa que carece de *RGT2* no restauró la señal en xilosa con glucosa (Figura 20A), lo que sugiere ausencia de reconocimiento extracelular capaz de desencadenar la señalización.

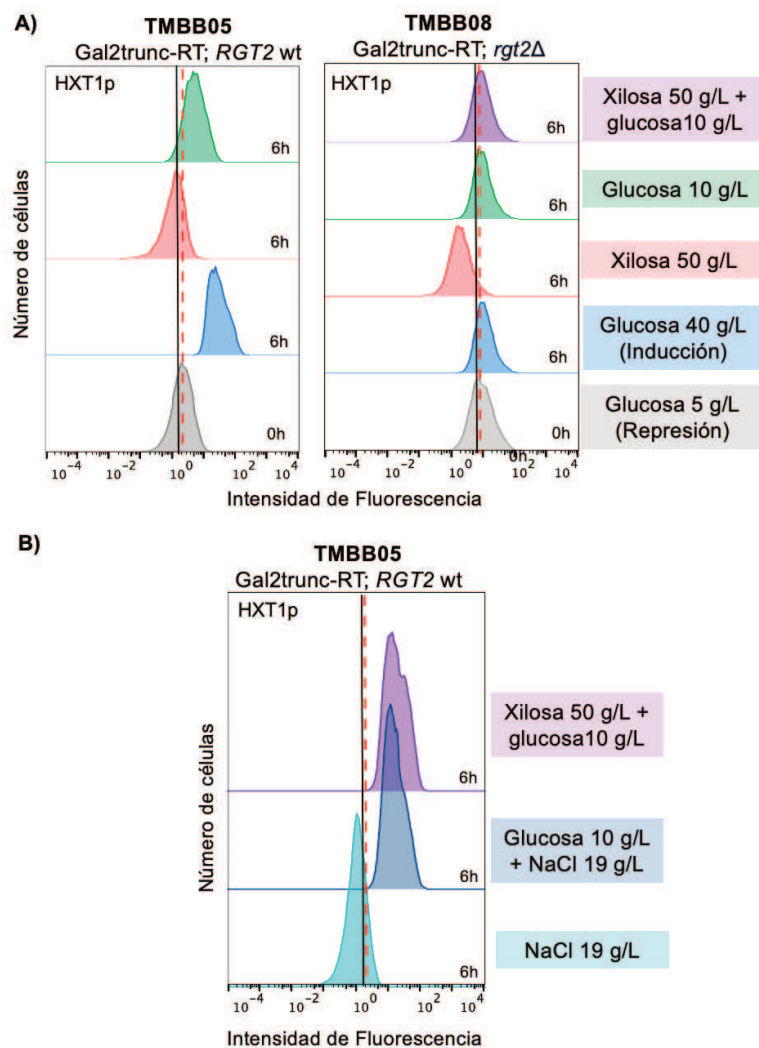


Figura 20. Resultados de las respuesta del biosensor *HXT1p* al incorporar la proteína quimérica Gal2trunc-RT en cepas con *RGT2* wild-type (TMBB05) y *rgt2* mutante (TMBB08).

4.3 Impacto metabólico de la detección de xilosa por *Snf3p*

Habiendo demostrado que la xilosa puede ser detectada a nivel extracelular por el receptor *Snf3p* (sección 4.1.1), el siguiente paso fue evaluar si este mecanismo de reconocimiento tenía un impacto a nivel fisiológico y/o metabólico en células recombinantes de *S. cerevisiae* cultivadas en xilosa.

Se hipotetizó que la activación de esta vía podría tener efectos beneficiosos, como un aumento en la captación de xilosa a través de la inducción de transportadores *HXT*. Contrariamente, podría también causar efectos negativos asociados a un incremento en el costo del mantenimiento celular. Con el fin de explorar estos aspectos, se evaluaron las cepas con *SNF3* salvaje (TMB3753), sin *SNF3* (TMBB28; *snf3Δ*) y con

sobreexpresión del receptor (TMBB34; *SNF3-OE*) en cultivos con 50 g/L de xilosa, cuantificando el crecimiento celular y la acumulación de subproductos metabólicos (Figura 21; Tabla 4).

La sobreexpresión del sensor resultó en una disminución de la biomasa final acumulada (en términos de peso seco), en un menor consumo de xilosa y en un aumento significativo en la producción de acetato (Figura 21; cepa TMBB34). Este comportamiento podría estar relacionado con un costo metabólico adicional derivado del mantenimiento continuo de la vía activa, lo que reduciría la energía disponible para la síntesis de biomasa y el transporte del azúcar. La delección del sensor produjo un fenotipo opuesto, con mayor producción de biomasa acompañada con un leve incremento en la velocidad específica de crecimiento (Figura 21 y Tabla 4; cepa TMBB28). La manifestación metabólica más evidente de la inactivación del receptor fue la reducción en más del 50 % del rendimiento final de acetato (Figura 21 y Tabla 4; cepa TMBB28).

En conjunto, estos datos indican que la activación constitutiva de Snf3p ocasiona un costo para la célula, mientras que su ausencia lo reduce. Por otro lado, la tasa de consumo de xilosa resultó comparable tanto en presencia de Snf3p en niveles normales (cepa salvaje; TMB3753) como en ausencia del sensor (TMBB28). En la sección 4.1.1 se demostró que Snf3p induce *HXT2*, sin embargo, esto no pareció contribuir considerablemente a la utilización del azúcar, probablemente porque el transportador Hxt2p es de baja capacidad y no facilita la internalización de altas concentraciones de xilosa. Además, todas las cepas utilizadas expresaban constitutivamente la proteína *Gal2p^{N376F}*, la cual probablemente domine el transporte de xilosa al interior celular en estas condiciones, opacando una posible actividad de Hxt2p.

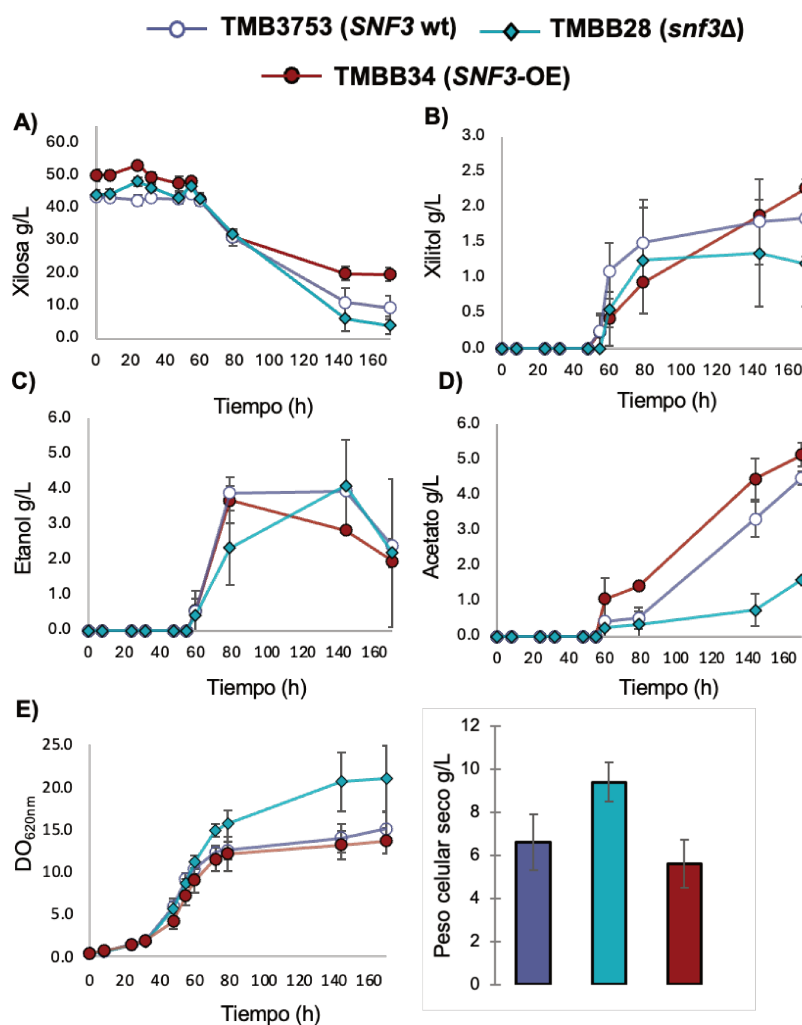


Figura 21. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de metabolitos para las cepas con modificaciones en el receptor *SNF3*. Los ensayos se realizaron en medio YNB suplementado con 50 g/L de xilosa en frascos agitados. Los datos muestran el promedio y la desviación estándar de duplicados independientes. Resultados adaptados de Bolzico et al. (2025).

Tabla 4. Parámetros del desempeño en xilosa de las cepas de *S. cerevisiae* con modificaciones las siguientes modificaciones en *SNF3*: TMB3753 (wild-type), TMBB28 (*snf3Δ*) y TMBB34 (sobreexpresión de *SNF3*).

Parámetro	TMB3753	TMBB28	TMBB34
Consumo xilosa (%)	78,1 ±8,3	90,3 ±6,0	60,6 ±5,7
Rendimiento xilitol (g _{xilitol} /g _{xilosa})	0,056 ±0,010	0,035 ±0,025	0,085 ±0,018
Rendimiento etanol (g _{etanol} /g _{xilosa})	0,125 ±0,018	0,110 ±0,040	0,196 ±0,038
Rendimiento acetato (g _{acetato} /g _{xilosa})	0,135 ±0,020	0,040 ±0,002	0,173 ±0,033
Velocidad específica de crecimiento μ_{max} (h ⁻¹)	0,049 ±0,001	0,054 ±0,001	0,043 ±0,003

5. Discusión

5.1 Señales de la xilosa en *S. cerevisiae*

Mediante estrategias clásicas de ingeniería del metabolismo—incluyendo la sobreexpresión y, en ocasiones, la eliminación de genes de enzimas clave de las rutas—se ha logrado que *S. cerevisiae* fermente la xilosa. Pero estos cambios en el estado metabólico parecen estar desalineados con los mecanismos regulatorios, de modo que las señales no se coordinan el proceso fermentativo. Comprender dichos mecanismos permitirían identificar nuevas dianas o proteínas reguladoras que podrían facilitar una respuesta fermentativa controlada y más eficiente hacia la xilosa (Gopinarayanan & Nair, 2018a; Osiro et al., 2019; Brink et al., 2021).

En este trabajo se demostró que la xilosa induce la expresión del transportador *HXT2* a través de señales desencadenadas por el receptor de membrana Snf3p. Estos hallazgos se evidenciaron mediante el uso del biosensor fluorescente basado en la transcripción *HXT2p*-GFP, el cual fue integrado en cepas con metabolismo activo o parcial de xilosa, que presentaban delección o sobreexpresión de *SNF3*.

El hecho de que Snf3p detecte xilosa demuestra que este receptor no es estrictamente específico para glucosa, sino que presenta un cierto grado de promiscuidad en el reconocimiento de azúcares. En efecto, se ha reportado anteriormente que Snf3p participó en la detección de otras hexosas distintas a la glucosa, como la fructosa, manosa y algunos análogos estructurales (Dietvorst et al., 2010; Jouandot et al., 2011). No obstante, este no fue el caso para la xilosa y la celobiosa (Dietvorst et al., 2010; Jouandot et al., 2011). Cabe destacar que en dichos trabajos la actividad de Snf3p se evaluó a través de la degradación del co-represor Mth1p, el cual actúa corriente abajo en la cascada de señalización. Esta aproximación podría no ser lo suficientemente sensible para detectar los efectos de azúcares que inducen con menor intensidad, como el caso de la xilosa.

Por otro lado, Wu et al. (2020) reportaron la inducción de *HXT2* en xilosa al medir su expresión por RT-qPCR y sugirieron a Snf3p como el causante de esta respuesta, lo cual fue confirmado en este estudio, pero abordado desde un contexto genético y experimental más amplio. Los resultados de este trabajo (Bolzico et al., 2025), se obtuvieron al analizar cepas de *S. cerevisiae* W303, tanto salvaje como mejoradas para la utilización de xilosa, permitiendo una evaluación más exhaustiva del sensado de este azúcar y de la inducción de *HXT2*. En cambio, Wu et al. (2020) analizaron únicamente la respuesta en la cepa CEN-PK113-5D, que no metaboliza xilosa y presenta

mutaciones en la vía de señalización de la PKA. Debido a la interconexión entre esta ruta y la vía Rgt2p/Snf3p, dicha cepa no sería la más adecuada para una evaluación precisa de los mecanismos de señalización (Brink et al., 2021). Además, los resultados reportados por estos autores dependieron de la adición de una fuente de carbono suplementaria, lo que podría inducir respuestas compensatorias y no reflejar aisladamente la señal generada por la xilosa.

El uso de biosensores fluorescentes combinado con citometría de flujo permitió analizar la respuesta a nivel de célula única en cantidades de 20.000 células por muestra y resolver poblaciones heterogéneas, específicamente en cepas carentes del metabolismo de xilosa. En estas cepas, la subpoblación inducida correspondió a células que activaron la expresión de *HXT2p*-GFP, aunque con una intensidad menor que en glucosa, lo que refleja una señalización del receptor Snf3p más débil, de menor afinidad o incompleta. Al eliminar o sobreexpresar *SNF3*, la señal en xilosa se redujo o se incrementó, respectivamente, demostrando que la expresión de *HXT2p* depende directamente de la cantidad de sensor disponible. En cambio, la subpoblación reprimida no mostró fluorescencia incluso ante una activación constitutiva de *SNF3*. Esta observación sugiere que este grupo de células carecían de componentes necesarios para sostener la transcripción, traducción del biosensor y la actividad de la GFP. Finalmente, al contar con el metabolismo activo de xilosa, la población celular se volvió homogéneamente inducida.

La adición de la vía XR/XDH potenció la respuesta de *HXT2p* frente a las cepas incapaces de metabolizar la pentosa. Sumado al reconocimiento extracelular por Snf3p, los resultados presentados sugieren que la actividad metabólica de la xilosa contribuye a la inducción completa de *HXT2*, probablemente mediante intermediarios que actúan como señales intracelulares en vías conectadas. A través del análisis de biosensores dependientes de las rutas SNF1/Mig1p y de la PKA, se determinó que la xilosa induce en las mismas cepas recombinantes un efecto semejante al de la glucosa limitante (Osiro et al., 2018). Brevemente, los biosensores basados de dichas vías, *SUC2* y *TPS1*, fueron inducidos durante el metabolismo de la xilosa, indicando activación del complejo SNF1 y una actividad reducida de la PKA, respectivamente (Osiro et al., 2018). En base a esto, el mecanismo de desrepresión de *HXT2* que ocurre en xilosa podría proponerse de la siguiente manera (Figura 22). Como se mencionó anteriormente, en ausencia de sustrato, el factor de transcripción Rgt1p se une a la región promotora de *HXT2* formando un complejo represor junto con Cyc8p, Tup1p y Mth1p/Std1p, inhibiendo su transcripción (Özcan & Johnston, 1995; Kim et al., 2003; Polish et al., 2005; Roy et al., 2013). En presencia de señal y detección de xilosa por el receptor Snf3p, este efecto represor se contrarrestaría al degradarse Mth1p/Std1p, exponiendo a Rgt1p a la

fosforilación (Figura 22). Paralelamente, la actividad del complejo SNF1 aumenta cuando la glucosa es escasa (Hedbacker & Carlson, 2008) o cuando la xilosa es metabolizada (Osiro et al., 2018; Persson et al., 2023). En estas circunstancias, Rgt1p sería susceptible a la fosforilación directa o indirecta por SNF1 (demostrado para glucosa en Palomino et al., 2006), lo que conduciría a la liberación de los co-represores Cyc8p y Tup1p y a impulsar la transcripción de *HXT2* (Figura 22).

Sin embargo, restan todavía muchos aspectos por profundizar acerca de los mecanismos precisos de señalización subyacentes a la xilosa. Un estudio reciente sugiere que intermediarios de la glicólisis, particularmente la presencia de F6P (fructosa-6-fosfato), participarían como metabolitos reguladores en las respuestas intracelulares de transducción de señales desencadenadas por el azúcar pentosa (Borgström et al., 2022).

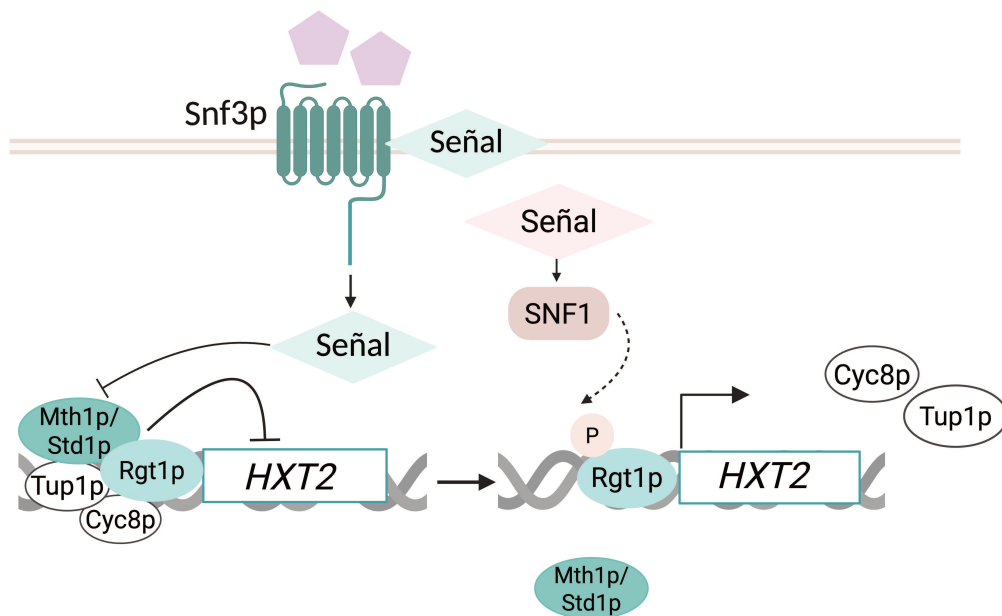


Figura 22. Mecanismo propuesto para la desrepresión completa de *HXT2* en células de *S. cerevisiae* que metabolizan xilosa. La xilosa podría integrar señales extracelulares (derivadas del reconocimiento por Snf3p, color verde) e intracelulares inducidas por su catabolismo (activación de SNF1; color rosa) a través del factor de transcripción Rgt1p, revelando un potencial mecanismo de cooperación entre ambas rutas. La línea punteada indica posible activación, mientras que las líneas con terminación en T indican represión.

Evidencias adicionales respaldan el rol de Snf3p como principal sensor de xilosa. Por un lado, se tienen los análisis transcriptómicos que confirman la expresión de *HXT2* y *SNF3* en cultivos de *S. cerevisiae* con xilosa (Jin et al., 2004; Matsushika et al., 2014; Zeng et al., 2016; Wu et al., 2020; Bolzico et al., 2025) y, por otro, la observación de que Snf3p no se degrada en presencia de fuentes de carbono no fermentables (Kim et al., 2024b). Contrariamente, el sensor Rgt2p es internalizado en ausencia de glucosa, a pesar de que su gen se expresa constitutivamente (Kim et al., 2021; Kim et al., 2024b).

En este trabajo de tesis, el efecto de la xilosa sobre la vía Rgt2p se analizó adicionando glucosa al medio, con el fin de evitar la degradación del receptor y activar la enzima PKA, evento necesario para inducir la expresión del gen diana *HXT1*. Bajo estas condiciones (glucosa y xilosa juntas) si se observó actividad fluorescente del biosensor. No obstante, esta respuesta no pudo ser atribuida a una detección simultánea de los dos azúcares por Rgt2p, sino más bien a una activación de *HXT1p* por alta osmolaridad. Esto se comprobó al obtener perfiles similares de inducción cuando se reemplazó la xilosa del medio por sal. Este comportamiento puede explicarse porque la vía Hog1/MAPK se activa en *S. cerevisiae* en condiciones de estrés osmótico, fosforilando al represor Sko1p y permitiendo la transcripción de *HXT1* (Tomás-Cobos et al., 2004; Brink et al., 2021).

En contraposición a lo hipotetizado al inicio de este trabajo, la activación de la vía mediada por Snf3p no condujo a una mejora significativa en la utilización de xilosa. La presencia de Gal2p mutante como principal transportador de xilosa en las cepas ensayadas podría enmascarar posibles beneficios asociados a la expresión de transportadores promiscuos inducidos por el receptor. Sumado a esto, la señal que transmite Snf3p ante la xilosa podría no estar acoplada de manera eficiente al metabolismo de la pentosa. En consecuencia, la delección del receptor se asoció con un aumento en la formación de biomasa y una reducción en la acumulación de subproductos, principalmente en los niveles de acetato. Los rendimientos en etanol no fueron significativamente diferentes entre la cepas salvaje y con delección del sensor. Por lo tanto, la modulación del receptor como enfoque de ingeniería para optimizar la fermentación de la xilosa debería confirmarse mediante ensayos adicionales en condiciones anaeróbicas. Además, para evaluar con mayor precisión la relación entre la activación de Snf3p y la inducción de transportadores nativos *HXT2/4* que captan xilosa (Hamacher et al., 2002; Sedlak & Ho 2004; Gonçalves et al., 2014), sería conveniente utilizar cepas con un fondo genético carente de transportadores específicos o heterólogos.

Hasta el momento, la importancia fisiológica de la detección de xilosa por el receptor Snf3p sigue siendo incierta, sobre todo en cepas salvajes que no metabolizan este azúcar. En el caso de la glucosa, la señalización por Snf3p/Rgt2p a nivel de membrana celular constituye un evento clave que asegura la expresión controlada de los transportadores adecuados para su captación, determinando finalmente las tasas de crecimiento celular de *S. cerevisiae* (Dickinson & Schweizer, 2004; Youk & Oudenaarden, 2009; Choi et al., 2014). Sin embargo, ¿cómo se traslada este mecanismo a la xilosa, un azúcar que la levadura no utiliza de forma natural? La alta similitud entre el sensor Snf3p y las proteínas Hxtp de la misma familia sugiere que la

detección de xilosa podría derivar de cierta flexibilidad en el reconocimiento de sustratos, coherente con la promiscuidad característica de estos transportadores. Además, existen indicios de que algunas cepas de *S. cerevisiae* pueden adaptarse evolutivamente y crecer en xilosa sin necesidad de intervenciones de ingeniería metabólica (Attfield & Bell, 2006). Esto sugiere que los componentes genéticos requeridos para la asimilación de esta pentosa están presentes en ciertos genotipos. En estas cepas, el sensado y transporte de xilosa podrían representar un remanente evolutivo, incluso si la fermentación de la xilosa no forma parte del repertorio metabólico natural de la especie.

5.2 Una respuesta diferenciada hacia la xilosa

La ingeniería de vías de señalización, en particular aquellas que generan una mayor actividad de la ruta de la PKA, que conduce a un incremento en el flujo glicolítico, ha demostrado mejorar la fermentación de xilosa en *S. cerevisiae* (Osiro et al., 2018; Wagner et al., 2019). Sin embargo, este beneficio suele acompañarse de una reducción en la capacidad de crecimiento, limitando su aplicación en bioprocesos (Osiro et al., 2018; Wagner et al., 2019). Igualmente, se destaca la importancia de la ingeniería de eventos regulatorios como estrategia complementaria a la ingeniería metabólica propiamente dicha, con la intención de imitar un estado de percepción de "alta glucosa" en lugar de señales de inanición (Brink et al., 2021).

Un aspecto clave es redirigir la respuesta celular de manera selectiva hacia la xilosa. Algunas de estas estrategias se basan en regular la expresión de genes heterólogos de su metabolismo mediante promotores inducibles por la pentosa, en lugar de constitutivos (Gopinarayanan & Nair, 2018b; Li et al., 2025). Estos sistemas incluyen regulones o promotores sintéticos diseñados para dirigir la expresión génica de forma precisa. Por ejemplo, los genes de la ruta catabólica de la xilosa han sido controlados por los promotores *GAL1p* y *GAL10p*, los cuales son activados en presencia de xilosa a través del regulón *GAL* modificado (Gopinarayanan & Nair, 2018b). Al implementar estrategias de este tipo se optimiza significativamente el crecimiento y la utilización de este azúcar (Gopinarayanan & Nair, 2018b; Li et al., 2025).

Como alternativa novedosa, en la presente tesis se exploraron receptores quiméricos dedicados a la percepción de la xilosa, con el objetivo de inducir de forma controlada la expresión de genes de transporte, lo que a su vez podría favorecer su utilización. Mientras que el transportador *Gal2mut* aportaba la especificidad en la unión a xilosa y las colas citoplasmáticas de *Rgt2p* y *Snf3p* los dominios de señalización, estas configuraciones no demostraron ser funcionales *per se* como sensores. Posiblemente

esto se deba a una incapacidad para adoptar una configuración receptora adecuada. Los residuos de aminoácidos localizados en los dominios transmembrana de los transportadores exhiben ciertas diferencias con respecto a los receptores, algunos necesarios para el reconocimiento extracelular de la glucosa y la activación completa de la cascada de señalización (Ozcan et al., 1998). Por otra parte, se ha demostrado que las quinasas Yck, componentes clave para transducir la señal, no fosforilan adecuadamente las construcciones quiméricas, lo que provoca que estas sean inestables, se degraden y produzcan solo una señalización parcial (Kim et al., 2024b). Ambos aspectos deberán evaluarse cuidadosamente al proponer futuros ajustes en el diseño de este tipo de construcciones. Der resultar funcionales, sería interesante determinar si una respuesta sensible a la xilosa podría generar un impacto distinto o incluso ventajoso respecto a la señalización mediada por Snf3p en *S. cerevisiae*.

5.3 Sensores homólogos en levaduras no convencionales

Otra cuestión que se podría considerar son los eventos moleculares de señalización que se originan ante la xilosa en levaduras no convencionales, las cuales sí la utilizan de manera natural como fuente de carbono. ¿Poseen estas especies receptores específicos o rutas de transducción de señales dedicadas al reconocimiento de xilosa? Asimismo, ¿existe conservación funcional entre las proteínas de señalización caracterizadas en *S. cerevisiae* y sus homólogos en otros linajes? Un enfoque inicial podría centrarse en identificar proteínas homólogas a los receptores Snf3p y Rgt2p, así como otros moduladores asociados, en distintas especies de levaduras. Esto ayudaría a comprender si la regulación de los eventos de transporte y metabolismo dependen de mecanismos conservados o, por el contrario, si ha evolucionado a partir de sistemas moleculares divergentes.

Durante la búsqueda de nuevos transportadores de pentosas en el genoma de la levadura *Spathaspora passalidarum* (Capítulo 2) se identificó una proteína homóloga a Snf3p. Aunque no se comprobó experimentalmente su función, esta proteína comparte un 43 % de identidad con Snf3p de *S. cerevisiae* y contiene un dominio citoplasmático largo de 223 aminoácidos, en comparación con la cola de 337 residuos en Snf3p, con cierta divergencia en su secuencia. Dicho dominio, ausente en transportadores típicos, podría tener un rol en señalización, aunque son necesarios ensayos de pérdida o ganancia de función para confirmarlo. En *Scheffersomyces stipitis*, otra levadura capaz de fermentar xilosa a etanol, la proteína quinasa SNF1 se encuentra conservada y se

han identificado homólogos de Snf3p y de Rgt2p (Jeffries & Van Vleet, 2009; Yuan et al., 2011). Sin embargo, esta especie parece modular el metabolismo fermentativo de la xilosa principalmente en respuesta a niveles limitantes de oxígeno, más que al sentido directo del azúcar (Jeffries & Van Vleet, 2009). En las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *K. marxianus*, especies más cercanas filogenéticamente a *S. cerevisiae*, existen receptores que poseen funciones equivalentes a Rgt2p y Snf3p, los cuales también regulan la expresión de transportadores de diferentes azúcares (Betina et al., 2001; Wang et al., 2023). En *K. marxianus*, la delección del receptor Snf3p produjo un efecto positivo directo en la utilización de la xilosa, evidenciando que este receptor, en conjunto con otros reguladores, participa en el alivio de la represión catabólica asociada con la glucosa (Wang et al., 2023).

Capítulo 2.

Captación de pentosas mediante nuevos transportadores expresados en *S. cerevisiae*



1. Introducción

1.1 Transporte de azúcares en levaduras

La captación de azúcares es un paso esencial que permite la disponibilidad de los sustratos en el interior celular y su posterior metabolización. Este proceso depende de la acción de proteínas transportadoras de la membrana plasmática y actúa como un punto de regulación clave del flujo metabólico (Dickinson & Schweizer, 2004; Horák, 2013).

La mayoría de los transportadores de sacáridos de levaduras pertenece a la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), ampliamente conservada a nivel estructural (Leandro et al., 2009). Los miembros de esta familia comparten una topología característica, formada por 12 dominios transmembrana hidrofóbicos (TM) del tipo α -hélice, conectados entre sí por loops hidrofílicos (referir a la Figura 7 del Capítulo 1).

En función del mecanismo que utilizan para translocar el sustrato, las proteínas de esta familia se diferencian y se clasifican principalmente en tres sistemas de transporte. Los transportadores conocidos como uniportadores median la difusión facilitada de azúcares, un mecanismo simple por el cual los solutos ingresan a favor de su gradiente de concentración, sin requerimientos energéticos (Figura 23) (Leandro et al., 2009; Yan, 2015). En el sistema de transporte activo, en cambio, el gradiente de concentración no es suficiente para impulsar el movimiento del ligando. Para superar esto, la función de transporte se acopla al movimiento de un segundo sustrato, que puede transportarse en la misma dirección—denominados simportadores—o en dirección opuesta—denominados antiportadores—. En levaduras, el co-transporte de azúcares suele ocurrir mediante simportadores de protones, un proceso que depende de la energía almacenada en el gradiente electroquímico, el cual es generado por la actividad exportadora de las H^+ /ATPasas (Figura 23) (Barnett, 2008; Leandro et al., 2009). Este tipo de sistema suele presentar una afinidad por el sustrato alta (o un K_m bajo) y expresarse cuando los niveles del azúcar son reducidos. Por el contrario, los sistemas de difusión facilitada, generalmente de baja afinidad y alta capacidad, suelen expresarse cuando los niveles del azúcar son abundantes (Leandro et al., 2009). Estas diferencias funcionales permiten a las levaduras adaptarse a una disponibilidad variable de azúcares, modulando la expresión de transportadores con afinidades adecuadas para cada condición del medio (Kruckeberg, 1996).

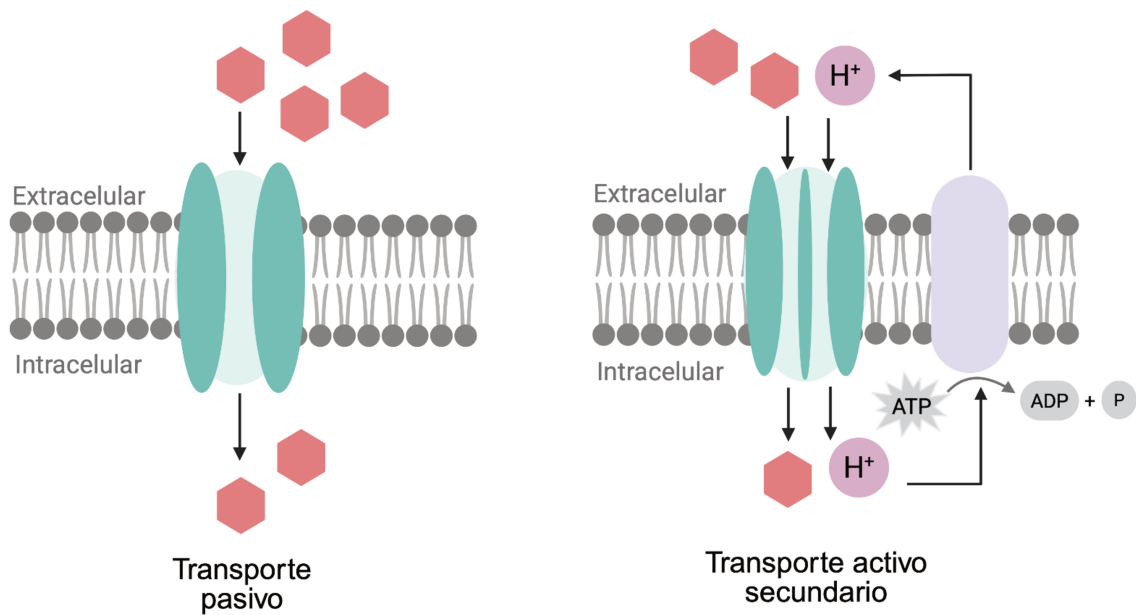


Figura 23. Esquema de los tipos de transportadores más comunes de azúcares hexosas y pentosas en levaduras. A la izquierda, mecanismo de difusión facilitada mediado por uniprotectores dependientes del gradiente de concentración. A la derecha, transporte activo secundario por simportadores del tipo azúcar/ H^+ , acoplado al gradiente electroquímico generado por la bomba de protones dependiente de ATP (H^+ -ATPasa).

1.1.1 Transportadores Hxtp de *S. cerevisiae*: promiscuidad y limitaciones en el transporte de pentosas

La familia de facilitadores *HXT*, ampliamente caracterizada en *S. cerevisiae*, incluyen proteínas especializadas en el transporte de azúcares hexosas que operan a través del mecanismo de difusión facilitada (Boles & Hollenberg, 1997; Horák, 2013). Entre las 20 proteínas Hxtp que componen la familia se incluyen los transportadores Hxt1p-17p, el transportador de galactosa Gal2p, y los sensores de membrana de glucosa Rgt2p y Snf3p (descritos en el Capítulo 1). La abundancia de transportadores de glucosa en *S. cerevisiae* genera cierta redundancia funcional, siendo los miembros Hxt1p-Hxt7p los principales facilitadores de dicho sustrato (Reifenberger et al., 1997). La delección combinada de estos genes genera un fenotipo en el que la levadura es incapaz de crecer en glucosa, ya que el transporte del sustrato está impedido, y, en consecuencia, se interrumpe el flujo glucolítico (Reifenberger et al., 1997).

En levaduras, muchos transportadores presentan un amplio espectro de captación de sustratos, mientras que otros han evolucionado hacia una mayor especificidad, limitándose únicamente a unos pocos azúcares (Donzella et al., 2023). A pesar de que *S. cerevisiae* no asimila naturalmente pentosas, ciertos transportadores de glucosa dentro de la familia Hxtp pueden también facilitar de manera inespecífica la

entrada de xilosa y arabinosa, aunque con afinidades y capacidades distintas. Entre estos transportadores, los de mediana y alta afinidad por la glucosa—Hxt2p, Hxt4p, Hxt5p y Hxt7p—se han descrito como permisivos respecto a la captación de xilosa (Hamacher et al., 2002; Subtil & Boles, 2012; Gonçalves et al., 2014). La proteína Gal2p también puede facilitar la entrada de xilosa y, entre las permeasas de *S. cerevisiae*, es la que más contribuye a la internalización de arabinosa (Becker & Boles, 2003; Subtil & Boles, 2012). Sin embargo, el transporte de pentosas por todas estas proteínas es de baja afinidad y se encuentra competitivamente inhibido por la presencia de glucosa (Kotter & Ciriacy 1993; Hamacher et al., 2002).

En *S. cerevisiae*, la marcada preferencia de las proteínas Hxtp por la glucosa implica que, en medios mixtos de fermentación como los hidrolizados lignocelulósicos, la captación de glucosa se favorezca en primer lugar, lo que retrasa la utilización de pentosas. Este comportamiento provoca un consumo secuencial de los azúcares en lugar de simultáneo, prolongando los tiempos del proceso fermentativo (Figura 24) (Sedlak & Ho, 2004; Saloheimo et al., 2007; Kim et al., 2012; Subtil & Boles, 2012). Sumado a esto, la represión transcripcional de ciertos transportadores y su remoción de la membrana plasmática cuando la glucosa abundante—como ocurre con Gal2p (Rojas et al., 2021b)—reducen la cantidad de proteína funcional y limitan la conversión de pentosas. A medida que la glucosa se agota, los altos valores de K_m (afinidad reducida) de los transportadores Hxtp por las pentosas ocasionan una utilización ineficiente, lenta e incompleta (Figura 24), lo que condiciona notablemente el bioproceso de obtención de etanol 2G.

Para superar estas restricciones, se han desarrollado estrategias dirigidas a incrementar la afinidad de las proteínas Hxtp por la xilosa o la arabinosa. Las mutaciones dirigidas en los sitios de unión al sustrato han permitido mejorar este parámetro cinético (Farwick et al., 2014; Wang et al., 2017; Rojas et al., 2021a). Uno de los casos de mayor éxito es el del transportador Gal2p. Mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 376 por fenilalanina (Gal2p^{N376F}) o por isoleucina (Gal2p^{N376I}), se obtuvieron variantes con mayor especificidad hacia la xilosa o la arabinosa, respectivamente, limitando simultáneamente la entrada de glucosa (Farwick et al., 2014; Verhoeven et al., 2018).

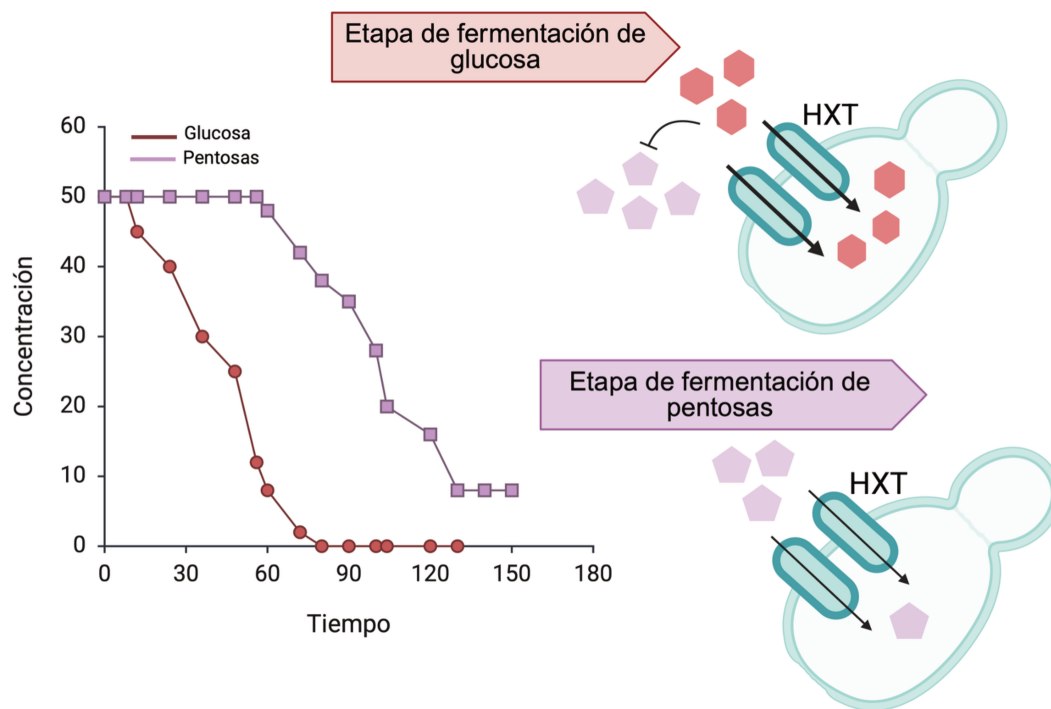


Figura 24. Consumo secuencial de glucosa y pentosas en *S. cerevisiae*. La glucosa es internalizada de manera preferencial a través de transportadores Hxt, inhibiendo competitivamente la entrada de pentosas. La incorporación de xilosa y arabinosa en las células tiene lugar cuando la glucosa comienza a agotarse. Sumado a esto, las limitaciones cinéticas de los transportadores endógenos conducen a la acumulación de pentosas residuales hacia el final del proceso.

Dicho residuo de asparagina, que se encuentra conservado entre los transportadores de hexosas, pareciera ser clave en la selectividad de la proteína hacia los diferentes sustratos. Sin embargo, tales transportadores modificados continúan siendo degradados de forma dependiente de la glucosa (Shin et al., 2017; Rojas et al., 2021b). Adicionalmente, un aumento dirigido de la afinidad suele conllevar una disminución de la capacidad del transportador (Farwick et al., 2014). Ambos aspectos plantean desafíos importantes en la ingeniería racional de transportadores Hxt.

1.1.2 Transportadores de levaduras no convencionales y su expresión en *S. cerevisiae*

En vista de que los facilitadores de hexosas de *S. cerevisiae* presentan limitaciones inherentes, una alternativa es recurrir a transportadores de pentosas provenientes de levaduras *non-Saccharomyces*. Las especies que asimilan pentosas, al estar especializadas en el uso de estos azúcares, constituyen un escenario favorable para la búsqueda de proteínas nativas con mayor afinidad natural por la xilosa o por la

arabinosa. En estas levaduras, están presentes transportadores de baja y alta afinidad por las pentosas, los cuales comprenden mecanismos de difusión facilitada y de simporte de protones, respectivamente (Leandro et al., 2009).

Numerosos trabajos se han centrado en la identificación y caracterización de transportadores provenientes de especies no convencionales (Leandro et al., 2006; Leandro et al., 2009; Wang et al., 2013; Young et al., 2011; Young et al., 2014; Bueno et al., 2020; Donzella et al., 2021; Fiamenghi et al., 2022). Algunos de ellos han mostrado resultados prometedores, como el facilitador Gxf1 de *Candida intermedia* (Leandro et al., 2006). Hasta el momento, Gxf1 es una de las proteínas con mejor desempeño en la internalización de xilosa en concentraciones intermedias de este azúcar (Runquist et al., 2010; Young et al., 2011; Bueno et al., 2020). Sin embargo, este transportador no muestra elevada especificidad por la xilosa, ya que prioriza la entrada de glucosa y capta también otras hexosas (Young et al., 2011; Bueno et al., 2020). A pesar de esto, su capacidad de transporte de xilosa es superior a la de otras proteínas descritas, al operar mediante difusión facilitada (Leandro et al., 2006).

El transporte de xilosa y arabinosa con frecuencia ocurre por el mecanismo activo de simporte de protones, caracterizado previamente en las especies que asimilan las pentosas como *Scheffersomyces stipitis* (Does & Bisson, 1989), *Kluyveromyces marxianus* (Stambuk et al., 2003; Donzella et al., 2021), *Pichia guilliermondii* (Knoshaug & col., 2015) y *C. arabinofermentans* (Fonseca et al., 2007). Estos sistemas de transporte activo suelen manifestar alta afinidad por la xilosa o arabinosa y mayor especificidad en comparación con los transportadores de difusión facilitada. Asimismo, su expresión se ha asociado con un mejor rendimiento en la utilización de pentosas por *S. cerevisiae* cuando los niveles de estos azúcares son escasos (Young et al., 2011; Bracher et al., 2018), lo que refleja la clásica relación inversa entre afinidad y capacidad.

Ensayos previos muestran que la levadura *Spathaspora passalidarum* se destaca por consumir la xilosa a alta velocidad (Bolzico et al., 2024; Capítulo 3), es capaz de co-asimilar glucosa y xilosa en ciertas condiciones (Long et al., 2012) y también de utilizar la arabinosa como fuente de carbono (Racca et al., 2025). Estas características particulares invitan a pensar que la levadura cuenta con un sistema de captación de pentosas igualmente eficiente. Según lo reportado hasta el momento, se ha descrito un único transportador de xilosa funcional de la especie, denominado SpXUT1 (Knychala et al., 2022; Gao et al., 2023), y ninguna proteína relacionada con el transporte de arabinosa. Esto convierte a *Sp. passalidarum* en una plataforma estratégica para explorar en mayor profundidad su repertorio de posibles proteínas transportadoras, objetivo principal del presente capítulo.

Cuando se deletan todos los genes de los transportadores endógenos de hexosas en *S. cerevisiae*, se generan las denominadas plataformas *hxt-null* o Hxt⁰. Estas cepas son incapaces de crecer en azúcares diferentes a la maltosa, a menos que el crecimiento se restaure tras la incorporación de un transportador funcional. Probablemente la más reconocida, EBY.VW4000 (derivada del linaje CEN.PK; Wieczorke et al., 1999), se ha utilizado ampliamente en la caracterización de transportadores heterólogos. A partir de otros linajes de *S. cerevisiae*, como PE-2, BFY507 o Ethanol Red, también se han construido cepas transportadoras negativas que, además, incorporan vías metabólicas necesarias para el catabolismo de la xilosa (Gonçalves et al., 2014) o de la arabinosa (Knoshaug et al., 2015; Bracher et al., 2018; Rojas et al., 2021a). En estas plataformas, el crecimiento de la cepa funciona como un indicador directo de la actividad de transporte de la proteína expresada.

Es importante señalar que la expresión de proteínas transportadoras aisladas de levaduras no convencionales en cepas *hxt-null* de *S. cerevisiae* no siempre resulta funcional y, en muchos casos, requiere de optimización. Diversos factores pueden influir en un fenotipo limitado, incluyendo problemas de estabilidad, de compatibilidad estructural y/o mecanismos de regulación desconocidos en un contexto heterólogo. En consecuencia, numerosos transportadores expresados en *S. cerevisiae* han sido reportados como inactivos, poco eficientes, inestables o carentes de especificidad hacia la xilosa (Young et al., 2011). No obstante, esto no implica que dichas proteínas no posean actividad en el organismo nativo, donde sí podrían funcionar en su entorno fisiológico.

1.2 Regulación y degradación de transportadores

En *S. cerevisiae* y otras levaduras, la glucosa actúa como estímulo ambiental regulando la cantidad y la actividad de proteínas transportadoras, tanto a nivel transcripcional—como se describió en el capítulo 1 mediante rutas de señalización coordinadas—como a nivel postraducciona (Nijland & Driessen, 2020). En este contexto, uno de los principales mecanismos que controlan la estabilidad de los transportadores es su ubiquitinación, una modificación química que funciona como señal molecular para regular su endocitosis y, finalmente, su degradación en la vacuola (Horák, 2013). Esta reacción ocurre en residuos específicos de lisina expuestos al citosol, que pueden estar localizados en el extremo N-terminal, C-terminal y en el loop hidrofílico que conecta los dominios transmembrana TM7 y TM6 de los transportadores Hxtp (Peng et al., 2003; Nijland et al., 2016; Rojas et al., 2021b). Las señales que inducen la remoción de este tipo de proteínas de la membrana plasmática son complejas y dependen de las

condiciones del medio, en particular de la disponibilidad de sustratos. Cuando la glucosa está presente, desencadena la ubiquitinación y posterior internalización de transportadores como Gal2p (Horák, 2013; Tamayo Rojas et al., 2021b). En ausencia de glucosa, son endocitados los transportadores de alta capacidad como Hxt1p y Hxt3p (Roy et al., 2014; Nijland & Driessen, 2020).

La retención de las proteínas en la superficie celular es un factor fundamental para tener en cuenta cuando se expresan transportadores heterólogos o endógenos para mejorar la captación de xilosa en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Nijland et al., 2016; Knychala et al., 2021). Ciertos estudios muestran que las mutaciones puntuales de residuos de lisina por arginina incrementan la estabilidad de transportadores Hxtp al prevenir en parte su ubiquitinación, mejorando la internalización de la xilosa (Nijland et al., 2016; Vasylyshyn et al., 2020). Este enfoque resulta especialmente interesante para su aplicación en transportadores heterólogos de levaduras no convencionales, de los cuales todavía se desconoce si la presencia o ausencia de glucosa, o incluso de la propia pentosa, desencadena señales de degradación.

Aunque se identificaron varias proteínas transportadoras de xilosa en la literatura, el patrón de consumo ineficiente e inespecífico todavía persiste. Además, los factores que determinan la capacidad intrínseca de transporte de xilosa, así como su regulación a nivel de estabilidad, siguen sin comprenderse por completo. Por otra parte, muy pocos estudios se centraron en transportadores heterólogos de arabinosa. Aprovechando las características singulares de *Sp. passalidarum* antes mencionadas en el uso de pentosas y considerando que su diversidad de transportadores aún no ha sido caracterizada, en este trabajo se propuso aislar y evaluar la funcionalidad de tres nuevos candidatos a transportadores de pentosas en *S. cerevisiae*. Asimismo, se consideró la posibilidad de obtener variantes estabilizadas de los nuevos transportadores, lo que podría aumentar su permanencia en la membrana durante la fermentación y repercutir en una mayor eficiencia de los bioprocesos de aprovechamiento de pentosas.

2. Objetivos

- Identificar posibles nuevos transportadores de pentosas en *Sp. passalidarum* mediante un análisis bioinformático.
- Inferir sobre la actividad y especificidad de sustrato de los candidatos identificados.
- Expresar los genes de transportadores putativos en cepas de *S. cerevisiae* recombinantes con deleciones en sus sistemas de transporte endógenos.
- Determinar la actividad de los transportadores candidatos y analizar la especificidad hacia distintos azúcares.
- Evaluar las tasas de consumo de pentosas y el crecimiento celular de las cepas recombinantes portadoras de los transportadores.
- Analizar la estabilidad de los transportadores mediante sustituciones puntuales de residuos de lisina y evaluar su impacto en la captación de pentosas.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Oligonucleótidos utilizados para PCR y secuenciación

La secuencia de los cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes de transportadores se detalla en la Tabla 1 del Apéndice II. Para permitir el ensamblado de plásmidos que expresan los genes de transportadores se adicionaron en los extremos 5' de los cebadores secuencias de aproximadamente 32 pb con homología al vector de destino.

3.1.2 Plásmidos y cepas de *S. cerevisiae*

En el desarrollo de este capítulo se construyeron plásmidos utilizando como molde el vector de expresión en levaduras p416. Los genes correspondientes de los transportadores se clonaron en dicho vector, insertándolos entre los sitios del promotor *GPDp* (o *TDH3p*) y del terminador *CYC1t*. Las construcciones se ensamblaron mediante recombinación homóloga directamente en las cepas de *S. cerevisiae hxt null*, generando así cepas recombinantes portadoras de transportadores. Los detalles de las cepas y plásmidos se resumen en la Tabla 5.

Las cepas de *S. cerevisiae* mutantes en los principales transportadores de hexosas fueron desarrolladas previamente por el Laboratorio de Genómica y Bioenergía (LGE), de la Universidad de Campinas (UNICAMP), Brasil. Las cepas empleadas son esporos haploides derivados del linaje industrial PE-2 (Dos Santos et al., 2016). Específicamente, *S. cerevisiae* FBX1 posee la ruta heteróloga XI de la xilosa isomerasa—gen *XylA* de *Orpynomyces* sp.— integrada y sobreexpresada junto con los genes de la fase no oxidativa de la vía PPP—*RK11*, *RPE1*, *TKL1*, *TAL1*—y la xilulosa quinasa *XKS1*, con promotores constitutivos fuertes. El linaje se obtuvo a partir de un proceso de ALE, lo que resultó en la amplificación en tándem del gen *XylA* (Dos Santos et al., 2016). La cepa FBX1 derivada se construyó mediante la delección de 14 genes de transportadores de hexosas (Tabla 5).

Tabla 5. Vectores y cepas de *S. cerevisiae* utilizados y construidos

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Spathaspora passalidarum</i>		NRRL Y-27907
<i>S. cerevisiae</i> FBYA	PE-2; ↑AraA**-↑AraB**-↑AraD** + ALE en arabinosa; ↑PPP; <i>gal2Δ</i>	Dos Santos et al. (2016) e información no publicada, LGE
<i>S. cerevisiae</i> FBYX1	PE-2; XylA* + ALE en xilosa; PPP↑; <i>gre3Δ</i> ; <i>ura3Δ</i> ; <i>hxt1-7Δ</i> ; <i>hxt9-13Δ</i> ; <i>hxt17Δ</i> ; <i>gal2Δ</i>	Dos Santos et al. (2016) e información no publicada, LGE
FBYA_Gal2	FBYA; pGal2wt	Esta tesis
FBYA_AraSp	FBYA; pAraSp	Esta tesis
FBYA_AraSp-Kmut	FBYA; pAraSp-GFP	Esta tesis
FBYA_AraSp-GFP	FBYA; pAraSp-Kmut	Esta tesis
FBYA_AraSp-Kmut-GFP	FBYA; pAraSp-Kmut-GFP	Esta tesis
FBYA_p416	FBYA; p416	Esta tesis
FBYX1_p416	FBYX1; p416	Esta tesis
FBYX1_Gxf1	FBYX1; pGxf1	Esta tesis
FBYX1_TsSp	FBYX1; TsSp	Esta tesis
FBYX1_TsSp-Kmut	FBYX1; TsSp-Kmut	Esta tesis
FBYX1_XtSp	FBYX1; pXtSp	Esta tesis
FBYX1_XtSp-Kmut	FBYX1; pXtSp-Kmut	Esta tesis
FBYX1_AraSp	FBYX1_pAraSp	Esta tesis
FBYX1_AraSp-Kmut	FBYX1_pAraSp-Kmut	Esta tesis
Plásmido	Características principales	Fuente o referencia
p416	AmpR; URA3; GPDp-CYC1t	
pMF005	kanMX; STE2p-yEGFP-CYC1t	
pGal2wt	p416; GPDp-GAL2-CYC1t	LGE
pGxf1	p416; GPDp-GXF1-CYC1t	Bueno et al. (2020)
pAraSp	p416; GPDp-Ara1Sp-CYC1t	Esta tesis
pAraSp-GFP	p416; GPDp-Ara1Sp-yEGFP-CYC1t	Esta tesis
pAraSp-Kmut	p416; GPDp-Ara1Sp_K519/K530-CYC1t	Esta tesis
pAraSp-Kmut-GFP	p416; GPDp-Ara1Sp_K519/K530-yEGFP-CYC1t	Esta tesis
pTsSp	p416; GPDp-TsSp-CYC1t	Esta tesis
pTsSp-Kmut	p416; GPDp-TsSp_K512/K520-CYC1t	Esta tesis
pXtSp	p416; GPDp-XtSp-CYC1t	Esta tesis
pXtSp-Kmut	p416; GPDp-XtSp_K539-CYC1t	Esta tesis

Nota: *XylA cassette génico fue integrado en el genoma de manera estable y flanqueado por elementos LTR (repetición terminal larga). El gen XylA codifica para la enzima xilosa isomerasa (XI). **AraA, gen que codifica para la enzima arabinosa isomerasa (AI), AraB gen de la ribulosa quinasa (RK), y AraD gen de la ribulosa-5-fosfato epimerasa (RE).

La cepa *S. cerevisiae* FBYA fue construida a partir de un *background* similar al de FBYX1, pero expresando los genes heterólogos de la ruta bacteriana del metabolismo de la arabinosa, AraA—arabinosa isomerasa—, AraB—ribulosa quinasa— y AraD—ribulosa-5-fosfato epimerasa—. Además, se eliminó el gen del principal transportador de arabinosa, *GAL2* (Tabla 5).

3.2 Métodos

3.2.1 Identificación y análisis *in silico* de candidatos

Se realizaron búsquedas de nuevos transportadores putativos de xilosa y arabinosa en el genoma de *Sp. passalidarum* utilizando herramientas bioinformáticas, incluyendo el análisis BLAST a partir de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Secuencias de transportadores funcionales de pentosas previamente caracterizados se recuperaron del NCBI y se usaron como *queries* para identificar posibles candidatos. Los número de acceso de todas las secuencias de proteínas empleadas a lo largo de este capítulo se presentan en la Tabla 2 del Apéndice II.

El análisis de predicción de dominios transmembrana se realizó consultando las herramientas TMHMM v2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) y Phobius (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/pfa/phobius>).

La herramienta MAFFT se utilizó para generar alineamientos múltiples entre las secuencias de aminoácidos de los transportadores, utilizando el método L-INS-i con las configuraciones predeterminadas. Los alineamientos resultantes se visualizaron con Jalview (<https://www.jalview.org>) y se recortaron con Trimal. Posteriormente, los transportadores putativos de *S. passalidarum* identificados se sometieron a un análisis filogenético junto con transportadores de hexosas y pentosas conocidos, incluyendo también sensores de azúcares. Las proteínas utilizadas se especifican en la Tabla 2 del Apéndice II. La reconstrucción filogenética se llevó a cabo mediante el método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*), con 500 réplicas de *bootstrap*, utilizando MEGA12. Los árboles resultantes se visualizaron con la herramienta Interactive Tree of Life (iTOL).

Mediante un análisis comparativo de secuencias de aminoácidos, se identificaron residuos y motivos conservados que se habían asociado previamente con la unión y la especificidad del sustrato, así como con la función de transporte en proteínas antes caracterizadas. Para dicho análisis, se construyeron gráficos de tipo *sequence logo* con

R y el paquete ggseqlogo, con el fin de determinar la probabilidad de ocurrencia de determinados residuos en distintos grupos de transportadores.

Posibles sitios de ubiquitinación en residuos de lisina de los transportadores putativos se predijeron utilizando la herramienta MusiteDeep (<https://www.musite.net/>). Aquellos residuos de lisina que presentaron las puntuaciones de predicción más altas fueron seleccionados para su mutación a arginina.

3.2.2 Clonado de transportadores y construcción de cepas de *S. cerevisiae* recombinantes

Los ORF de los tres transportadores y de sus variantes mutantes se ensamblaron en el vector linealizado p416 mediante recombinación homóloga *in vivo* en las cepas de *S. cerevisiae* FBYA o FBYX1. Para facilitar el ensamblado de los transportadores, los oligonucleótidos incorporaron en el extremo 5' secuencias de 32 pb complementarias a las regiones del promotor *GPDp* y del terminador *CYC1t*. En la Figura 25 se esquematiza este proceso, el cual permite la modificación directa de cepas de *S. cerevisiae* debido a su alta eficiencia en el mecanismo de recombinación homóloga.

Los genes putativos se amplificaron por PCR con la enzima Q5 High-Fidelity DNA polimerasa (New England Biolabs) a partir del ADN genómico de *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907, utilizando los cebadores especificados en la Tabla 1 del Apéndice II. Los ORFs de AraSp y XtSp fueron optimizados para su expresión en *S. cerevisiae*. A diferencia de TsSp, las secuencias de estas proteínas contenían un codón CTG que codifica para el aminoácido serina en *Spathaspora*. Este codón se reemplazó por TCT, de uso más frecuente para dicho aminoácido en *S. cerevisiae*. El reemplazo de codones se realizó mediante mutagénesis dirigida por PCR. Los oligonucleótidos específicos que contienen la mutación se muestran en la Tabla 1 del Apéndice II.

El gen del transportador AraSp se utilizó para transformar la cepa FBYA, mientras que los genes de XtSp y TsSp se introdujeron en la cepa FBYX1. Las cepas se co-transformaron con los fragmentos amplificados de los transportadores y con el vector p416 previamente digerido con EcoRI. Antes de la transformación, las cepas de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en medio rico YPM suplementado con 20 g/L de maltosa en lugar de glucosa. Como marcador de selección, el vector contiene el gen *URA3*, que permite seleccionar los clones ensamblados mediante su crecimiento en medio sintético carente de uracilo, debido a la auxotrofia de las cepas. Los transformantes se incubaron entonces en dicho medio (SC-Ura), que contenía maltosa como fuente de carbono, a 30 °C durante 3 días. El ADN de colonias individuales se extrajo con el método de fenol-cloroformo descrito en Ausubel et al. (2003). La correcta inserción de los fragmentos

se verificó por PCR y confirmación por secuenciación Sanger. Los plásmidos extraídos de *S. cerevisiae* se propagaron en cepas de *E. coli* electrocompetentes para su amplificación. Los plásmidos finales de los transportadores optimizados se recuperaron con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (PROMEGA) y se denominaron pAraSp, pXtSp y pTsSp (Tabla 5). Las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes resultantes se nombraron FBYA_AraSp, FBYX1_XtSp y FBYX1_TsSp (Tabla 5).

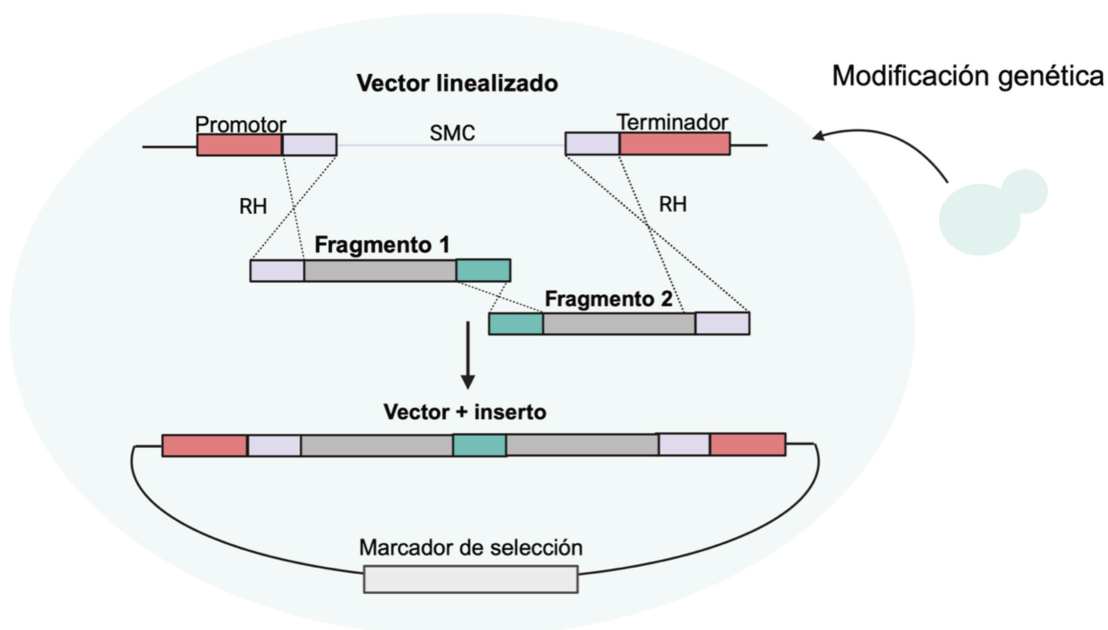


Figura 25. Estrategia de clonación basada en el mecanismo de recombinación homóloga *in vivo* en *S. cerevisiae*. El ensamblado eficiente de diferentes fragmentos de ADN con el vector de destino linealizado tiene lugar gracias a secuencias complementarias de entre 30 a 50 pb presentes en los extremos de los fragmentos a recombinar. La recombinación se puede dar entre un único fragmento y el vector, o bien entre múltiples fragmentos, como en el caso de la construcción de mutantes descrita en este capítulo. Los colores representan las regiones homólogas. Abreviaturas: SMC = sitio de múltiple clonado; RH = recombinación homóloga (mecanismo representado por las líneas discontinuas).

3.2.3 Mutagénesis de residuos de lisina

La modificación de residuos de lisina se llevó a cabo en los transportadores putativos Ara1Sp y XtSp optimizados, así como también en el transportador nativo TsSp. De esta manera, se construyó una variante para cada transportador en la que residuos de lisina presentes en el extremo C-terminal se reemplazaron por arginina. Las mutaciones puntuales se introdujeron mediante amplificación por PCR con cebadores nuevos que contenían el cambio de codón (Tabla 1 del Apéndice II). Para este fin, el gen de cada transportador se dividió en dos fragmentos, de modo que cada uno pudiera amplificarse e incorporar la mutación puntual correspondiente. Posteriormente, mediante

recombinación homóloga, los dos fragmentos superpuestos se ensamblaron entre sí y, simultáneamente, con el promotor y el terminador del vector de destino (p416; Figura 25), reconstruyendo así el gen completo con la mutación. Tras la selección de clones en medio sintético completo sin uracilo, se extrajo el ADN total de colonias individuales para verificar el ensamblado de los plásmidos y transformar *E. coli* para la recuperación de estos. Las construcciones finales y las mutaciones puntuales se confirmaron a través de la secuenciación Sanger. Los plásmidos de las versiones mutadas de cada transportador se denominaron pAraSp-Kmut, pXtSp-Kmut y pTsSp-Kmut, y las cepas resultantes, FBYA_AraSp-Kmut, FBYX1_XtSp-Kmut y FBYX1_TsSp-Kmut, respectivamente.

3.2.4 Fusión a la GFP

Los transportadores AraSp y AraSp-Kmut se fusionaron en su extremo C-terminal a la GFP mediante recombinación homóloga, utilizando los ORFs de los transportadores, el ORF de la GFP y el plásmido p416 previamente linealizado. Los fragmentos se obtuvieron por PCR, incorporando secuencias homólogas en los extremos (Tabla 1 del Apéndice II), y se co-transformaron en la cepa de *S. cerevisiae* FBYA para el ensamblado plasmídico. El gen reportero *yEGFP* se amplificó a partir del plásmido pMF005 (Tabla 5), generando un fragmento que solapa con la región del terminador del vector. Los genes de transportadores, con y sin mutaciones en lisinas y sin codón de terminación, se amplificaron para obtener fragmentos complementarios con el inicio de *yEGFP* y con la región promotora de p416. Los plásmidos ensamblados se verificaron por secuenciación y se denominaron pAraSp-GFP y pAraSp-Kmut-GFP (Tabla 1).

3.2.5 Caracterización funcional de transportadores putativos

Para los ensayos en placa de tipo *spot*, las cepas de *S. cerevisiae* FBYA y FBYX1 que expresaban los transportadores se cultivaron durante 36 horas a 30 °C en medio mínimo sin uracilo suplementado con 20 g/L de maltosa (SC-Ura). Luego, se cosecharon las células, se lavaron tres veces y se resuspendieron hasta alcanzar una densidad óptica inicial a 600_{nm} de 1. Partiendo de este inóculo, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y se depositaron 5 μ l de cada una de ellas sobre placas con medio SC-Ura agarizado. Para determinar los sustratos de los transportadores y evaluar su actividad, el medio se suplementó con diferentes azúcares como única fuente de carbono. Se utilizó maltosa (20 g/L) como control positivo del crecimiento; xilosa o arabinosa en un rango diverso de concentraciones como fuente de pentosas; y glucosa,

galactosa, manosa o fructosa (20 g/L) como fuente de hexosas. Las placas se incubaron entre 3 a 6 días, a 30 °C, dependiendo del sustrato. Los ensayos de *spotting* se realizaron por triplicado biológico. El crecimiento relativo de las diferentes cepas en placas se evaluó siguiendo el protocolo publicado por Petropavlovskiy et al. (2020) y se cuantificó mediante el *software* de procesamiento de imágenes Fiji.

Las cepas de *S. cerevisiae* FBYA que expresaban los transportadores AraSp-Kmut o Gal2p salvaje se cultivaron en medio líquido en ensayos con alta densidad celular inicial para comparar su desempeño en arabinosa. La cepa FBYX1 que portaba el transportador XtSp o su versión mutada, se cultivó en las mismas condiciones, pero usando xilosa como fuente de carbono. Las cepas de *S. cerevisiae* FBYA y FBYX1 transformadas con el vector vacío se incluyeron como controles negativos del crecimiento. Los cultivos se realizaron en frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidad que contenían 25 mL de medio SC-Ura, suplementado con el azúcar pentosa correspondiente y 5 g/L de casaminoácidos. Los frascos se incubaron a 30 °C con agitación constante a 200 rpm, y se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo. Antes de la inoculación, se prepararon dos precultivos para obtener biomasa suficiente de las cepas, las cuales crecieron en medio SC-Ura, con 20 g/L de maltosa y 5 g/L de casaminoácidos. El segundo precultivo se utilizó finalmente para inocular los frascos Erlenmeyer a una DO_{620nm} inicial de 10. El crecimiento celular se monitoreó mediante medidas espectrofotométricas, mientras que el consumo del azúcar y la acumulación de productos de la fermentación se determinaron por HPLC.

3.2.6 Microscopía de fluorescencia

Previo al análisis por microscopía de fluorescencia, las cepas de *S. cerevisiae* FBYA que expresaban los transportadores fusionados a GFP se cultivaron en 5 mL de medio SC-Ura suplementado con 20 g/L de maltosa, durante 24 h a 30 °C con agitación a 200 rpm. En el día del análisis, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se utilizaron para inocular medio fresco SC-Ura a una DO_{620nm} inicial de 2. Se analizó la localización subcelular y la estabilidad del transportador AraSp, tanto en su forma nativa como en su variante con mutaciones en lisinas, en presencia de 20 g/L de maltosa o 20 g/L de arabinosa en tres tiempos diferentes: 0 h (inmediatamente después de la inoculación), 5 h y 24 h. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP8, equipado con un filtro para la proteína reportera GFP. Las imágenes se analizaron utilizando el *software* Fiji.

4. Resultados

4.1 Análisis filogenético y conservación de residuos revelan posible especificidad de los nuevos transportadores

Para identificar posibles transportadores de pentosas se llevó a cabo una búsqueda bioinformática usando secuencias de facilitadores de pentosas conocidas (ver Tabla 1; Apéndice II). A partir de este análisis y del genoma de referencia de *Sp. passalidarum* (Wohlbach et al., 2011), se identificaron tres candidatos: XP_007375015.1 (anotado como transportador de azúcar), XP_007374163 (anotado como transportador/sensor) y XP_007372241 (anotado como transportador de glucosa de alta afinidad). Para corroborar que se trataba efectivamente de proteínas de membrana, se predijo su estructura. Los tres candidatos presentaron al menos 11 dominios transmembrana, consistente con la topología típica de permeasas pertenecientes a la familia MFS.

Se efectuó un análisis filogenético para determinar las relaciones evolutivas de los candidatos con 32 proteínas homólogas de la familia MFS de diferentes especies de levaduras (Figura 26). Cada uno de los candidatos se ubicó en grupos diferentes que incluyeron al menos una proteína con evidencia experimental de transporte de azúcares, lo que permitió inferir sobre su función y/o preferencia por sustrato (Figura 26). En base a esto, los potenciales transportadores se denominaron AraSp (XP_007375015.1), XtSp (XP_007372241), y TsSp (XP_007374163). La proteína AraSp se agrupó dentro de un conjunto de transportadores especializados en la captación de arabinosa—de ahí su denominación—, como AraT de la levadura *Sc. stipitis* (Subtilis & Boles, 2011) y AraT del hongo filamentoso *P. chrysogenum* (Bracher et al., 2018) (marcados en violeta en la Figura 26). Estas proteínas han sido caracterizadas funcionalmente como facilitadores de arabinosa de alta afinidad, y esta agrupación sugiere que AraSp podría presentar una actividad similar. Mientras que XtSp se encontró cercano evolutivamente a AraSp, se ubicó en un grupo diferente junto a transportadores conocidos de xilosa (Figura 26, marcados en verde). Dentro de este clúster, el homólogo más próximo fue Xyp29 de *Sc. stipitis*, un transportador conocido por presentar alta especificidad por la xilosa (Du & Zhao, 2010). Otras proteínas que también facilitan la internalización de la xilosa, pero con mayor preferencia por la glucosa, se agruparon en un clado distante (Figura 26, resaltados en rojo). La proteína TsSp aislada en el presente trabajo se posicionó evolutivamente más distante de AraSp y XtSp.

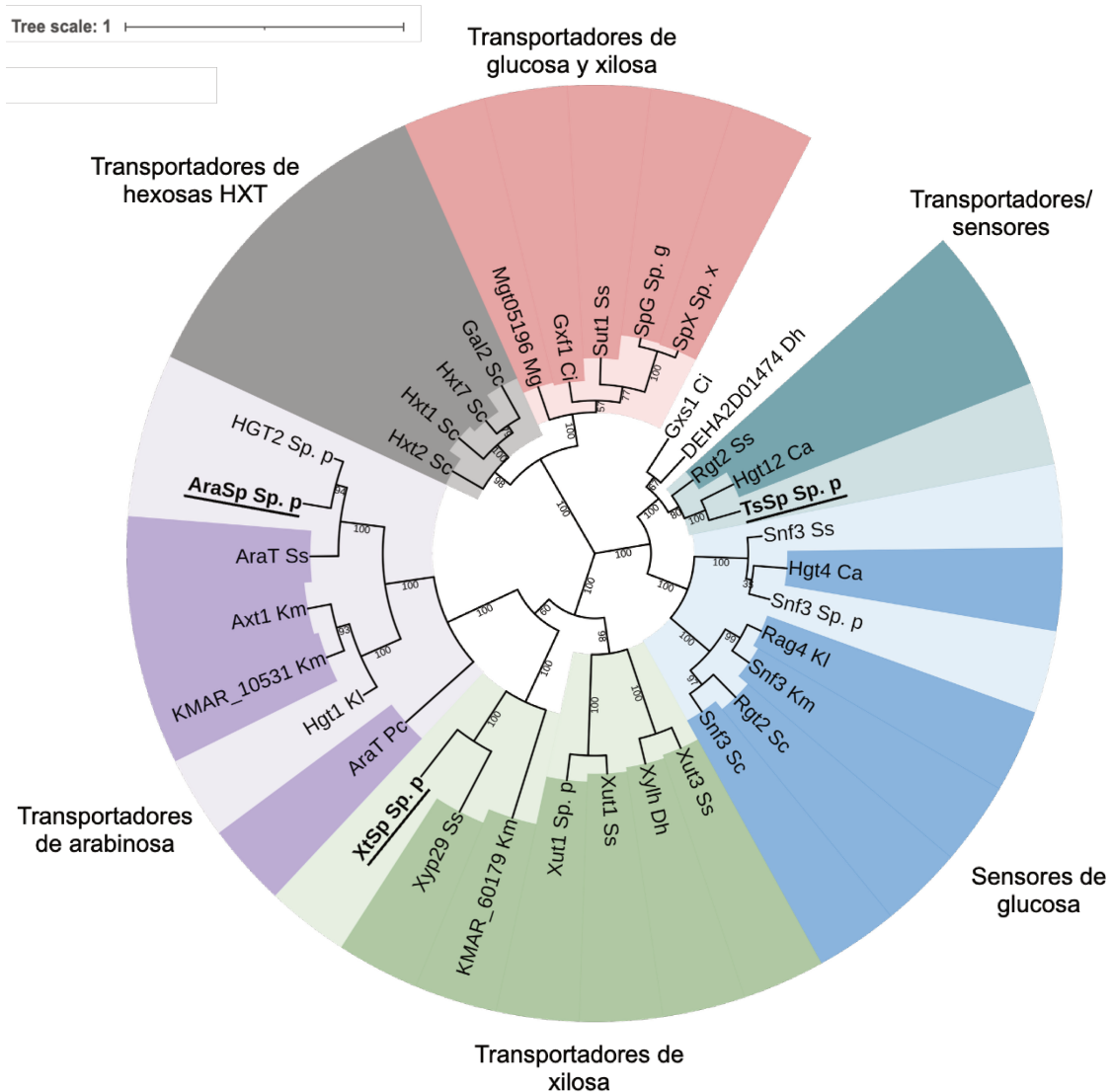


Figura 26. Relaciones evolutivas de los tres candidatos a transportadores de pentosas (TsSp, AraSp y XtSp, subrayados y resaltados en negrita) y de proteínas homólogas de la familia MFS. Los diferentes colores indican: sensores de azúcares (azul; sin actividad de transporte identificada), transportadores que promueven eficientemente el transporte de xilosa (verde), transportadores capaces de captar glucosa y xilosa, pero con preferencia por glucosa (rojo), transportadores que facilitan la captación de arabinosa (violeta), transportadores de hexosas *HXT* de *S. cerevisiae* (gris) y proteínas descritas como sensores y transportadores de azúcares (cian). Las proteínas que no se han caracterizado experimentalmente se muestran con un fondo de color claro dentro del grupo funcional predicho, en lugar del color más intenso usado para proteínas analizadas experimentalmente. La inferencia filogenética se realizó mediante el método de máxima verosimilitud con 500 réplicas de bootstrap en MEGA12. Abreviaturas: Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp. p, *Spathaspora passalidarum*; Km, *Kluyveromyces marxianus*; Kl, *Kluyveromyces lactis*; Ss, *Scheffersomyces stipitis*; Pc, *Penicillium chrysogenum*; Ca, *Candida albicans*; Mg, *Meyerozyma guilliermondii*; Dh, *Debaryomyces hansenii*; Ci, *Candida intermedia*; Sp. g, *Spathaspora gorwiae*; Sp. x, *Spathaspora xylofermentans*.

Específicamente, TsSp se clasificó dentro del grupo de homólogos que median el transporte de azúcares pero que también son referidos como sensores, incluyendo a Rgt2p de *Sc. stipitis* (Young et al., 2014) (Figura 26, resaltadas en cian). Esta proteína

demostró anteriormente ser capaz de internalizar xilosa además de glucosa (Young et al., 2014), por lo que se podría inferir una habilidad equivalente para TsSp.

La comparación de secuencias aminoacídicas entre transportadores funcionales y los candidatos de *Sp. passalidarum* reveló la conservación de motivos y residuos clave asociados al reconocimiento de sustratos y a la función de transporte (Figura 27). En particular, existe un motivo de secuencia conservado G-G-/F-XXX-G en el dominio transmembrana 1 (TM1) que se ha relacionado previamente con la preferencia de sustrato y la eficiencia del transporte (Young et al., 2014). En este motivo, X representa un aminoácido variable, generalmente no polar (Young et al., 2014). La variabilidad de dicho motivo podría explicar, por tanto, la selectividad observada en los distintos grupos que incluyeron a AraSp, XtSp y TsSp (Figura 27A). En los transportadores caracterizados de arabinosa predominó el motivo S/A-G-X-X-F-G-F-D, con mayor probabilidad de metionina en las posiciones 3 y 4, presente también en el transportador putativo AraSp. Curiosamente, Gal2p, que transporta también arabinosa, presenta una metionina en la posición 4. En contraste, los transportadores inclinados hacia la captación de xilosa, que incluyen al putativo XtSp, favorecieron el motivo G-G/F-X-X-F/Y-G-Y-D/N, caracterizado por la conservación de leucina en dichas posiciones (Figura 27A; color verde). Finalmente, en los transportadores/sensores, como TsSp y Rgt2 de *Sc. stipitis*, también se conservó la leucina en la posición 4, pero con variaciones en la posición 3 (fenilalanina o isoleucina) (Figura 27A).

Por otro lado, se detectaron diferencias en otro residuo importante, concretamente en la asparagina conservada del TM8, tomando como referencia la posición N376 de Gal2p (Figura 27B). Se sabe que este residuo influye en la especificidad del ligando (Farwick et al., 2014). En la proteína XtSp identificada en este trabajo, el aminoácido equivalente correspondió a una tirosina, lo que podría sugerir una inclinación por la xilosa sobre la glucosa (Figura 27B, marcado en azul). Esto se basa en que aminoácidos aromáticos en dicha posición, en lugar de la asparagina, han demostrado atenuar la unión de la glucosa (Farwick et al., 2014). Por el contrario, esta asparagina se conservó en todos los transportadores analizados que demostraron captar glucosa, y en los sensores que reconocen este azúcar (Figura 27B).

En todos los transportadores considerados se identificó un motivo enriquecido en aminoácidos aromáticos presente en el TM7 (Figura 27B). Dentro de este motivo, la tirosina situada hacia el extremo está altamente conservada en transportadores (Wang et al., 2015). En contraste, el resto de los residuos del motivo exhiben una variabilidad considerable entre transportadores, aunque dicha variación se mantiene consistente dentro de cada grupo (Figura 27B).

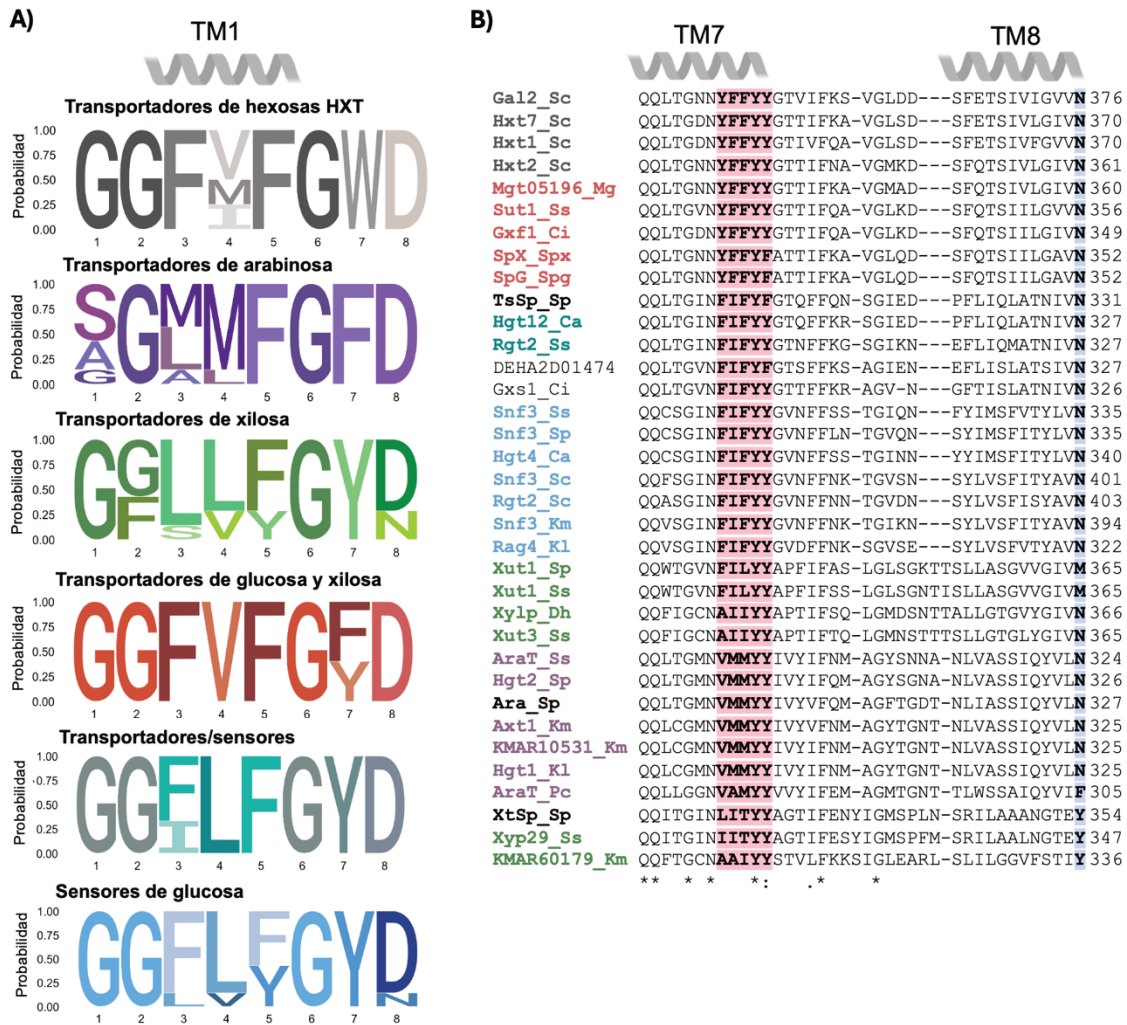


Figura 27. Conservación de motivos y residuos claves asociados con la especificidad y funcionalidad de transportadores de la familia MFS. A) Logo de secuencias que muestra el motivo conservado G-G/F-XXXG asociado con la especificidad y cinéticas de transporte, indicando la frecuencia de aparición de aminoácidos entre los diferentes grupos. B) Alineamiento múltiple de secuencias de transportadores representativos. El motivo aromático conservado en TM7, descrito como funcionalmente relevante en el transporte (Wang et al., 2015), está resaltado en rosa. El residuo de asparagina en la posición 376 de Gal2p, implicado en la especificidad de sustrato (Farwick et al., 2014), junto con los residuos alineados en homólogos, se muestran en azul. Los grupos de transportadores definidos en la Figura 26 se representan con el mismo esquema de colores. Abreviaturas: TM1, dominio transmembrana 1; TM7, dominio transmembrana 7; TM8, dominio transmembrana 8. Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp. p, *Spathaspora passalidarum*; Km, *Kluyveromyces marxianus*; Kl, *Kluyveromyces lactis*; Ss, *Scheffersomyces stipitis*; Pc, *Penicillium chrysogenum*; Ca, *Candida albicans*; Mg, *Meyerozyma guilliermondii*; Dh, *Debaryomyces hansenii*; Ci, *Candida intermedia*; Sp. g, *Spathaspora gorwiae*; Sp. x, *Spathaspora xylofermentans*.

En base a las tendencias descritas, donde TsSp y XtSp se perfilan como posibles transportadores de xilosa y AraSp principalmente de arabinosa, estos candidatos fueron funcionalmente caracterizados mediante ensayos de crecimiento y consumo de azúcares, cuyos resultados se presentan a continuación.

4.2 Caracterización funcional de los candidatos a transportadores de xilosa

En este trabajo, la cepa de *S. cerevisiae* FBYX1 se utilizó como plataforma para expresar y evaluar la actividad transportadora de las proteínas XtSp y TsSp. Los genes de estos transportadores se expresaron individualmente en un plásmido de bajo número de copias (p416) con el promotor constitutivo *GPDp* para dirigir la expresión. Para evitar limitaciones en la expresión por el uso diferencial de codones, el ORF de XtSp se modificó al sustituir el codon CTG—que codifica serina—por TCT, de mayor preferencia en *S. cerevisiae*. Sumado a esto, se reemplazaron residuos de lisina, posiblemente involucrados en ubiquitinación, por arginina. Estas versiones mutadas se incluyeron en los ensayos para evaluar si mejoraban la captación de azúcares al aumentar su permanencia en la membrana.

En primer lugar, la caracterización funcional de XtSp y TsSp se llevó a cabo mediante complementación del crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* FBYX1, a la cual se le han delecionado los sistemas de transporte de hexosas que también captan xilosa de forma inespecífica (*hxt1-7Δ*; *hxt9-13Δ*; *hxt17Δ*; *gal2Δ*). La cepa resultante sólo es capaz de crecer en maltosa como fuente de carbono. Ante la falta de estas proteínas, únicamente la expresión de un transportador funcional permitirá restaurar el crecimiento sobre otros sustratos que este pueda internalizar. La cepa FBYX1, además de su capacidad nativa para metabolizar hexosas, incorpora la vía heteróloga XI que le permite crecer con xilosa (Tabla 5). Luego de la introducción individual de cada transportador putativo, XtSp, TsSp y de sus variantes mutadas, se evaluó el crecimiento de FBYX1 en presencia de varias fuentes de carbono (Figura 28). La cepa portadora del vector vacío sin transportador (control) mostró crecimiento significativo solo en maltosa, aunque puede apreciarse un crecimiento residual, sobre todo en xilosa y fructosa (Figura 28). Los datos de crecimiento de la cepa con cada transportador se normalizaron entonces con relación al de la cepa control en cada condición (Figura 28, crecimiento relativo).

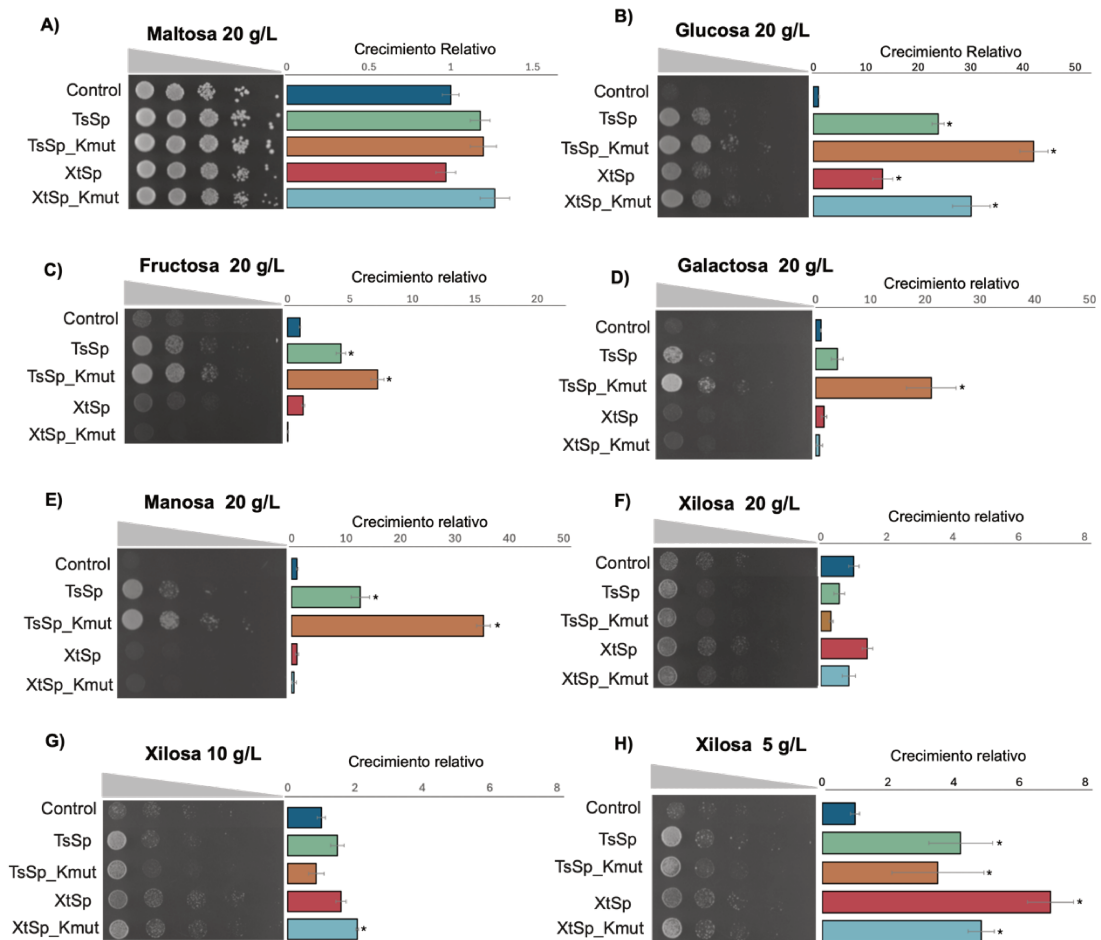


Figura 28. Caracterización funcional de la actividad de transporte de las proteínas TsSp y XtSp de *Sp. passalidarum*. La cepa de *S. cerevisiae* FBYX1 (*hxt-null*) fue transformada con el vector vacío (control sin transportador), con las proteínas XtSp y su mutante en lisina XtSp-Kmut, y con TsSp y su versión mutante en lisinas TsSp-Kmut. Las cepas se cultivaron en maltosa, hexosas y en diferentes concentraciones de xilosa (A–H). Se observa que TsSp restaura principalmente el crecimiento de la cepa en hexosas. El crecimiento y captación de xilosa es escaso tanto en XtSp como en TsSp, con una leve mejora en baja xilosa (H) y para la proteína XtSp. El crecimiento en placa se cuantificó y se representa en los gráficos de barra (izquierda). Estos gráficos indican un aumento relativo del crecimiento respecto al control en la segunda dilución. Los asteriscos indican diferencias significativas en el crecimiento entre cada transportador y el vector vacío, evaluadas mediante un test ANOVA con un valor de $p < 0,05$. Los experimentos se realizaron por triplicado biológico.

La expresión de XtSp y TsSp recuperó el crecimiento de la cepa en glucosa, el cual mejoró notablemente cuando ambos transportadores fueron mutagenizados en las lisinas del C-terminal (Figura 28B). La proteína TsSp, pero no así XtSp, facilitó el crecimiento en todas las hexosas testeadas, incluyendo manosa, galactosa y fructosa, con una mejoría importante en el fenotipo al expresar la variante mutada TsSp-Kmut (Figura 28B-E). Ambos transportadores, TsSp y XtSp, confirieron crecimiento en xilosa, aunque de forma leve y principalmente en bajas concentraciones (Figura 28F-H). XtSp pareció ser el más efectivo en la captación de la pentosa, pero el crecimiento continuó

siendo limitado, y las mutaciones en las lisinas no representaron una ventaja significativa en xilosa. Al introducir en la cepa el transportador Gxf1 de *Candida intermedia*—cuya actividad de transporte de xilosa está establecida (Leandro et al., 2006)—, XtSp y TsSp manifestaron un crecimiento notablemente reducido a comparación de Gxf1 (Figura 29), lo que refleja una eficiencia menor de las nuevas proteínas en el transporte de xilosa.

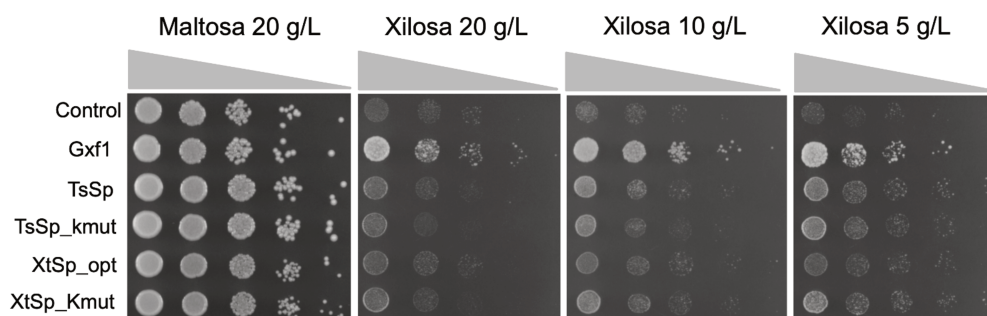


Figura 29. Comparación del crecimiento conferido por los transportadores XtSp y TsSp de *Sp. passalidarum*, sus variantes mutadas en lisinas, y el transportador Gxf1 de *Candida intermedia*. Las cepas de *S. cerevisiae* FBYX1 portadoras de los transportadores respectivos se cultivaron en medio sintético SC-Ura a 30 °C durante 3 días (maltosa) o 5 días (xilosa). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Mientras que TsSp pareció especializarse en sustratos hexosas, se analizó si las cepas de *S. cerevisiae* FBYX1 que expresaban los transportadores XtSp y XtSp-Kmut eran capaces de consumir la xilosa en ensayos de fermentación en medio líquido (Figura 30). Los ensayos se realizaron con una alta densidad celular inicial en medio SC-Ura suplementado con 10 g/L de xilosa (Figura 30). La cepa FBYX1_Gxf1 se incluyó como control positivo del consumo de xilosa. En presencia de la pentosa como única fuente de carbono, no se detectó crecimiento ni utilización del azúcar apreciables luego de 96 h de cultivo, tanto con la proteína XtSp nativa como con su contraparte mutada en lisina (Figura 30). En comparación, la expresión del transportador Gxf1 en la misma cepa dio lugar a la duplicación celular y a la utilización de aproximadamente el 85% de la xilosa presente en el medio (Figura 30). Cabe destacar que durante el consumo de xilosa en las condiciones ensayadas no se detectaron cantidades significativas de etanol. Los motivos subyacentes a la ausencia de crecimiento y de consumo de xilosa al expresar XtSp de *Sp. passalidarum* se analizan con mayor detalle en la sección de discusión.

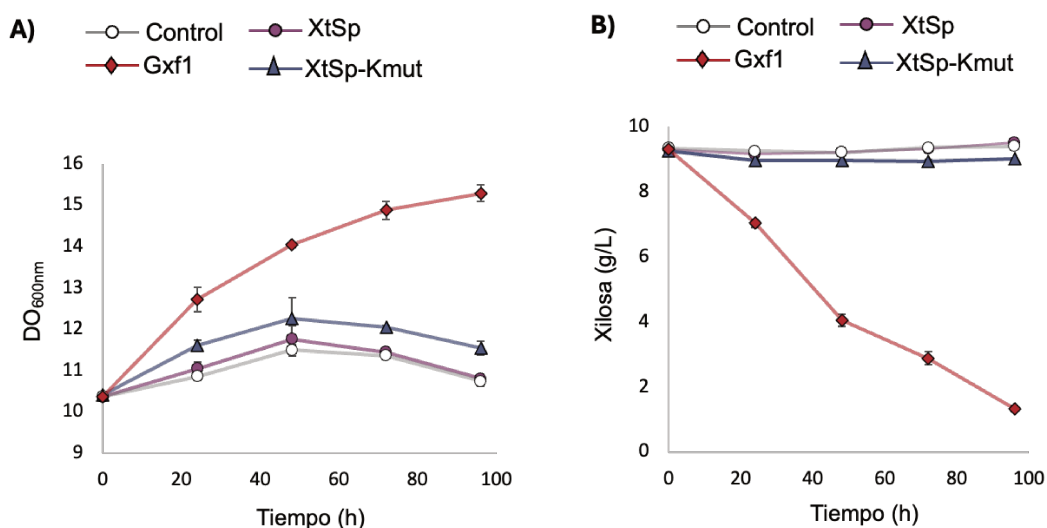


Figura 30. Cinéticas de crecimiento (A) y consumo de xilosa (B) de la cepa *S. cerevisiae* FBXY1 que porta el vector vacío (control) o expresa los transportadores Gxf1 de *C. intermedia*, XtSp y su variante mutada en lisina (XtSp-Kmut) de *Sp. passalidarum*.

4.3 Caracterización funcional del candidato a transportador de arabinosa

La proteína AraSp, con el codón CTG optimizado, y su variante mutagenizada AraSp-Kmut se expresaron utilizando el mismo sistema mencionado anteriormente, pero en la cepa de *S. cerevisiae* FBYA. Dicha cepa fue modificada a través de la integración de la ruta de asimilación de arabinosa bacteriana—genes AraA, AraB, y AraD—, y de la disrupción del gen de la permeasa GAL2. La cepa resultante es incapaz de crecer en arabinosa, excepto si se expresa un transportador con actividad suficiente que rescate el fenotipo.

En las condiciones con arabinosa, la cepa sin transportador (vector vacío) no mostró crecimiento significativo, lo que valida la necesidad de expresar un transportador funcional para la captación de este sustrato (Figura 31). Tras la introducción de AraSp o AraSp-Kmut, el crecimiento de *S. cerevisiae* FBYA en arabinosa 20, 10, 5 y 2,5 g/L se restableció sustancialmente (Figura 31). Estas observaciones indican que tanto el transportador nativo como su variante mutante en lisina pueden mediar la internalización eficiente de arabinosa.

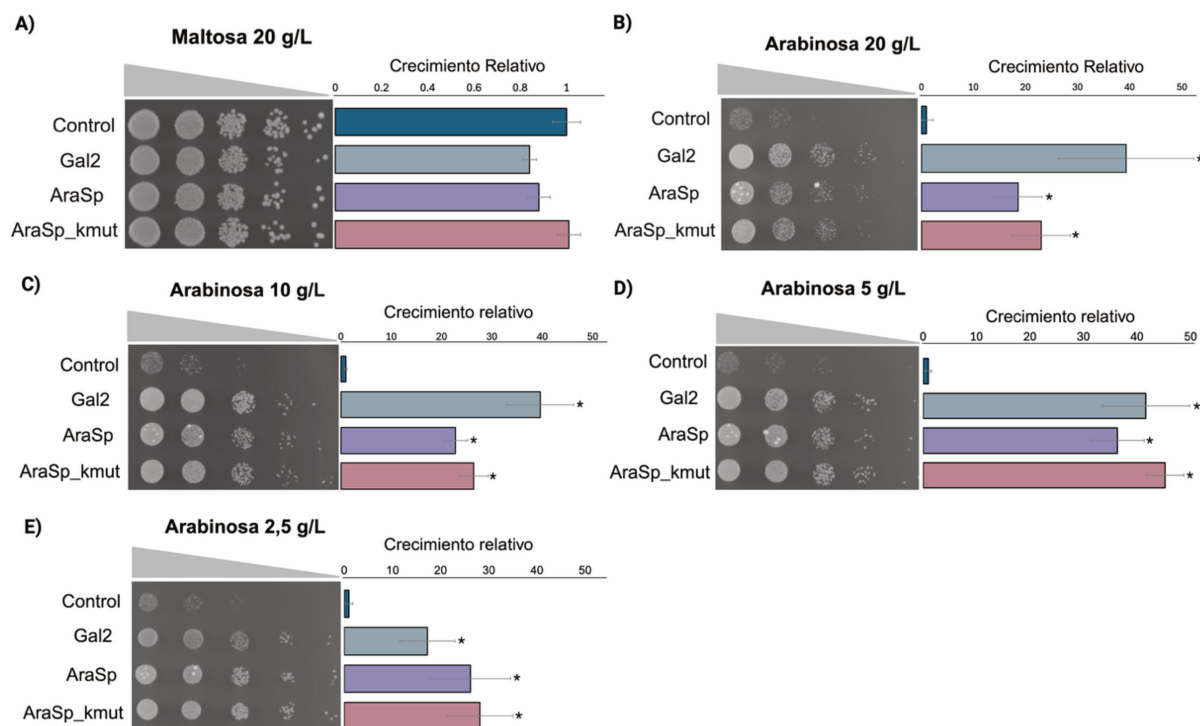


Figura 31. La proteína AraSp de *Sp. passalidarum* y su variante mutada en lisina, AraSp-Kmut, restablecen el crecimiento de *S. cerevisiae* FBYA en arabinosa (B-E). La cepa fue transformada con el vector vacío (control sin transportador), con el transportador Gal2p de *S. cerevisiae*, y con AraSp y AraSp-Kmut de *Sp. passalidarum*. Los ensayos revelan una notable capacidad de AraSp y AraSp-Kmut como transportadores de arabinosa, especialmente en bajas concentraciones (D y E). El crecimiento en placa se cuantificó y se representa como gráficos de barra (izquierda). Estos gráficos indican un aumento relativo del crecimiento conferido al expresar cada transportador respecto al control en la tercera dilución. Los asteriscos señalan diferencias significativas en el crecimiento comparado con el vector vacío, según un análisis ANOVA con un valor $p < 0,05$. Los experimentos se realizaron por triplicado biológico.

Como era de esperar, la reintroducción del transportador Gal2p en la cepa, bajo el mismo sistema de expresión que los transportadores heterólogos, también permitió el crecimiento en todas las condiciones de arabinosa probadas (Figura 31). Este transportador promovió un mayor crecimiento en concentraciones altas e intermedias de arabinosa (20 y 10 g/L) en comparación con AraSp y AraSp-Kmut. En cambio, el transportador heterólogo sin y con la mutación en lisina, mostró una leve ventaja sobre Gal2p en concentraciones bajas de arabinosa (2,5 g/L). Este aspecto sugiere que AraSp podría actuar como un transportador de alta afinidad, dado que este tipo de carriers suelen ser más eficientes cuando el sustrato es limitado.

Como la especificidad de sustrato de los transportadores de levaduras usualmente no se limita a un solo azúcar, se evaluó si AraSp podía mediar la captación de xilosa y de azúcares hexosas. Para comprobarlo, dicha proteína y su mutante se expresaron en la cepa de *S. cerevisiae* FBYX1 y se determinó si su presencia rescataba el crecimiento (Figura 32). Como puede observarse, se produjo un crecimiento

moderado en glucosa y en manosa respecto al control sin transportador, pero ni AraSp ni su mutante promovieron el crecimiento con xilosa en ninguna de las concentraciones testeadas. Estas observaciones sugieren que no estarían implicadas en la captación de xilosa.

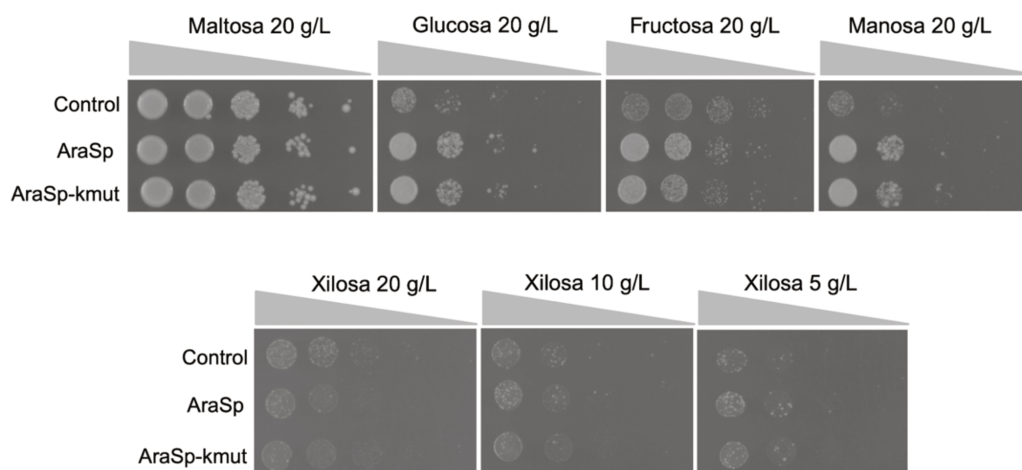


Figura 32. Evaluación de la capacidad del transportador AraSp para conferir crecimiento en sustratos distintos a la arabinosa. La cepa *S. cerevisiae* FBYX1 fue transformada con AraSp y AraSp-Kmut para determinar si, además de arabinosa, permiten la captación de xilosa y otras hexosas. La cepa control expresa el vector vacío sin transportador. Los datos presentados son representativos de tres réplicas biológicas independientes.

4.4 Mutaciones en las lisinas del extremo C-terminal incrementan la estabilidad del transportador AraSp

A continuación, el estudio se enfocó en la localización subcelular del transportador AraSp y en su capacidad de retención en la membrana al expresarse en la cepa *S. cerevisiae* FBYA. Mediante un análisis predictivo se identificó que los residuos K519 y K530 en el extremo C-terminal de la proteína presentaban un alto potencial de ubiquitinación. Por consiguiente, dichos aminoácidos se sustituyeron puntualmente por residuos de arginina, originando la variante AraSp-Kmut. Se analizó entonces si el cambio de lisina por arginina prevenía la degradación vacuolar del transportador. Para ello, ambas proteínas se fusionaron a la GFP y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (Figura 34). Para examinar el efecto de la internalización dependiente del sustrato, las células se cultivaron en medio mínimo SC-Ura con maltosa o con arabinosa. Además, las células se ensayaron en distintos intervalos de tiempo: en condición de privación de nutrientes, y tras 5 y 24 h de exposición a los azúcares.

En maltosa, la señal de la GFP del transportador AraSp se confinó principalmente en la membrana, excepto al inicio del experimento—cuando las células estaban en estado de inanición tras el cultivo *overnight*—. En este momento (t_0), se observó una mayor localización vacuolar de AraSp (Figura 33A). Cuando las células se expusieron a arabinosa, la internalización de AraSp aumentó con el tiempo, lo cual se evidenció por una señal intracelular más intensa de la GFP (Figura 33A). Al reemplazar los residuos de lisina por arginina en el transportador (AraSp-Kmut), se favoreció claramente la acumulación de la proteína en la membrana plasmática con el paso del tiempo e independientemente de la fuente de carbono (Figura 33B).

En su conjunto, estas observaciones subrayan la importancia de mutagenizar posibles sitios de ubiquitinación en transportadores heterólogos, para poder favorecer su estabilidad y abundancia en la membrana citoplasmática del microorganismo huésped.

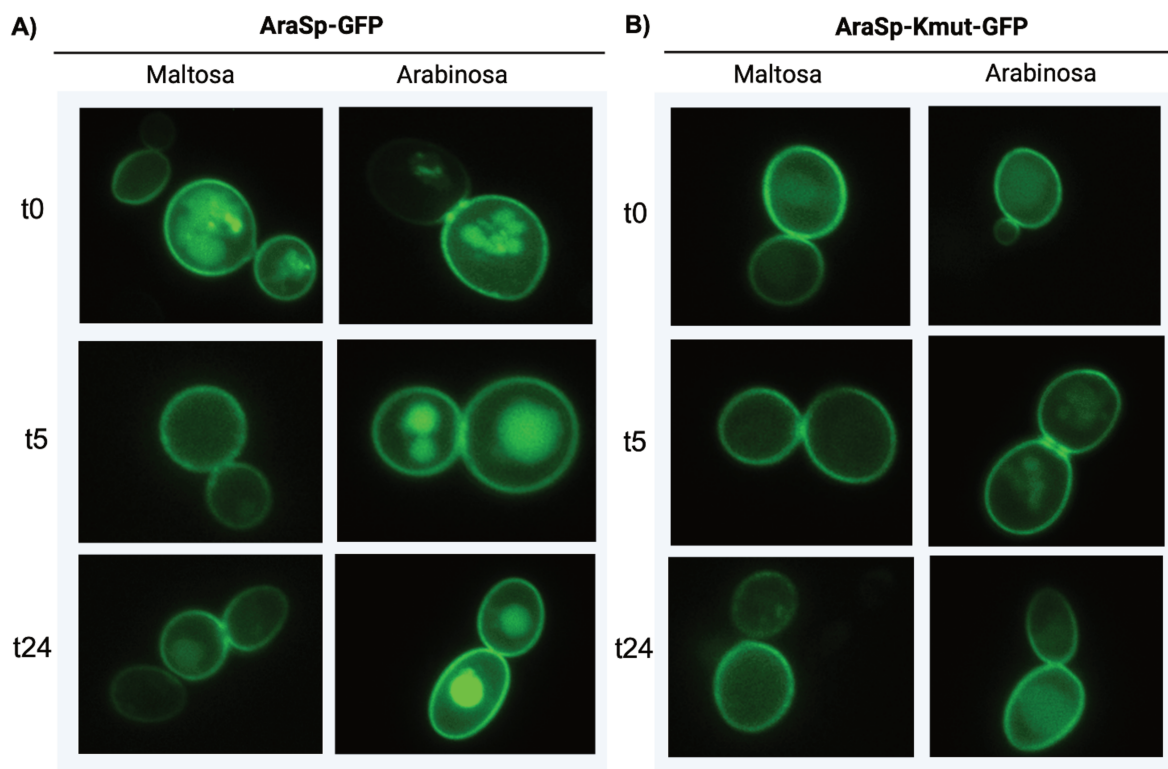


Figura 33. Microscopía de fluorescencia del transportador AraSp (A) y de su variante mutada en residuos de lisina, AraSp-Kmut (B), ambos fusionados a la GFP. Las células se cultivaron en medio mínimo SC-Ura con maltosa (20 g/L) o con arabinosa (20 g/L) como sustratos. Se capturaron imágenes representativas en diferentes intervalos de tiempo durante el cultivo de *S. cerevisiae* FBYA que expresaba las proteínas.

4.4.1 El nuevo transportador optimizado de *Sp. passalidarum* mejora el consumo de arabinosa

La permanencia superior en la membrana plasmática observada para el transportador AraSp-Kmut planteaba la hipótesis de un consumo sostenido de arabinosa por *S. cerevisiae* FBYA. Para poner a prueba esta hipótesis, se efectuaron ensayos fermentativos en medio líquido con la cepa mencionada que expresaba el transportador estabilizado. Las cinéticas de crecimiento y de consumo del sustrato se determinaron en medio líquido SC-Ura con 5 g/L de arabinosa (Figura 34). La cepa *S. cerevisiae* FBYA con el transportador Gal2p se incluyó como referencia para comparar el desempeño. A fin de evitar variaciones en los niveles de expresión que pudiesen generar discrepancias en la asimilación, todos los transportadores se expresaron usando el mismo promotor constitutivo y vector.

Consistente con los resultados anteriores, las células que portaban Gal2p o AraSp-Kmut pudieron crecer y consumir arabinosa como única fuente de carbono disponible (Figura 34). Si bien las velocidades de crecimiento en arabinosa fueron similares entre las cepas, FBYA_AraSp-Kmut mostró un crecimiento ligeramente más rápido que FBYA_Gal2p ($\mu_{\max} = 0,014 \text{ h}^{-1}$ frente a $0,012 \text{ h}^{-1}$). La diferencia más notable, sin embargo, se observó en la utilización del sustrato (Figura 34B). Con Gal2p, la cepa consumió arabinosa ligeramente más rápido al inicio, pero el consumo disminuyó y no se completó al final del ensayo. En cambio, AraSp-Kmut mantuvo una utilización más sostenida de la arabinosa, con significativamente menos azúcar residual al final de la fermentación, consumiendo un 65% de arabinosa frente al 47% con Gal2p (Figura 34B). Esta cinética más prolongada de consumo indica una eficiencia más favorable del transportador de *Sp. passalidarum* en concentraciones bajas de arabinosa. Esto podría estar relacionado a una mayor estabilidad y/o afinidad de AraSp-Kmut en estas condiciones. Se requieren experimentos adicionales que permitan caracterizar los parámetros cinéticos V_{\max} y K_M del nuevo transportador para respaldar esta interpretación.

En las condiciones de cultivo empleadas, no se detectó producción de etanol por la cepa *S. cerevisiae* FBYA, indistintamente de si expresaba el transportador heterólogo o nativo, AraSp-Kmut o Gal2p, respectivamente. Considerando además el fondo genético de la cepa—que porta la ruta bacteriana del catabolismo de la arabinosa y fue sometida a evolución adaptativa—la arabinosa se canaliza preferentemente hacia la generación de biomasa antes que hacia la ruta fermentativa. En consecuencia, podrían ser necesarias nuevas rondas de adaptación en condiciones de oxigenación más restrictivas para mejorar la fermentación de la arabinosa. Resulta particularmente

interesante plantear la evolución paralela de tres cepas—una que exprese *GAL2*, otra *AraSp-Kmut* y una tercera que exprese ambos transportadores—para evaluar comparativamente diferencias en la utilización y fermentación de la arabinosa. También se podrían determinar si mutaciones surgidas durante el proceso adaptativo confieren ventajas adicionales en la captación y el metabolismo de esta pentosa.

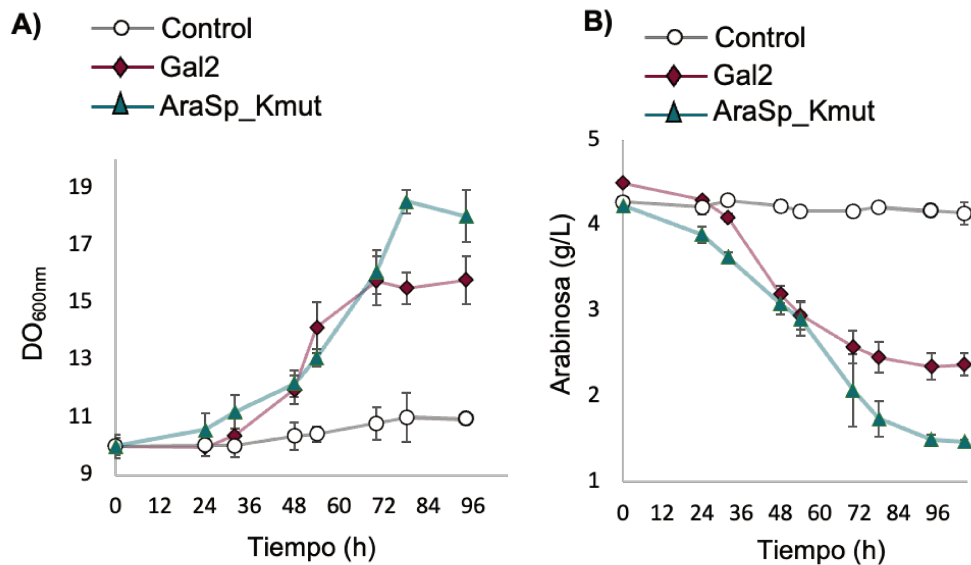


Figura 34. Crecimiento celular (A) y consumo de arabinosa (B) de *S. cerevisiae* FBYA que expresa el transportador *AraSp-Kmut* de *Sp. passalidarum* o el transportador nativo *Gal2p*. Las cepas se cultivaron en medio sintético SC-Ura con 5 g/L de arabinosa como fuente de carbono. Los ensayos se realizaron por triplicado biológico.

5. Discusión

Durante el desarrollo de cepas recombinantes C5 de *S. cerevisiae*, la etapa de transporte de los sustratos al interior celular adquiere un rol limitante en el flujo metabólico. Concretamente, esto se manifiesta en cepas con un catabolismo mejorado de xilosa o en condiciones donde los niveles de las pentosas son reducidos (Gárdonyi et al., 2003; Cai et al., 2012). Como resultado de una restricción inherente en el transporte, la eficiencia de bioconversión de las pentosas disminuye y parte de los sustratos C5 permanece sin ser utilizados por las cepas recombinantes. En conjunto, estas cuestiones reducen los rendimientos de los productos deseados durante la valorización de la biomasa lignocelulósica.

Para abordar las limitaciones asociadas a la inespecificidad e ineficiencia del transporte de pentosas en *S. cerevisiae*, se han optado por dos caminos estratégicos. Una opción es la búsqueda de proteínas de microorganismos que intrínsecamente asimilan pentosas y la otra es la ingeniería de transportadores endógenos de *S. cerevisiae* (Tabla 6).

Tabla 6. Transportadores que facilitan la captación de xilosa y arabinosa en *S. cerevisiae*

Transportador	Característica	Mecanismo de transporte*	Referencia
Endógeno de <i>S. cerevisiae</i> mejorado por ingeniería			
Gal2p ^{N376F}	Transporte de xilosa con mayor afinidad que Gal2p <i>wild-type</i> , pero menor capacidad	DF	Farwick et al. (2014)
Gal2 ^{N376Y/M435I}	Transporte de xilosa con mejor capacidad y especificidad hacia la xilosa que Gal2p <i>wild-type</i> , insensible a la glucosa	DF	Rojas et al. (2021a)
Hxt7p ^{N370S}	Transporte de xilosa. Menor afinidad por la glucosa que la proteína <i>wild-type</i>	DF	Farwick et al. (2014)
Hxt36p ^{N376A}	Transportador quimérico entre HXT3 y HXT6, afinidad por la xilosa mejorada. El transporte de glucosa no se impide	DF	Nijland et al. (2014)
Gal2p ^{N376I}	Afinidad mejorada por la arabinosa, permitiendo su transporte en presencia de glucosa	DF	Verhoeven et al. (2018)
Exógeno de especies <i>non-Saccharomyces</i>			
SUT1 <i>Sc. stipitis</i>	Transportador de glucosa que también capta xilosa, aunque con menor afinidad	DF	Weierstall et al. (1999), Katahira et al. (2008)

XUT1	<i>Sc. stipitis</i>	Alta preferencia por la xilosa sobre la glucosa, pero baja eficiencia en el transporte	n.d.	Young et al. (2011)
XUT3	<i>Sc. stipitis</i>	Mutación E538K mejora el crecimiento y la afinidad por xilosa comparado a la proteína <i>wild-type</i>	n.d.	Young et al. (2011), Young et al. (2012)
Xyp29	<i>Sc. stipitis</i>	Transportador específico de xilosa, aunque no permite su consumo cuando se expresa en <i>S. cerevisiae</i>	DF	Du et al. (2010)
Gxf1	<i>C. intermedia</i>	Especificidad baja por la xilosa, transporta también hexosas, pero confiere altas tasas de crecimiento en xilosa	DF	Leandro et al. (2006), Young et al. (2011)
Gxs1	<i>C. intermedia</i>	Especificidad alta por la xilosa, pero baja capacidad de transporte. Mutaciones F38 I39 M40 causan exclusividad por la xilosa y mayor eficiencia de transporte	SYM H ⁺	Leandro et al. (2006), Young et al. (2011), Young et al. (2014)
Cs4130	<i>C. sojae</i>	Transporta xilosa en altas concentraciones (50 g/L), pero es inhibido por altas cantidades de glucosa	n.d.	Bueno et al. (2020)
PcAraT	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Transporte de arabinosa de alta afinidad, parcialmente inhibido por la glucosa	SYM H ⁺	Bracher et al. (2018)
SsAraT	<i>Sc. stipitis</i>	Transporte de arabinosa de alta afinidad, inhibido por glucosa	n.d.	Subtil & Boles (2011)

*Mecanismo de transporte: DF, difusión facilitada; SYM H⁺, simporte de azúcar/protones; n.d., no determinado.

Entre los transportadores heterólogos funcionalmente expresados en *S. cerevisiae*, solo unos pocos han logrado incrementar ampliamente las tasas de asimilación de pentosas, pero suelen mostrar también preferencia por la glucosa (Tabla 6). Ampliar el repertorio de proteínas transportadoras eficientes, capaces de operar en diferentes contextos de utilización de pentosas, permitiría una modificación global del sistema de transporte de *S. cerevisiae*, y con ello, abrir nuevas posibilidades para la ingeniería de cepas optimizadas.

5.1 Particularidades de los nuevos transportadores de *Sp. passalidarum*

La capacidad de una especie para asimilar un sustrato determinado depende, en parte, de la presencia o ausencia de transportadores adecuados que permitan su captación. En el contexto del uso de pentosas por ciertas levaduras, se podría pensar entonces

que este rasgo metabólico se ha acompañado de un enriquecimiento de transportadores que resultan relevantes para este proceso. En particular, la levadura *Sp. passalidarum* demuestra potencial para emplearse en bioprocesos de fermentación de pentosas (Bolzico et al., 2024; Capítulo 3), pero el conocimiento sobre la diversidad de sus transportadores sigue siendo escaso. Una de las preguntas centrales de este trabajo era si se podrían identificar transportadores novedosos de *Sp. passalidarum* que, al introducirse en *S. cerevisiae*, confirieran un beneficio en la utilización de pentosas. Se aislaron entonces tres ORF del genoma de esta especie que estaban anotados en bases de datos como posibles transportadores de monosacáridos. Estos genes fueron expresados y caracterizados en linajes recombinantes de *S. cerevisiae hxt-null* derivados de la cepa industrial PE-2, modificadas genéticamente para el catabolismo de xilosa o de arabinosa.

En el presente trabajo de tesis se identificó por primera vez un transportador funcional de arabinosa aislado de la levadura *Sp. passalidarum*, el cual se denominó AraSp. Dicho transportador se encuentra codificado por el gen *HGT1.2*. Los miembros de la familia de transportadores HGT, descritos en otras especies como *Kluyveromyces marxianus* y *K. lactis*, son simportadores de azúcares/protones con especificidades y afinidades variables para distintos sustratos (Donzella et al., 2021; Donzella et al., 2023). Al igual que AraSp, algunas proteínas del tipo HGT se han implicado anteriormente en la importación de arabinosa al interior celular (Donzella et al., 2021; Donzella et al., 2023).

El nuevo transportador de *Sp. passalidarum* se agrupó filogenéticamente cercano a los homólogos SsAraT de *Sc. stipitis*, Axt1 de *K. marxianus* y PcAraT de *Penicillium chrysogenum* (Figura 26). Todas estas proteínas, proveniente de especies *non-Saccharomyces*, presentan mayor afinidad por la arabinosa que la permeasa Gal2p de *S. cerevisiae*, cuya cinética está sesgada principalmente hacia la captación de galactosa (Subtil & Boles, 2012; Knoshaug et al., 2015; Donzella et al., 2021; Bracher et al., 2018). El posicionamiento filogenético de AraSp con transportadores de alta afinidad por la arabinosa, junto con un 70% de identidad con SsAraT, sugieren una característica similar de afinidad elevada por este sustrato. Este rasgo representaría una ventaja dado el aporte minoritario de esta pentosa en la biomasa lignocelulósica. De hecho, AraSp sostuvo un crecimiento y una captación más eficientes que Gal2p en 5 y 2,5 g/L de arabinosa. En cuanto a su especificidad, dicho transportador fue incapaz de transportar xilosa, pero sí facilitó la entrada de manosa y, en menor medida, de glucosa.

Entre los tres transportadores evaluados, TsSp de *Sp. passalidarum* fue el que presentó una mayor selectividad hacia hexosas, aunque confirió un crecimiento limitado en xilosa, detectable solo en bajas concentraciones (5 g/L). Sin embargo, esta

capacidad de transporte debe confirmarse en ensayos de fermentación con cultivos agitados. La proteína TsSp comparte alta similitud con el homólogo Rgt2 de *Sc. stipitis*, descrito como uno de los transportadores de xilosa más eficientes de la especie (Young et al., 2014). Sin embargo, TsSp y SsRgt2 están anotados como transportadores/sensores, aunque carecen de las colas citoplasmáticas largas típicamente asociadas con señalización, presentes en los sensores canónicos Rgt2p y Snf3p de *S. cerevisiae*. Para investigar si este grupo de proteínas, además del transporte, detectan azúcares—una característica usualmente atribuida a los transceptores—es necesario realizar evaluaciones adicionales.

La gran parte de los transportadores heterólogos expresados en *S. cerevisiae* prefieren la glucosa como sustrato, y la ausencia de inhibición por este azúcar es un rasgo poco frecuente en la naturaleza. Una forma de promover la exclusión de la glucosa del sitio de unión es a través de mutaciones en residuos que son importantes en la interacción con este azúcar, como la asparagina N376 de Gal2p. Sustituciones de dicha asparagina por aminoácidos aromáticos incrementan la afinidad por la xilosa y debilitan la unión de la glucosa (Farwick et al., 2014; Nijland et al., 2014; Wang et al., 2015; Rojas et al., 2021a). Curiosamente, este cambio ocurre de forma natural en la proteína XtSp de *Sp. passalidarum*, el tercer transportador identificado en este trabajo. XtSp presenta una tirosina (Y354) en lugar de la asparagina, al igual que su homóloga más cercana, Xyp29 (Y347) de *Sc. stipitis*. Esta característica sugiere que ambos transportadores podrían ser selectivos ante la xilosa, un hecho comprobado para Xyp29 (Du & Zhao, 2010). Sin embargo, esta correlación no es absoluta, ya que en este trabajo se observó que XtSp mantiene cierta actividad con glucosa, aunque inferior a la de los transportadores que conservan la asparagina, como TsSp.

Si bien en los ensayos en medio sólido tipo *spot* XtSp permitió cierto crecimiento de *S. cerevisiae* FBYX1 en xilosa, esta capacidad no se trasladó a cultivos en reactores agitados. Este comportamiento sugiere que el transportador de *Sp. passalidarum* confiere una internalización insuficiente o muy limitada de la xilosa al expresarse en la cepa de *S. cerevisiae*.

Un hecho similar ocurrió con el homólogo Xyp29 de *S. stipitis*—con el cual XtSp comparte 55% de identidad—. Esta proteína también presentó muy baja actividad de transporte y no sostuvo el crecimiento en xilosa como única fuente de carbono (Du & Zhao, 2010). De manera semejante, otro trabajo señala que un gran número de proteínas de levaduras no convencionales anotadas como transportadores no mantienen tal funcionalidad cuando se expresan de manera heteróloga en *S. cerevisiae* (Young et al., 2011). Estos autores aluden a un compromiso entre especificidad y eficiencia de ciertos transportadores. Las proteínas XtSp y Xyp29 parecieran

representar este tipo de casos, en los que la especialización podría haber ocurrido a expensas de una menor capacidad de transporte (Du & Zhao, 2010). Es posible que, en su entorno nativo, la actividad de estas proteínas sea complementada por otros transportadores y/o por un entorno fisiológico particular que favorece su funcionamiento, condiciones que no se reproducen en su totalidad al expresarse en *S. cerevisiae*. En línea con esto, también pueden intervenir otros factores. Entre ellos se incluyen problemas de plegamiento o estabilidad de la proteína, defectos en el tráfico hacia la membrana plasmática, incompatibilidades con la composición de dicha membrana o incluso procesos activos de degradación de transportadores en *S. cerevisiae* (Du & Zhao, 2010; Young et al., 2011; Horák, 2013). Otra posibilidad es que haya restricciones metabólicas, las cuales pueden acentuarse al sobreexpresar estas proteínas en determinados fondos genéticos del tipo *hxt-null*. Esto ocurriría especialmente si la actividad transportadora necesitara un elevado mantenimiento energético durante la utilización de la xilosa. Si XtSp funcionase mediante un mecanismo activo acoplado a protones, la demanda de ATP podría limitar la utilización de dicho sustrato y, por ende, el crecimiento. En tal caso, una fuente de carbono suplementaria, como el glicerol, podría sostener el metabolismo celular y permitir la acción del transportador. Sin embargo, esta hipótesis requiere ser evaluada en trabajos futuros que también permitan determinar la cinética del transporte y la dependencia de gradientes de protones como mecanismo funcional.

Por otro lado, no puede descartarse la posibilidad de que la proteína XtSp se encuentre incorrectamente localizada en la célula o sea degradada, dado que la mutación de un único residuo de lisina implementada en este trabajo probablemente sea insuficiente para impedir su ubiquitinación e internalización. De forma similar, las versiones salvajes de las permeasas SpXUT1 (Kynchala et al., 2021) y Hxt2.4 (Trichez et al., 2023) de *Sp. passalidarum* no mantuvieron el consumo de xilosa ni el crecimiento de cepas *S. cerevisiae hxt-null*. La falta de actividad de SpXUT1 sugiere degradación mediada por ubiquitinación, ya que la eliminación conjunta de varios residuos de lisina restauró un fenotipo capaz de utilizar xilosa (Kynchala et al., 2021). Por otro lado, Hxt2.4 funcionaría principalmente como transportador de glucosa en *Sp. passalidarum*, y únicamente la evolución adaptativa en xilosa permitió su internalización en *S. cerevisiae* (Trichez et al., 2023).

5.2 Importancia de obtener variantes estabilizadas

Como se ha señalado, la aplicación de transportadores heterólogos o nativos para la captación de pentosas en *S. cerevisiae* muchas veces se encuentra limitada por un

desajuste entre su expresión y las condiciones fisiológicas de la célula. Así, aunque se sobreexpresen, transportadores funcionales pueden presentar niveles reducidos en la membrana plasmática y, en consecuencia, condicionar su efectividad. Por ejemplo, aunque ciertos transportadores Hxtp puedan admitir intrínsecamente la xilosa o se hayan modificado para incrementar su afinidad, algunos son removidos de la membrana cuando no hay glucosa, como Hxt1p o Hxt3p (Horák, 2013; Roy et al., 2014; Nijland et al., 2016). En otros transportadores, como Gal2p, Hxt7p y Hxt2p, la glucosa promueve su degradación (Kruckeberg et al., 1999; Horák, 2013; Rojas et al., 2021b). Asimismo, una vez expresados en las cepas de *S. cerevisiae hxt-null*, algunos transportadores heterólogos permiten el crecimiento en altas concentraciones de xilosa, pero se ven inhibidos en concentraciones menores (Bueno et al., 2020). Si bien parte de este comportamiento se explica por la propia afinidad y capacidad del transportador, también intervienen mecanismos regulatorios dependientes de sustrato que controlan su integridad en la superficie celular.

En *S. cerevisiae*, la degradación de las proteínas de membrana Hxtp es dependiente de la ubiquitinación de residuos de lisina en respuesta a señales de glucosa, inanición u otras fuentes de carbono (Horák, 2013; Roy et al., 2014; O'Donnell et al., 2015; Nijland et al., 2016). Brevemente, en la ubiquitinación como modificación post-traducciona l intervienen α -arrestinas que ejercen como adaptadores de la E3 ubiquitina-ligasa Rsp5, regulando así la endocitosis de los transportadores (Horák, 2013; Kahlhofer et al., 2021). En el caso de transportadores exógenos que se expresan en *S. cerevisiae*, los mecanismos que gobiernan su estabilidad han sido muy poco explorados en presencia de glucosa y de sustratos alternativos. Se ha demostrado, por ejemplo, que la α -arrestina *ROG3* contribuye a la desregulación del transportador XUT1 de *Sp. passalidarum* ante la presencia de glucosa, pero con xilosa el escenario es más complejo y no parece ajustarse a un único mecanismo (Knychala et al., 2022). Otras α -arrestinas, incluyendo *ROD1*, *ALY1* y *ALY2*, también parecen intervenir en el control de la especificidad de ubiquitinación de otros transportadores heterólogos (Sen et al., 2016).

Las modificaciones en los sitios de ubiquitinación han demostrado reducir la degradación catabólica de transportadores nativos y heterólogos, aumentando su tiempo de retención en la membrana y mejorando los perfiles de consumo de xilosa (Nijland et al., 2016; Vasylyshyn et al., 2020; Knychala et al., 2022; Kretzer et al., 2024). El presente trabajo de tesis revela por primera vez que tal estrategia aplicada a un transportador heterólogo de arabinosa estabiliza la proteína y potencia la utilización de esta pentosa por *S. cerevisiae*. El análisis de localización celular mostró que la versión *wild-type* de AraSp es más estable en presencia de maltosa, mientras que en arabinosa

su internalización aumenta. Estas observaciones sugieren un mecanismo de degradación del transportador heterólogo dependiente del sustrato, el cual se ha descrito anteriormente para transportadores de la familia MFS en *S. cerevisiae* (Horák, 2013; Nijland et al., 2016; Rojas et al., 2021b). La sustitución por arginina de las dos lisinas K519 y K530 del extremo C-terminal de AraSp preservó sustancialmente la remoción interna del transportador. Sin embargo, este mecanismo no fue completamente impedido, probablemente porque otros residuos de lisina en la proteína podrían quedar expuestos a la ubiquitinación.

La estabilización del transportador AraSp mediante la sustitución de lisinas no sólo incrementó su permanencia en la membrana plasmática, sino que además mejoró apreciablemente la capacidad de la cepa recombinante *S. cerevisiae* FBYA para utilizar arabinosa. Al expresar la variante mutada de AraSp de *Sp. passalidarum*, dicha cepa superó el consumo de sustrato observado para la proteína endógena Gal2p, la cual no alcanza niveles considerables de agotamiento de arabinosa. Aunque por el momento no se cuenta con datos fermentativos de la variante nativa de AraSp, el patrón optimizado de utilización de arabinosa por la variante AraSp-Kmut podría asociarse con su mayor retención en la membrana, y en consecuencia, con un flujo más sostenido de arabinosa la interior celular.

Por otro lado, la mutagénesis de los residuos K512 y K520 en la proteína TsSp mejoró significativamente el fenotipo de crecimiento con hexosas, lo que sugiere una mayor disponibilidad en la superficie al prevenir su ubiquitinación. Sin embargo, este efecto no se observó en presencia de la xilosa. De manera similar, un único reemplazo de lisina, K539, en la proteína XtSp favoreció el crecimiento de la cepa con glucosa, pero no generó cambios considerables en la utilización de xilosa, ni en condiciones de crecimiento en medio sólido ni durante el cultivo agitado. Estudios adicionales de localización permitirían determinar si dichas variantes mutadas se encuentran realmente estabilizadas en la membrana ante la presencia de xilosa. De ser este el caso, los mecanismos y propiedades intrínsecas de XtSp y TsSp asociadas al transporte de la pentosa seguirían siendo el factor limitante.

Para identificar la variante más estable de cada permeasa, resultaría interesante evaluar mutaciones de lisinas individuales y combinaciones de ellas en ambos dominios citosólicos terminales, tanto N- como C-terminales. Esto permitiría mapear de manera más completa las posibles dianas de ubiquitinación. Aunque también se ha propuesto, en lugar de sustituciones sitio-dirigidas, el truncado de dichos extremos (Sen et al., 2016; Knychala et al., 2022; Kretzer et al., 2024), esta estrategia debe contemplarse cuidadosamente para evitar comprometer la funcionalidad de los transportadores.

En esta parte de la tesis se identificó un nuevo transportador proveniente de *Sp. passalidarum* con características prometedoras para el aprovechamiento de arabinosa por cepas recombinantes de *S. cerevisiae* en los bioprocesos 2G. Si bien el transportador AraSp fue evaluado en una cepa con un fondo industrial, sus propiedades y eventuales modificaciones deberían también considerarse en condiciones industriales con hidrolizados lignocelulósicos, teniendo en cuenta además su expresión estable mediante integración genómica en *S. cerevisiae*. Además, el transportador optimizado, AraSp-Kmut, podría emplearse en combinación con otros de distinta afinidad, como Gal2p^{N376Y/M435I} (Rojas et al., 2021a), para adaptarse a las mezclas de pentosas presentes en diversas biomásas lignocelulósicas. Contar con variantes optimizadas permitiría mejorar el consumo de este azúcar, asegurando su presencia sostenida en la membrana a lo largo del proceso fermentativo.

Capítulo 3.

Metabolismo de azúcares lignocelulósicos en diversas especies de levaduras



1. Introducción

1.1 Diversidad de levaduras

Además de la levadura *S. cerevisiae*, históricamente empleada como plataforma productiva, numerosas levaduras no convencionales (*non-conventional yeasts*, NCY por sus siglas en inglés) han despertado un creciente interés por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Estas levaduras, también denominadas *non-Saccharomyces*, se distinguen por sus propiedades metabólicas peculiares, las cuales les confieren ventajas en la utilización de diversas fuentes de carbono renovables y de bajo costo. Entre los sustratos de interés que ciertas especies pueden asimilar se encuentran los azúcares pentosas, como la xilosa y la arabinosa; polisacáridos, como el xilano; disacáridos, como la celobiosa y la lactosa; y otros tipos de compuestos, como el glicerol y el metanol (Geijer et al., 2022; Moon et al., 2025).

Si bien existen cepas de *S. cerevisiae* robustas desde el punto de vista industrial, el perfil productivo de metabolitos por parte de esta levadura es relativamente limitado. Esto se debe, en parte, al favoritismo natural de *S. cerevisiae* por las hexosas y a su tendencia a evitar la utilización simultánea de otros tipos de fuentes de carbono, ya sea porque no las asimila eficientemente, o porque, si lo hace, su catabolismo se reprime en presencia de la glucosa (Geijer et al., 2022). Como alternativa a la ingeniería de *S. cerevisiae*, se han explorado características metabólicas deseables en otras especies de levaduras que se adaptan mejor a ciertos procesos de bioconversión. Por nombrar algunos casos, *Yarrowia lipolytica* se reconoce por su alta capacidad de acumulación de lípidos y su aplicación en la producción de compuestos derivados de ácidos grasos (Blazeck et al., 2014); *Rhodotorula toruloides*, por su potencial en la biosíntesis de carotenoides (Dias et al., 2015); *Kluyveromyces marxianus*, destacada por su crecimiento a altas temperaturas, su amplio rango de utilización de sustratos, la eficiente secreción de enzimas como la β -galactosidasa y la producción de moléculas con propiedades aromáticas (Morrissey et al., 2015; Varela et al., 2017); y *Komagataella phaffii*, ampliamente empleada como sistema de expresión heteróloga de proteínas recombinantes y como plataforma microbiana en procesos de aprovechamiento del metanol (Cai et al., 2022).

La eficiente asimilación de pentosas por levaduras no convencionales constituye una característica ventajosa frente a *S. cerevisiae*, aspecto que ha recibido creciente atención en el contexto de procesos que emplean sustratos lignocelulósicos (Ndubuisi et al., 2023). Entre las pentosas, la utilización de la xilosa ha recibido la mayor atención,

ya que constituye la fracción predominante de azúcares C5 presentes en los distintos tipos de biomasa. Muchas de las levaduras capaces de asimilar y/o fermentar xilosa se han encontrado en hábitats naturales ricos en hemicelulosa, mayoritariamente en insectos que degradan la madera y en la propia madera en descomposición (Nguyen et al., 2006; Cadete et al., 2013; Bolzico et al., 2024). Las especies frecuentemente recuperadas de estos ambientes pertenecen a los géneros *Spathaspora* y *Scheffersomyces*, los cuales están filogenéticamente relacionados y forman parte de un clado particular de levaduras denominado CUG-Ser (Nguyen et al., 2006; Cadete et al., 2013; Riley et al., 2016). Curiosamente, solo unas pocas especies dentro de dichos géneros se han reportado hasta el momento como capaces de generar etanol al metabolizar la xilosa, entre las cuales se incluyen *Sp. passalidarum* (Cadete et al., 2016; Veras et al., 2017), *Sc. xylosifermentans* (Cadete et al., 2013; Barros et al., 2024) y *Sc. stipitis* (Jeffries et al., 2007; Veras et al., 2017). Muchas otras especies de los géneros *Spathaspora* y *Scheffersomyces*, en cambio, acumulan principalmente xilitol, un intermediario metabólico de la ruta degradativa de la xilosa (Cadete et al., 2016; Trichez et al., 2019; Barros et al., 2024). Otras levaduras reportadas como consumidoras de xilosa involucran a los géneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Meyerozyma*, *Clavispora* y *Schizosaccharomyces* (Bergmann et al., 2019; Trichez et al., 2019; Ndubuisi et al., 2023).

Las diferencias en las capacidades metabólicas de diversas levaduras no convencionales, junto con las variables del proceso fermentativo de la xilosa que influyen en la acumulación de subproductos, se analizan en mayor profundidad a lo largo de este capítulo.

1.2 Características principales del metabolismo de xilosa en levaduras

Las levaduras que utilizan la xilosa como fuente de carbono y energía pueden haber adquirido, a lo largo de la evolución, rasgos intrínsecos relacionados con mecanismos específicos de respuesta a la pentosa, sistemas de transporte eficientes y una mayor expresión de genes de enzimas involucradas en su metabolismo. Estos genes, conocidos colectivamente como *XYL*, incluyen específicamente *XYL1*, que codifica para la XR (EC 1.1.1.21); *XYL2*, que codifica para la XDH (EC 1.1.1.9); y *XYL3*, que codifica para la XK (EC 2.7.1.17). En la vía oxidorreductiva del metabolismo de la xilosa, la pentosa es inicialmente reducida a xilitol por la XR, dependiente de NAD(P)H, y el xilitol es oxidado posteriormente a xilulosa por la enzima XDH, dependiente de NAD⁺ (Figura

35). El intermediario xilulosa es luego fosforilado por la XK a xilulosa-5-fosfato, que se interconecta con el metabolismo central del carbono mediante su incorporación a la rama no oxidativa de la ruta PPP (Figura 35). En esta etapa, las reacciones catalizadas por las transaldolasas y transcetolasas producen los intermediarios gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, que alimentan el flujo glucolítico (Figura 35) (Hahn-Hagerdal et al., 2007).

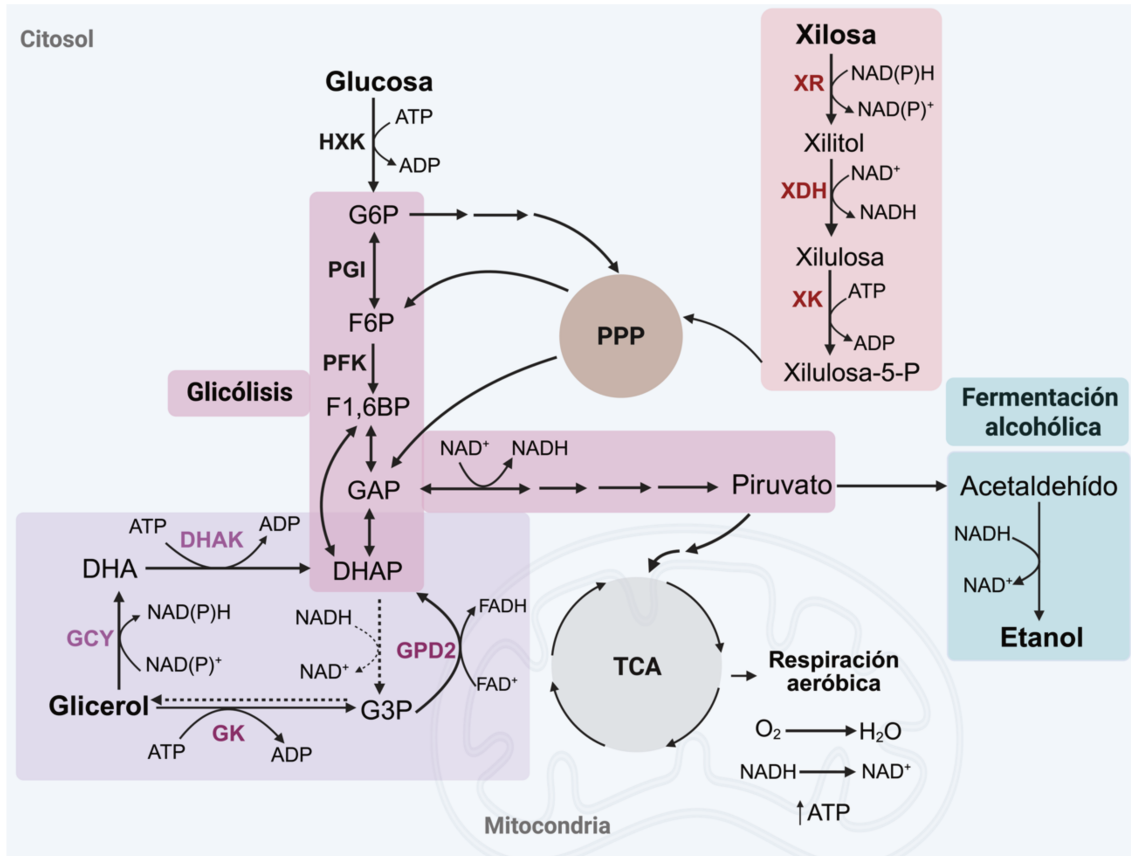


Figura 35. Resumen de las rutas catabólicas de la xilosa, la glucosa y el glicerol y su integración en el metabolismo central del carbono, incluyendo la glicólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP) y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Las rutas metabólicas se marcan con diferentes colores. Se indican las enzimas principales: hexosa quinasa (HXK), glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI), fosfofructoquinasa (PFK), xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH), xiluloquinasa (XK), glicerol deshidrogenasa (GCY), dihidroxiacetona quinasa (DHAK), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPD2) y glicerol quinasa (GK). Los principales intermediarios metabólicos están representados como: glucosa-6-fosfato (G6P), fructosa-6-fosfato (F6P), fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP), gliceraldehído-3-fosfato (GAP), dihidroxiacetona fosfato (DHAP), dihidroxiacetona (DHA) y glicerol-3-fosfato (G3P). Algunas enzimas y metabolitos intermedios se omitieron para mayor claridad.

El piruvato puede continuar su oxidación a través de la vía respiratoria, mediante su conversión a acetyl-CoA, el cual es posteriormente oxidado en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), o bien ser desviado hacia la vía fermentativa (Figura 35). Durante la respiración aerobia, en presencia de oxígeno, se generan NADH y otros cofactores reducidos que son posteriormente oxidados en la mitocondria para producir grandes

cantidades de ATP (Han-Hägerdal et al., 1994; Hahn-Hägerdal et al., 2007). En condiciones de oxígeno limitante o anaeróbicas, la fermentación alcohólica permite regenerar NAD^+ a partir del NADH producido en la glucólisis, lo que mantiene activo el proceso glicolítico. Durante la fermentación, el piruvato se convierte en etanol y CO_2 .

Durante el catabolismo de la glucosa, el balance redox global se mantiene neutro. En cambio, en el proceso de metabolización de la xilosa, un uso diferente de cofactores por las enzimas XR y XDH origina un desbalance. Es decir, cuando XR tiene preferencia por NADPH, esto no coincide con la utilización de NAD^+ de la reacción siguiente (Figura 35). En condiciones reducidas de disponibilidad de oxígeno, los niveles de NADH incrementan y la capacidad celular de regenerar NAD^+ requerido por la XDH es limitada, lo que puede derivar en la acumulación de xilitol (Figura 35).

Algunas especies de levaduras son más eficientes en conducir la xilosa hasta la xilulosa-5-fosfato e incorporarla a la vía no oxidativa de la PPP, mientras que otras avanzan limitadamente en los pasos iniciales y acumulan xilitol (Veras et al., 2017; Veras et al., 2019; Barros et al., 2024). En ciertas especies, la acumulación de xilitol puede explicarse por una mayor preferencia de XR por NADPH y la consecuente incongruencia en el uso de cofactores, que se acentúa durante cultivos poco oxigenados, aunque esto no es siempre el caso. Cuando XR presenta afinidad dual por NADPH y NADH, o exclusividad por NADH, el desbalance redox se mitiga, se reduce la producción excesiva de xilitol y se favorece la actividad fermentativa (Hahn-Hägerdal et al., 1994; Cadete et al., 2016).

1.2.1 El efecto Crabtree y la dependencia del oxígeno

En muchas de las especies no convencionales, la transición entre el metabolismo respiratorio y el fermentativo depende fuertemente del oxígeno, resultando favorecida la vía oxidativa en condiciones de alta oxigenación y reduciéndose la capacidad fermentativa. En contraste, en *S. cerevisiae*, el metabolismo central está mayormente influenciado por la concentración de la fuente de carbono. Cuando la glucosa es abundante, las células priorizan la fermentación alcohólica sobre la respiración, incluso en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Crabtree (Figura 36) (de Deken, 1966; Pfeiffer & Morley, 2014). Conforme la glucosa se agota, las células realizan la respiración para la obtención de energía. La mayoría de las levaduras no manifiestan este fenómeno y son consideradas “Crabtree negativas” (Pfeiffer & Morley, 2014).

Una de las principales limitaciones de *S. cerevisiae* en la utilización de la xilosa probablemente se deba a una actividad insuficiente de la rama no oxidativa de la vía PPP, ya que el flujo metabólico predominante se dirige a través de la glicólisis (Kotter &

Ciriacy, 1993; Bertels et al., 2021). En contraste, en las levaduras que nativamente asimilan xilosa—muchas de ellas Crabtree negativas—, la fracción de carbono que se direcciona a la ruta PPP pareciera ser considerablemente mayor (Hahn-Hägerdal et al., 1994).

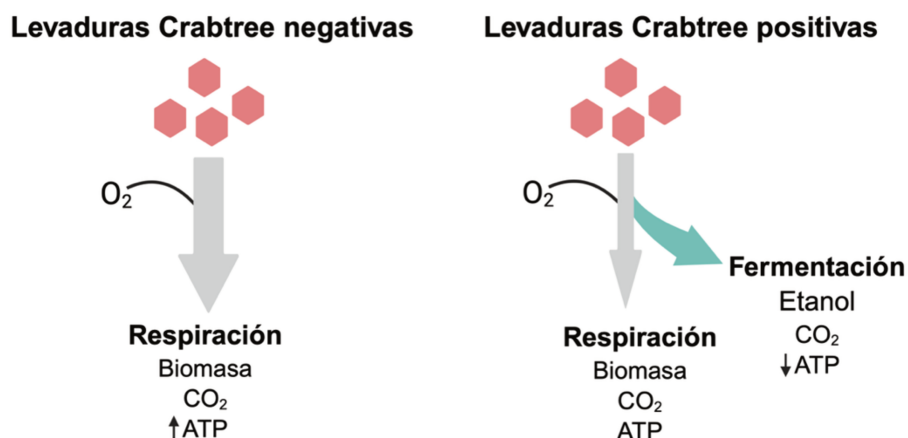


Figura 36. Representación del efecto Crabtree en levaduras. Las especies Crabtree negativas son más propensas a un metabolismo respiratorio y oxidan completamente la glucosa en condiciones aerobias (izquierda). Algunos ejemplos incluyen a *Kluyveromyces marxianus* y *Scheffersomyces stipitis*. Las levaduras que expresan el fenómeno Crabtree se caracterizan por los altos flujos glicolíticos, una mayor canalización del carbono hacia la fermentación y un menor flujo a través de la respiración, incluso en presencia de oxígeno (derecha). Entre ellas se encuentran las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*.

La fermentación alcohólica de la xilosa por levaduras rara vez ocurre en condiciones estrictas de anaerobiosis y necesita de un aporte de oxigenación controlado. Mientras que un mínimo suministro de oxígeno puede favorecer la producción de etanol, un exceso en la aireación tiende a desviar el flujo metabólico de la xilosa hacia la respiración (Passoth et al., 1996). Este balance preciso en la oxigenación afecta el rendimiento global del proceso fermentativo y condiciona la incorporación de las levaduras *non-Saccharomyces* en bioprocesos industriales (Veras et al., 2019).

Desde esta perspectiva, resulta imperativo establecer una configuración adecuada del sistema que permita alcanzar el punto óptimo de la actividad fermentativa de la xilosa, aspecto que es abordado en el presente Capítulo. Además, conocer cómo varía el comportamiento de las levaduras frente a las condiciones de oxigenación permitirá comprender mejor la regulación del metabolismo de las pentosas en diferentes especies, y, en última instancia, dirigir los recursos disponibles hacia la formación de metabolitos deseados.

1.2.2 Acoplamiento metabólico de co-sustratos

Aparte de la aireación, otro parámetro que puede contemplarse en la bioconversión de pentosas por levaduras es la integración del metabolismo de un compuesto adicional, que pueda ser valorizado conjuntamente, referido comúnmente como co-sustrato. La idea de acoplar una segunda fuente de carbono es proveer energía adicional, solventar el desbalance redox mediante el aporte de cofactores adecuados, y/o suministrar precursores que favorezcan la síntesis de metabolitos de interés. Sin embargo, dicha estrategia debe considerar posibles efectos desfavorables como la represión catabólica, la competencia por los sistemas de transporte, y/o el desvío del flujo metabólico hacia rutas no deseadas.

En el escenario de valorización de la biomasa lignocelulósica y la producción de etanol, la glucosa constituye el sustrato más ventajoso desde el punto de vista de la eficiencia del proceso. Sin embargo, también es uno de los principales azúcares que reprimen fuertemente la asimilación de otros compuestos que están presentes en el mismo medio, lo cual dificulta su efectividad como co-sustrato. Aunque los esfuerzos por comprender estos mecanismos se han centrado en *S. cerevisiae*, todavía se dispone de escasa información sobre este tipo de regulación en especies *non-Saccharomyces*, y menos aún durante la utilización de pentosas (Flores et al., 2000). De acuerdo con el principio de la represión catabólica, es probable que las levaduras consuman primero el sustrato que les proporciona el crecimiento más eficiente, en general la glucosa, para posteriormente asimilar los azúcares restantes (Kim et al., 2010). De hecho, este comportamiento se ha observado en la especie fermentadora de xilosa *Sp. passalidarum* en condiciones específicas, en las que la glucosa inhibe la utilización de la xilosa y, mediante un mecanismo aún no esclarecido, previene la inducción de los genes *XYL* (Ribeiro et al., 2021; Guzmán et al., 2024). Otras alternativas a la glucosa como co-sustratos para la utilización de pentosas podrían ser exploradas.

El glicerol se acumula como residuo en la industria de los biocombustibles, especialmente durante la producción de biodiesel, y puede ser aprovechado a través de transformaciones biológicas para obtener productos estratégicos (Chen & Liu, 2016). Como fuente de energía, este compuesto puede ser asimilado por numerosos microorganismos, incluyendo varias especies de levaduras, sin requerir de modificaciones genéticas suplementarias (Klein et al., 2017). Algunas de estas especies se han aplicado como plataformas para redirigir el glicerol hacia la producción de metabolitos de interés industrial como biocombustibles, lípidos y ácidos orgánicos (Dmytruk et al., 2025). Como co-sustrato, el glicerol puede incrementar los equivalentes reducidos y mejorar el metabolismo conjunto de otras fuentes de carbono, debido a su

conversión a piruvato (Figura 35). Esto, a su vez, puede favorecer la producción de determinados intermediarios metabólicos (Clomburg & González, 2013). De manera general, el glicerol es canalizado hacia la glicólisis a través de dos rutas identificadas en levaduras. La vía respiratoria involucra la glicerol quinasa o GK (*GUT1*) y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial o GPD (*GUT2*), generando DHAP (Figura 35). Alternativamente, el glicerol puede catabolizarse por una ruta fermentativa, donde la glicerol deshidrogenasa (GCY o GDH) convierte el glicerol en dihidroxiacetona (DHA), la cual es posteriormente fosforilada por la enzima dihidroxiacetona quinasa (*DAK1*, *DAK2*) a DHAP (Figura 35) (Klein et al., 2017; Dmytruk et al., 2025).

El impacto en el desempeño fermentativo cuando el metabolismo de la xilosa y del glicerol se acoplaron en levaduras nativas fue investigado en el presente trabajo. Este enfoque se planteó como una posible alternativa para aliviar el balance redox que ocurre durante las primeras etapas del metabolismo de la xilosa.

1.3 Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos

Si bien la caracterización de la fisiología de las levaduras, en particular su capacidad de utilizar pentosas y fermentarla a etanol, se inicia en medios sintéticos, es importante considerar que el proceso industrial se lleva a cabo en matrices de sustrato más complejas, como los hidrolizados lignocelulósicos. Durante la utilización de la biomasa lignocelulósica, las células de levaduras se ven expuestas no sólo a azúcares fermentables—hexosas y pentosas—, sino también a diversas combinaciones de compuestos, como ácidos orgánicos, fural aldehídos y compuestos fenólicos, cuya presencia y concentración varían ampliamente según la materia prima utilizada y el método aplicado para su acondicionamiento (Guo et al., 2022). Estos compuestos son originados durante la etapa de pretratamiento de la biomasa y suelen impactar negativamente en la fisiología de los microorganismos, provocando una limitación en su crecimiento, una disminución de la actividad fermentativa y del consumo de la xilosa (Klinke et al., 2004; Cunha et al., 2019). Por este motivo, uno de los objetivos principales de la fase de pretratamiento del proceso es minimizar la generación de dichos subproductos inhibitorios (Guo et al., 2022). Aun así, también resulta importante encontrar o desarrollar levaduras robustas que toleren mejor la fermentación de azúcares C5 y C6 en estas circunstancias.

Siendo que *S. cerevisiae* es extensamente utilizada en procesos industriales, tiende a adaptarse mejor a ambientes de fermentación más estresantes. En el caso de los hidrolizados lignocelulósicos, la tolerancia de *S. cerevisiae* a la toxicidad de los compuestos inhibidores parece depender en gran medida de la cepa considerada y de

la condición experimental evaluada (Modig et al., 2008; Almeida et al., 2009). La variabilidad en la robustez entre cepas de *S. cerevisiae* puede atribuirse a la heterogeneidad de sus contextos genéticos: algunas son intrínsecamente más tolerantes, mientras que otras deben someterse a estrategias racionales de ingeniería y/o evolución para sobreponerse a los efectos tóxicos (Almeida et al., 2009; Li et al., 2022; My et al., 2025).

La fermentación de azúcares en presencia de compuestos inhibitorios representa una demanda adicional para las células. La acumulación intracelular de furfurales se asocia con un incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y con un desbalance en los cofactores redox, ya que aumenta la demanda de NAD(P)H para contrarrestar el estrés celular (Allen et al., 2010; Li et al., 2022). El NAD(P)H es requerido por las enzimas alcohol deshidrogenasas y aldehído reductasas, que participan en la conversión de los aldehídos furánicos, como el hidroximetilfurfural (HMF), en derivados menos tóxicos (Li et al., 2022). La presencia endógena de estas enzimas en *S. cerevisiae* está relacionada con su capacidad de detoxificación, y la sobreexpresión de los genes favorece la fermentación en presencia de HMF y/o furfural (Zhao et al., 2015).

La implementación de levaduras en las tecnologías de bioconversión de la lignocelulosa debe abordar de manera simultánea la utilización de azúcares y la tolerancia a los estreses antes mencionados. En relación con este punto, en el presente trabajo se evalúa el *fitness* de levaduras *Saccharomyces* industriales frente a las condiciones de fermentación de hidrolizados lignocelulósicos no detoxificados de cascarilla de soja (Gil-Rolón et al., 2023). Estas levaduras fueron exitosamente implementadas por el grupo de trabajo en procesos de obtención de etanol en el contexto de biorrefinerías sostenibles (Isla et al., 2013; Comelli et al., 2016), lo que hace que su consideración en los procesos de base lignocelulósica resulte de particular interés. Sin embargo, las aproximaciones aquí demostradas con dichas especies deben complementarse con métodos de ingeniería metabólica para desarrollar simultáneamente cepas resistentes a inhibidores y fermentadoras de pentosas. Alternativamente, la estrategia puede orientarse hacia la aplicación de co-cultivos, como se comenta a continuación.

1.4 Consorcios microbianos y la división de labores

La extensa modificación genética e integración de múltiples rutas metabólicas heterólogas en una misma plataforma microbiana—a menudo denominada “generalista”—puede imponer una carga metabólica y comprometer la eficiencia

energética de las células (Verhoeven et al., 2018; Roell et al., 2019; Atkinson et al., 2022; Shin et al., 2024). Además, estas cepas tienden a asignar sus recursos metabólicos hacia el aprovechamiento del sustrato preferido, restringiendo la utilización simultánea de mezclas de azúcares (Mans et al., 2018; Verhoeven et al., 2018). Cuando el bioproceso exige múltiples capacidades, otra opción es aprovechar las particularidades metabólicas de distintos microorganismos—que actúan como “especialistas”—mediante su cultivo conjunto en un mismo reactor. Esta estrategia, conocida como co-cultivos o consorcios microbianos, se fundamenta en la “división de labores” (*division of labor*, DOL por sus siglas en inglés) entre las especies participantes (Figura 37). De este modo, cada microorganismo desempeña una actividad específica que colabora sinérgicamente a mejorar la eficiencia global del bioproceso (Rafieenia et al., 2022; Llamas et al., 2023) (Figura 37).

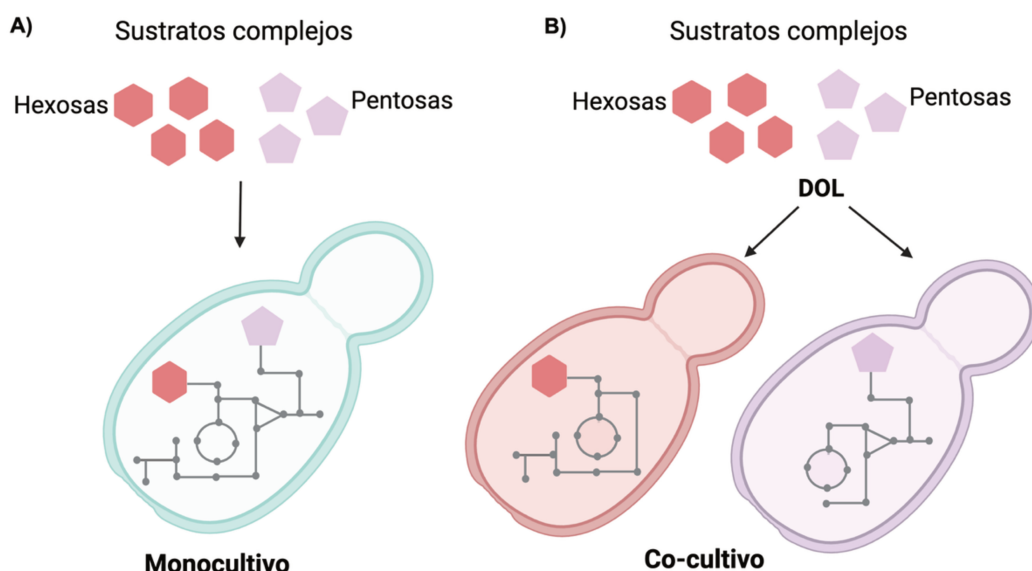


Figura 37. La valorización de sustratos en medios complejos que contienen diferentes azúcares puede realizarse mediante un monocultivo (A), donde una única cepa expresa todos los componentes metabólicos necesarios, o por consorcios microbianos (B). En estos se produce una compartimentación funcional entre los miembros del co-cultivo, también conocida como “división de labores” (DOL), lo que reduce la carga metabólica ejercida sobre un único tipo de cepa. Esta estrategia puede abordarse de dos maneras: combinando levaduras que naturalmente poseen los rasgos deseados, o mediante comunidades sintéticas que han sido diseñadas por ingeniería metabólica para adquirir una función específica, perteneciendo a una misma especie, pero a diferentes cepas.

La transformación de sustratos industriales complejos, tales como las biomásas lignocelulósicas, demanda diversas funciones metabólicas y enzimáticas que pocas veces coexisten en un único microorganismo (Llamas et al., 2023). Desde este punto de vista, se han establecido consorcios microbianos conformados por una levadura

especializada en la fermentación de hexosas—preferiblemente *S. cerevisiae*— y otra perteneciente a especies *non-Saccharomyces* con habilidad para la conversión de pentosas (Brethauery & Studer, 2014; Karagöz et al., 2014; Naseeruddin et al., 2021; Sandri et al., 2023). De forma semejante, se ha propuesto la división funcional de la fermentación de hexosas y pentosas entre cepas de *S. cerevisiae* especialistas, conformando comunidades semi-sintéticas integradas por variantes nativas y por otras genéticamente modificadas (Verhoeven et al., 2018; Yan et al., 2023; Shin et al., 2024).

Algunas de las principales ventajas reportadas de las comunidades microbianas frente a los monocultivos incluyen: relaciones sinérgicas que inducen fenotipos beneficiosos, como un aumento en la termotolerancia (Yamaoka et al., 2014); cinéticas de fermentación de pentosas más estables durante cultivos prolongados (Verhoeven et al., 2018); mejora en los rendimientos del etanol (Karagöz et al., 2014); tiempos de conversión de xilosa más cortos (Sandri et al., 2023); mayores productividades y eficiencias en el uso de los sustratos (Rosero-Chasoy et al., 2021); y la posibilidad de reciclar subproductos de la fermentación como sustratos secundarios para obtener compuestos de mayor valor agregado (Rafieenia et al., 2025). Aun así, la aplicación de comunidades microbianas a nivel industrial continúa siendo un desafío. Especial atención debe dirigirse a la selección adecuada de los miembros del co-cultivo para minimizar posibles interacciones negativas y lograr una co-existencia más estable. En paralelo, debe considerarse el ajuste de la proporción de los inóculos para evitar la competencia por nutrientes (Llamas et al., 2023; Rafieenia et al., 2025). Por último, resulta clave encontrar un equilibrio en las condiciones que favorezcan a todos los miembros del consorcio, incluyendo parámetros como la oxigenación, la sensibilidad al etanol de especies *non-Saccharomyces* y la necesidad de mitigar posibles efectos de represión catabólica (Sandri et al., 2023; Shin et al., 2024).

En este trabajo se propone un cultivo mixto binario entre *S. bayanus* y *Sp. passalidarum*, combinando la robustez y la alta capacidad fermentativa de la glucosa de la primera levadura (Comelli et al., 2016) con la notable eficiencia de la segunda en la conversión de la xilosa (Bolzico et al., 2024).

A pesar de los avances recientes, todavía persisten desafíos que necesitan ser afrontados desde diferentes perspectivas para aprovechar de lleno el potencial que ofrecen las levaduras en el desarrollo de bioprocesos. En términos del aprovechamiento de la xilosa mediante levaduras no convencionales, la mayoría de los estudios se han limitado a las especies comúnmente reportadas *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*, pero la caracterización de la fisiología de otras especies y la comparación de su desempeño, especialmente bajo las mismas condiciones experimentales, ha sido poco investigada.

Este trabajo contempla un análisis comparativo de la utilización de la xilosa y de la acumulación de los principales subproductos de interés industrial derivados de su metabolismo, empleando aislamientos de levaduras novedosos y especies representativas de la fermentación de la xilosa. Se explora el efecto de la oxigenación alta, moderada y limitante como parámetro operacional del proceso, con el fin de comprender cómo algunas especies redirigen su metabolismo hacia la producción de etanol, mientras que otras acumulan xilitol. Los resultados fueron publicados en Bolzico et al. (2024), en el artículo titulado "*Exploring xylose metabolism in non-conventional yeasts: kinetic characterization and product accumulation under different aeration conditions*". A continuación, se aborda el efecto del glicerol en la utilización de xilosa en especies fermentadoras de esta pentosa, como un enfoque eventual para la valorización conjunta de sustratos provenientes de la industria de los biocombustibles.

El impacto de la matriz de fermentación se analiza desde la perspectiva de la robustez de las levaduras industriales del género *Saccharomyces*. Se evalúa la capacidad de estas de consumir y fermentar la glucosa liberada de hidrolizados lignocelulósicos de cascarilla de soja. Además, se explora el comportamiento fermentativo de una levadura non-*Saccharomyces* en dicho sustrato junto con una aproximación inicial a la aplicación de co-cultivos mixtos entre especies de *Saccharomyces* y no convencionales. Aunque el enfoque general de esta tesis se centra en el aprovechamiento de azúcares pentosas, es fundamental considerar también la utilización de la glucosa, dado que ambos azúcares coexisten en los hidrolizados lignocelulósicos. Parte de estos resultados se publicaron en Gil-Rolón et al. (2023) "*Multi-response optimization of thermochemical pretreatment of soybean hulls for 2G-bioethanol production*".

2. Objetivos

- Comparar, desde una perspectiva evolutiva, diferentes especies de levaduras capaces de consumir xilosa.
- Caracterizar cinéticamente la utilización de la xilosa en levaduras no convencionales de diferentes géneros.
- Estudiar el efecto de la aireación como variable determinante en el metabolismo de la xilosa.
- Evaluar la acumulación de subproductos metabólicos bajo distintas condiciones de oxigenación.
- Comparar el comportamiento de cepas de colección con especies no convencionales aisladas de fuentes novedosas.
- Analizar el potencial del glicerol como co-sustrato en el metabolismo de la xilosa en levaduras no convencionales.
- Evaluar la capacidad fermentativa de especies industriales de *Saccharomyces* en hidrolizados lignocelulósicos de cascarilla de soja.
- Analizar la utilización de la xilosa en hidrolizados de cascarilla de soja por la levadura no convencional *Sp. passalidarum*.
- Evaluar la inoculación mixta de *Sp. passalidarum* junto con una especie industrial de *Saccharomyces* para optimizar la conversión de glucosa y de xilosa en hidrolizados lignocelulósicos.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Especies de levaduras utilizadas

En el presente capítulo se emplearon levaduras no convencionales de diferentes orígenes y cepas industriales del género *Saccharomyces* (Tabla 7). Algunas de las levaduras no convencionales se adquirieron de la colección de referencia internacional NRRL (*Northern Regional Research Laboratory*), mientras que otras fueron aisladas previamente por el grupo de trabajo a partir de diversas fuentes ambientales (Tabla 7). Estas especies nativas se obtuvieron por selección en medios ricos con xilosa (Bolzico et al., 2024).

Tabla 7. Levaduras empleadas

Levadura	Colección/Identificación	Fuente/característica	Referencia
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	NRRL Y-7124	Madera en descomposición y tracto digestivo de insectos xilófagos	Du Preez et al. (1986)
<i>Pachysolen tannophilus</i>	NRRL Y-2460	Extractos de madera usados en el curtido del cuero	Slininger et al. (1982)
<i>Spathaspora passalidarum</i>	NRRL Y-27907	Escarabajos de la madera	Nguyen et al. (2006)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	n.a	Efluentes de la industria láctea	Grupo de trabajo
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	n.a	Vino alterado	Grupo de trabajo
<i>Meyerozyma sp.</i>	n.a	Efluentes de curtiembre	Grupo de trabajo
<i>Yamadazyma sp.</i>	n.a	Madera en descomposición	Grupo de trabajo
<i>Naganishia liquefaciens</i>	n.a	Efluentes de curtiembre	Grupo de trabajo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400	n.a	Evolución adaptativa de un linaje de <i>S. cerevisiae</i> modificado con la vía XR/XDH de <i>Sc. stipitis</i>	Wahlbom et al. (2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Ethanol red</i>	n.a	Cepa industrial utilizada en la producción de bioetanol	Fermentis-Lessaffre Ltd.
<i>Saccharomyces bayanus</i>	n.a	Especie utilizada en la producción industrial de vinos y sidras	Fermentis-Lessaffre Ltd.

Abreviaturas: n.a, no aplicable.

La variabilidad de levaduras analizadas permitió comparar especies ampliamente reportadas en la literatura por su capacidad de metabolizar xilosa con nuevas cepas con potencial biotecnológico todavía poco explorado.

3.2 Métodos

3.2.1 Fermentaciones en medio rico con levaduras no convencionales

Preparación de inóculos y condiciones de cultivo con xilosa como único sustrato

Previo a los ensayos de fermentación, los stocks celulares se inocularon en 10 mL de medio YPX (extracto de levadura 5 g/L, peptona 3 g/L y xilosa 20 g/L) con agitación y temperatura constante a 150 rpm y 30 °C, respectivamente, durante 24 h. Posteriormente, se preparó un inóculo de mayor volumen transfiriendo las levaduras a frascos Erlenmeyer con 50 mL de medio YPX completo, a 30 o 35 °C con agitación constante a 150 rpm durante 48–72 h, según la especie, hasta alcanzar un cultivo saturado. El inóculo se separó por centrifugación, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se utilizaron para inocular los reactores de las tres configuraciones a una OD_{600nm} inicial de 1. Los reactores contenían xilosa 10 g/L como fuente de carbono, suplementada con 5 g/L de extracto de levadura, y se incubaron a 35 °C para las diferentes especies, y a 30 °C para *Naganishia liquefaciens*. Se tomaron muestras cada 2 o 4 horas, según la condición de aireación, para monitorear el crecimiento y el consumo de xilosa durante un período de 24 horas. Los volúmenes de las muestras se ajustaron de manera que al menos el 60 % del volumen inicial permaneciera en los reactores al final del experimento. Los datos se presentan como promedios de réplicas biológicas.

Configuración de los reactores respecto a la aireación

Los ensayos de fermentación con xilosa como sustrato se llevaron a cabo en tres configuraciones de reactores, diseñadas para modificar la aireación y evaluar su impacto sobre el crecimiento, el consumo de xilosa y la acumulación de intermediarios. Los reactores se operaron en modo *batch* utilizando frascos con una capacidad total de 100 mL. i) En los reactores aireados, se suplementó aire de manera continua a una tasa de 1.67 vvm, lo que corresponde a un volumen de trabajo de 30 mL y un flujo de aire de 0.05 L/min. En las dos configuraciones restantes no se suministró aire directamente, sino que la aireación estuvo determinada únicamente por el volumen libre entre el medio

de cultivo y la capacidad total de los frascos (HS, espacio de cabeza o *head space*): ii) los reactores con 70% de espacio de cabeza, que contenían 30 mL de volumen de trabajo, se denominaron 70% HS; y iii) los reactores con 40% de espacio de cabeza, que contenían 60 mL de volumen de trabajo, se denominaron 40% HS. En las configuraciones ii) y iii), el crecimiento de las levaduras con xilosa se vio favorecido por el oxígeno residual presente en el espacio de cabeza de los reactores, por la cantidad de aire que se difunde a través del tapón de algodón y por la agitación continua durante la fermentación.

Fermentaciones con glicerol como co-sustrato

Se realizó un screening de las capacidades metabólicas de algunas especies frente a la presencia de glicerol. Las células se cultivaron en xilosa en medio YPX a 30 °C hasta alcanzar un cultivo saturado que se utilizó como inóculo inicial. Los reactores se inocularon a una OD_{600nm} de 1 y consistieron en la configuración de aireación 70% HS. Los reactores se suplementaron con 10 g/L de glicerol como único sustrato, o con 10 g/L de glicerol combinado con 10 g/L de xilosa, con el fin de evaluar la actividad del glicerol como co-sustrato en el metabolismo de la xilosa. Los ensayos se realizaron a 30 °C y 37 °C.

3.2.2 Fermentaciones en hidrolizado lignocelulósico de cascarilla de soja

Inóculos únicos de levaduras Saccharomyces

Se evaluó el desempeño de la cepa industrial de *S. cerevisiae* var. Ethanol Red y de la especie industrial *S. bayanus* en hidrolizados lignocelulósicos de cascarilla de soja (Gil-Rolón et al., 2023). Las fermentaciones se realizaron en modo batch, en reactores agitados bajo condiciones anaerobias, incubando a 30 °C con agitación constante a 150 rpm. No fue necesaria una adaptación previa de las cepas a los sustratos, ni la suplementación de los hidrolizados con extracto de levadura o nutrientes adicionales. Como control del desempeño fermentativo, las cepas también se cultivaron en medio rico YPD conteniendo 60 g/L de glucosa, bajo las mismas condiciones experimentales. Para la obtención de inóculos, previo a la fermentación, las levaduras fueron proliferadas en medio YPD durante 18 h a 30 °C. El pretratamiento del material lignocelulósico y la liberación enzimática de azúcares fermentables se realizaron en dos etapas. Primero, se aplicó un pretratamiento ácido a 121 °C con 2,5% (w/v) de ácido sulfúrico durante 60 min, seguido del ajuste del pH a 5,00 ± 0,10. Segundo, se efectuó la sacarificación enzimática empleando un complejo de enzimas celulolíticas (Cellic CTec2, Novozyme),

manteniendo el material pretratado en agitación a 50 °C por 24 h. El hidrolizado de cascarilla de soja resultante se utilizó para inocular las levaduras a una DO_{600nm} inicial de 1. Las cantidades de glucosa y de xilosa liberadas durante las etapas de acondicionamiento de la cascarilla de soja y sacarificación correspondieron aproximadamente a 60g/L de glucosa y a 15 g/L de xilosa (Gil-Rolón et al., 2023). Los experimentos se realizaron por duplicado biológico.

Inóculo de Sp. passalidarum y mixtos

Se evaluó el desempeño fermentativo de *Sp. passalidarum* tanto en cultivo puro como en co-cultivo con *S. bayanus* utilizando hidrolizados pretratados de cascarilla de soja como sustrato. En el cultivo mixto, la proporción inicial de las levaduras fue la misma para *Sp. passalidarum* y *S. bayanus*, con una DO_{600nm} de 0,5. Las fermentaciones se llevaron a cabo en reactores operados en modo batch a 30 °C, con agitación constante a 150 rpm. Los reactores se configuraron bajo condiciones de oxigenación reducida (40 % HS). Las cepas se reactivaron previamente en medio YPD y se propagaron en medio YPX con xilosa para la obtención de los inóculos individuales. Como control se cultivaron las cepas en las mismas condiciones, pero en medio sintético con glucosa y xilosa como fuentes de carbono (YPGX). Los experimentos se realizaron por duplicado biológico.

3.2.3 Cuantificación de azúcares y derivados metabólicos

Las muestras de cultivo de cada tiempo se centrifugaron y se separaron en sobrenadante y biomasa. La densidad óptica (DO) se determinó a 600 nm usando un espectrofotómetro HACH DR/2010. La xilosa, el xilitol, el glicerol y la glucosa se cuantificaron por HPLC acoplado a un detector de índice de refracción, empleando la columna Hypersyl APS-2 Amino (ThermoFisher) a 30°C. La fase móvil consistió en 83% de acetonitrilo y 17% de agua, con un flujo de 1.250 mL/min. El etanol se determinó mediante cromatografía de gases (GC-2014, Shimadzu) con un detector de ionización de llama y la columna TR-Wax GC (ThermoFisher), usando hidrógeno como gas portador, inyector a 240°C, detector a 250°C y gradiente de temperatura de 40 a 80°C a un flujo de 5°C/min.

3.2.4 Cálculo de parámetros cinéticos

El desempeño de cada cepa en xilosa ante las diferentes condiciones de aireación se estableció mediante el cálculo de varios parámetros cinéticos (Comelli et al., 2020). Los mismos se definen a continuación.

Cambio en la densidad óptica

$$\Delta DO_{600nm} = DO_{600nm,tf} - DO_{600nm,t0} \quad (1)$$

Donde ΔDO_{600nm} es la diferencia entre la densidad óptica medida a 600 nm al final del cultivo y al inicio.

Consumo de sustrato

$$\Delta S(\%) = \frac{\text{Sustrato (g/L)}_{t0} - \text{Sustrato (g/L)}_{tf}}{\text{Sustrato (g/L)}_{t0}} 100 \quad (2)$$

Donde $\Delta S(\%)$ es el porcentaje de xilosa consumida respecto a las concentraciones (g/L) al inicio y al final del cultivo.

Velocidad específica de crecimiento máxima

La velocidad específica de crecimiento máxima, μ_{max} (h^{-1}), se determinó a partir de la pendiente de la regresión lineal de $\ln DO_{600nm}$ vs tiempo, durante la fase exponencial del crecimiento de las levaduras.

Velocidad de consumo de sustrato máxima

La velocidad máxima de consumo de xilosa, r_s (g/L.h), se determinó como el valor absoluto de la pendiente de la concentración de sustrato vs tiempo, durante la fase exponencial.

Rendimiento de producto

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta \text{Producto (g/L)}}{\Delta \text{Sustrato (g/L)}} \quad (3)$$

Donde $Y_{p/s}$ es el rendimiento de xilitol o etanol respecto al sustrato, calculado en el punto donde la concentración del producto alcanza su valor máximo. $\Delta \text{Producto}$ es la cantidad de xilitol o etanol formada y $\Delta \text{Sustrato (g/L)}$ es la cantidad de xilosa consumida en ese mismo intervalo de tiempo.

Productividad de etanol

$$Q_p = \frac{\text{Producto}_{max} \text{ (g/L)}}{\text{Tiempo (h)}} \quad (4)$$

Donde Q_p es la productividad volumétrica de etanol, que comprende la razón entre la concentración de etanol máxima (g/L) y el tiempo de fermentación respectivo (h).

3.2.5 Análisis filogenético

Se analizó la relación evolutiva entre los géneros y especies de levaduras no convencionales consumidoras de xilosa mediante la construcción de árboles filogenéticos. Estos árboles se basaron en las regiones ITS/D1-D2 del ADN ribosomal y en las secuencias de aminoácidos de las enzimas XR y XDH depositadas en base de datos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se proveen en la Tabla 1 del Apéndice III. Se realizaron en primer lugar los alineamientos múltiples con MUSCLE, y, en segundo lugar, la construcción de árboles mediante el método de máxima verosimilitud utilizando MEGA 11. Para las regiones ITS/D1-D2 se aplicó el modelo General Time Reversible, mientras que para las secuencias proteicas de XR/XDH el modelo Le_Gascuel_2008 (Le & Gascuel, 2008). La robustez de las agrupaciones se evaluó mediante bootstrap con 1000 réplicas y las secuencias correspondientes al hongo *Rhizopus arrhizus* se emplearon como grupo externo (*outgroup*).

4. Resultados

4.1 Aspectos filogenéticos de levaduras consumidoras de xilosa

Las especies de levaduras *non-Saccharomyces* que se aislaron por el grupo de investigación y que fueron seleccionadas para su caracterización en este trabajo (Tabla 7), han sido previamente descritas como capaces de crecer en xilosa en análisis taxonómicos (Kurtzman et al., 2011). En un estudio de *screening* anterior, las ocho levaduras no convencionales demostraron un desempeño superior al de otros aislamientos cuando se cultivaron en xilosa como único sustrato. Sin embargo, el conocimiento detallado sobre el metabolismo de dicha pentosa en géneros como *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Naganishia* y *Yamadazyma* continúa siendo limitado.

En este sentido, resultó pertinente abordar en primer lugar, desde una perspectiva evolutiva, las relaciones filogenéticas entre los géneros que comprenden las levaduras estudiadas y la evolución de las enzimas clave del metabolismo de la xilosa, XR y XDH (Figura 38). De los ocho géneros de levaduras, siete correspondieron al filo *Ascomycota* (*Yamadazyma*, *Meyerozyma*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Scheffersomyces* y *Spathaspora*), mientras que *Naganishia* perteneció al filo *Basidiomycota* y se ubicó en un clado distinto dentro del árbol filogenético (Figura 38A). Entre las ascomicotas, todas las levaduras analizadas correspondieron al subfilo Saccharomycotina. Algunas de ellas se pudieron diferenciar en el clado CUG-Ser (Figura 38A; resaltadas en verde), caracterizado por el uso de un codon alternativo que traduce CUG como serina en lugar del aminoácido canónico leucina (Riley et al., 2016). Dentro de este grupo, las especies de *Yamadazyma* se relacionaron más estrechamente con *Sp. passalidarum* y, junto con *Sc. stipitis*, formaron un clado separado de las especies de *Meyerozyma*, que se agruparon juntas (Figura 38A). Por su parte, *K. marxianus* se relacionó filogenéticamente con *S. cerevisiae*, conformando un subgrupo diferenciado. Ambas levaduras pertenecen a la familia Saccharomycetaceae (Figura 38A).

La cercanía filogenética observada entre los géneros también se conservó en las secuencias de aminoácidos de las enzimas XR y XDH (Figura 38B y 38C). En el caso peculiar de *Sp. passalidarum*, se han identificado dos genes que codifican para la enzima XR: *XYL1.1*, dependiente de NADPH, y *XYL1.2*, con mayor afinidad por NADH sobre NADPH (Cadete et al., 2016). Esta característica confiere a *Sp.*

passalidarum una mayor eficiencia en la fermentación de xilosa a etanol al evitar el desbalance de cofactores típico de la vía XR/XDH (Cadete et al., 2016). En este análisis, *XYL1.2* se agrupó filogenéticamente con *XYL1* de *Sc. stipitis*, cuya proteína también acepta ambos cofactores, lo cual podría representar una adaptación funcional específica de la especie dentro de un clado relacionado. Ambas levaduras se consideran como las más eficientes en la fermentación de xilosa a etanol entre los géneros que cubren los demás clados filogenéticos. En cambio, las enzimas XR y XDH de las especies de *Meyerozyma*, reportadas habitualmente por su tendencia a acumular xilitol, se agruparon juntas y separadas evolutivamente de *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*. Aunque *Pachysolen tannophilus* también se ha reportado por su habilidad de producir etanol usando xilosa, sus enzimas se posicionaron separadamente de las especies fermentadoras mencionadas (Figura 38B y 38C). Cabe destacar que este análisis se basó en alineamientos de secuencias globales y no en sitios activos o motivos específicos de las enzimas, por lo que la posición filogenética reflejaría relaciones evolutivas generales. Además, la capacidad de metabolizar xilosa y dirigirla hacia la producción de etanol no estaría asociada únicamente con el posicionamiento de una especie dentro de un clado determinado, ni con la mera presencia de los genes *XYL* (Nalabothu et al., 2023).

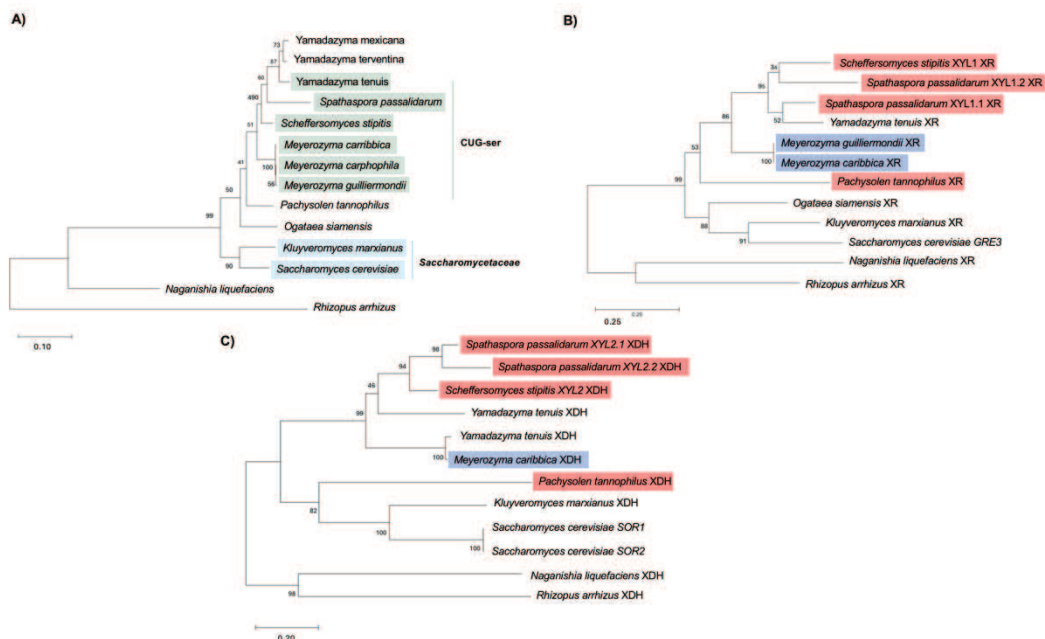


Figura 38. Relaciones evolutivas de levaduras consumidoras de xilosa. Se muestra un análisis filogenético basado en secuencias de ADN de las regiones ITS/D1-D2 (A) y comparaciones evolutivas de las secuencias de aminoácidos de las enzimas XR (B) y XDH (C). *Saccharomyces cerevisiae* codifica para la sorbitol deshidrogenasa (*SOR1* y *SOR2*), homóloga a XDH, y la aldosa reductasa *GRE3*, homóloga a XR de las levaduras no convencionales. Las especies conocidas por fermentar la xilosa a etanol se resaltan en rojo, mientras que las asociadas a la producción de xilitol se muestran en azul. Los valores de bootstrap, obtenidos a partir de 1,000 repeticiones, se indican en las ramas del árbol.

Las diferencias observadas a nivel filogenético sugieren adaptaciones metabólicas particulares de cada especie, las cuales fueron examinadas en ensayos de fermentación considerando la disponibilidad de oxígeno como un factor modulador de su metabolismo.

4.2 Impacto de la aireación en el metabolismo de xilosa

El catabolismo de la xilosa por levaduras requiere de condiciones específicas, donde la oxigenación y la temperatura se reconocen como factores determinantes (Signori et al., 2014; Veras et al., 2017; Barros et al., 2024). Condiciones severas de limitación de oxígeno generalmente no favorecen el crecimiento ni el consumo significativo de xilosa, mientras que la producción de etanol a partir de dicho sustrato suele asociarse con condiciones micro aeróbicas (Silva et al., 2012). Por estos motivos, se decidió evitar los cultivos estrictamente anaerobios y comparar el desempeño de las especies en tres niveles de oxigenación: condiciones de alta de aireación (reactores aireados), disponibilidad moderada de oxígeno (70% HS) y disponibilidad reducida de oxígeno (40% HS). Por otra parte, se seleccionó una concentración inicial de xilosa de 10 g/L con el fin de caracterizar y comparar de manera efectiva los perfiles de utilización de xilosa a lo largo del tiempo y evitar limitaciones asociadas con la inhibición por producto.

En general, el desempeño de las diferentes levaduras varió en función de la configuración del reactor. Los gráficos de caja de los parámetros cinéticos (Figura 39) revelaron una clara tendencia general asociada al nivel de oxigenación. En condiciones de aireación alta se observó el mayor consumo de xilosa (parámetro ΔS ; Figura 39C) y la mayor formación de biomasa (parámetro ΔOD_{600nm} ; Figura 39A), lo que coincide con un metabolismo respiratorio de la xilosa. La disponibilidad intermedia (70% HS) y reducida de oxígeno (40% HS) resultaron en desempeños inferiores, sobre todo en lo que refiere al crecimiento celular (Figura 39A). En particular, la reducción del espacio de cabeza disponible de 70% a 40% provocó una disminución significativa tanto en las velocidades específicas máximas de crecimiento (μ_{max}) como en la biomasa final

acumulada, lo que sugiere que el aporte de oxígeno se restringe al aumentar el volumen del medio en los reactores.

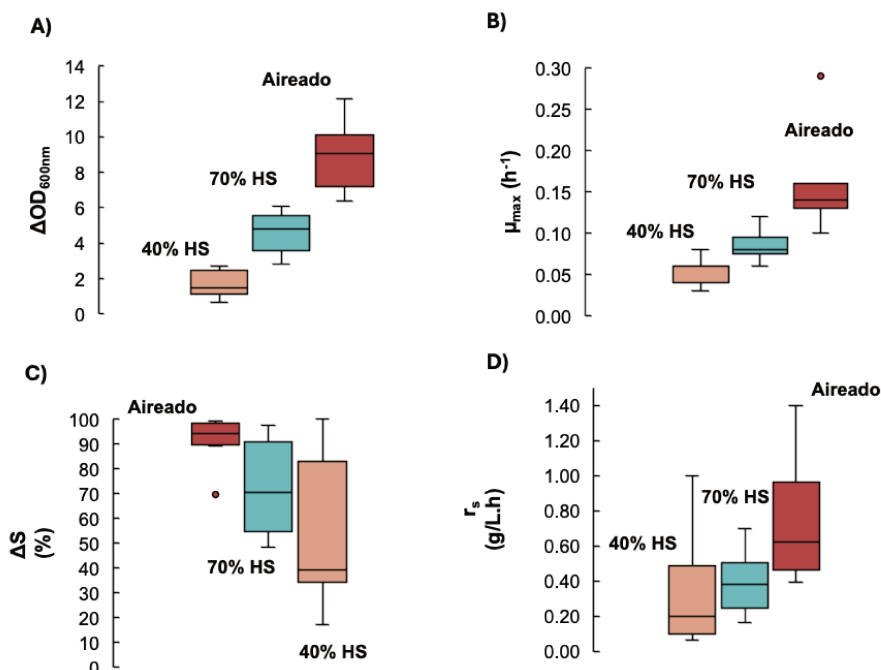


Figura 39. Tendencia general del efecto de la aireación en el desempeño de levaduras cultivadas con xilosa en tres condiciones: reactor aireado (aireación alta), 70% HS (aireación moderada) y 40% HS (aireación reducida). ΔS , consumo total de xilosa; r_s , velocidad máxima de consumo de xilosa; μ_{max} , velocidad específica de crecimiento máxima; ΔOD_{600nm} , incremento final en la densidad óptica (biomasa acumulada). Resultados adaptados de Bolzico et al. (2024).

4.2.1 Comparación de los perfiles de crecimiento y de consumo de xilosa

Se observaron diferencias en los perfiles cinéticos de crecimiento y de utilización de xilosa en función de la especie y de la condición experimental (Figura 40). En los reactores donde se suministró aireación constante, *Sp. passalidarum* fue la especie que más rápido creció con xilosa, a una tasa de $0,29 h^{-1}$. Los valores de μ_{max} para las demás especies cultivadas en esta condición variaron entre $0,10 h^{-1}$ para *M. guilliermondii* hasta $0,16 h^{-1}$ para *Yamadazyma* sp. y *S. cerevisiae* TMB3400 (Figura 41).

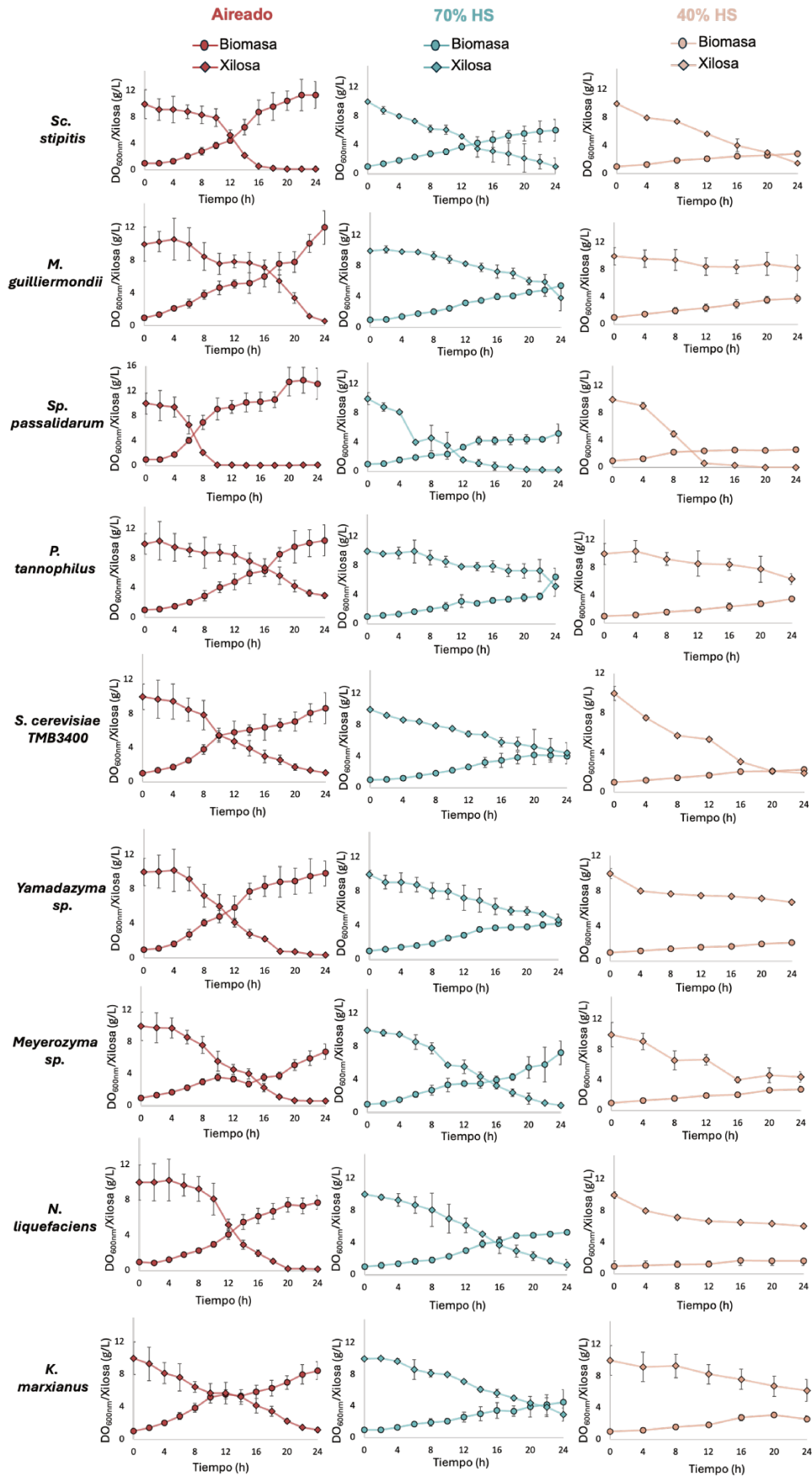


Figura 40. Perfiles de crecimiento (OD_{600nm}) y de consumo de xilosa de las nueve especies de levadura en tres condiciones de aireación: aireado (alta), 70% HS (intermedia) y 40% HS (reducida). Resultados adaptados de Bolzico et al. (2024).

Al suspender el suministro externo de aire, las especies mostraron un crecimiento más lento en la condición 70% HS (aireación moderada) y aún más reducido en la condición 40% HS (aireación restringida) (Figuras 40 y 41). La excepción fue *Meyerozyma* sp., que creció con tasas similares tanto durante el aporte de oxígeno como en la condición 70% HS (Figura 41). Por su parte, *Sc. stipitis*, *Sp. passalidarum*, *P. tannophilus* y *K. marxianus* alcanzaron tasas de crecimiento comparables en los reactores 70% HS y 40% HS (Figura 41). Entre todas las especies, el valor más alto de μ_{\max} ($0,08 \text{ h}^{-1}$) cuando la oxigenación fue la más limitada (40% HS) correspondió a *Sp. passalidarum* (Figura 41).

En comparación con los reactores aireados, la biomasa final acumulada fue de dos a tres órdenes de magnitud menor en reactores 70% HS, y de cuatro a nueve veces menor en los reactores con 40% HS (datos de $\Delta\text{DO}_{600\text{nm}}$ en Tabla 1 del Apéndice III).

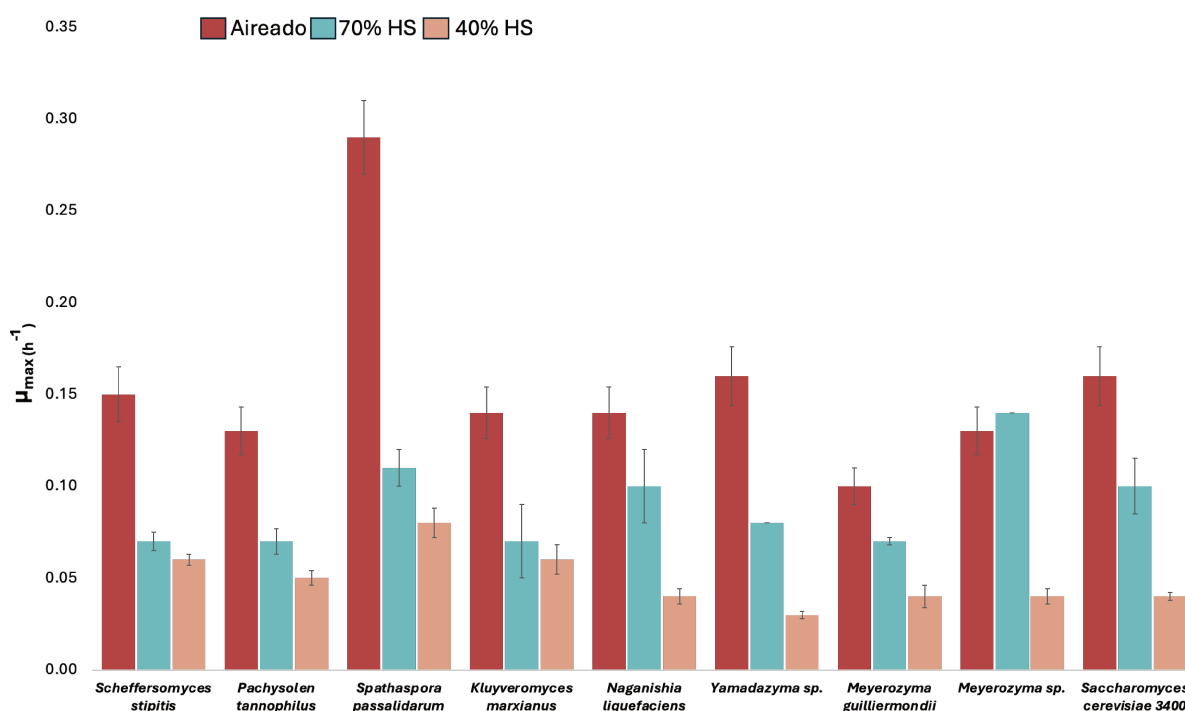


Figura 41. Tasas de crecimiento específicas (μ_{\max}) de las levaduras analizadas durante tres condiciones de aireación. Las cepas se cultivaron en medio rico con 10 g/L de xilosa como única fuente de carbono en reactores con aireación constante (aireado) o con diferente volumen de medio, correspondientes a 70% HS (aireación moderada; 30 mL de medio) y 40% HS (aireación reducida; 60 mL de medio).

Una mayor oxigenación (reactores aireados) favoreció el consumo de xilosa en la mayoría de las especies analizadas, reflejándose en una utilización neta del azúcar entre el 90 y 100% (Figura 40; Tabla 2 del Apéndice III para los valores de ΔS). *P.*

tannophilus constituyó un caso particular, ya que no finalizó el consumo de xilosa en 24 h durante el cultivo aireado (Figura 40). Bajo la condición de oxigenación más elevada, las levaduras exhibieron también la utilización de xilosa más rápida, con los valores superiores de r_s (Figura 42). Se registraron excepciones para *K. marxianus*, *Meyerozyma* sp. y *S. cerevisiae* TMB3400, cuyas tasas de consumo no se vieron considerablemente afectadas en aquellas condiciones con oxigenación más restrictivas (Figura 42). Al mismo tiempo, dichas levaduras registraron los valores más bajos de r_s en reactores aireados (Figura 42).

Durante la provisión de oxígeno, *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis* fueron las especies más rápidas en consumir la totalidad del azúcar, tras 10 y 18 h de comenzado el cultivo, respectivamente (Figura 40). En cambio, *K. marxianus* usó la xilosa a la velocidad más reducida en dicha condición, aunque sin manifestar fase lag o de adaptación detectable al comienzo del cultivo (Figura 40).

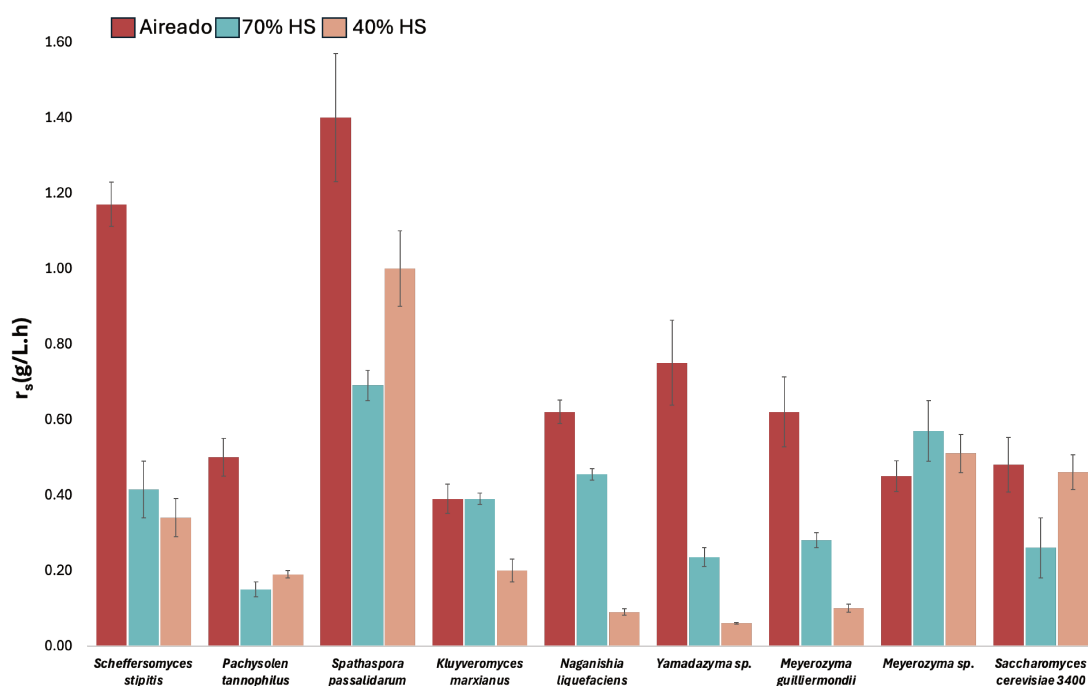


Figura 42. Tasas de consumo de xilosa (r_s) de las levaduras estudiadas en las tres condiciones de aireación. Las cepas se cultivaron en medio rico con 10 g/L de xilosa como única fuente de carbono en reactores con aireación constante (aireado) o con diferente volumen de medio, correspondientes a 70% HS (aireación moderada; 30 mL de medio) y 40% HS (aireación reducida; 60 mL de medio).

La levadura *Sp. passalidarum* se destacó frente a las demás especies por presentar las velocidades de consumo máximas en las tres condiciones de cultivo evaluadas, alcanzando cerca del 100% de utilización de la xilosa en todos los casos, incluso en el cultivo con oxigenación más restringida (Figura 40 y 42). En esta condición (40% HS),

especies como *P. tannophilus*, *K. marxianus*, *Naganishia liquefaciens*, *Yamadazyma* sp. y *M. guilliermondii* presentaron un consumo significativamente limitado, que no superó el 40% al aportar 10 g/L de xilosa inicial (Tabla 2 del Apéndice III). En dicho reactor, las cinéticas de consumo de sustrato se ralentizaron y las curvas alcanzaron una meseta hacia el final, con acumulación considerable de xilosa residual (Figura 40; 40% HS). En este sentido, las especies más afectadas fueron *M. guilliermondii*, *N. liquefaciens* y *Yamadazyma* sp. (Figura 40; 40% HS). En cambio, *Sp. passalidarum*, *Sc. stipitis* y *S. cerevisiae* TMB3400 fueron más robustas en términos de rapidez y utilización de xilosa ante la limitación de oxígeno (Figura 40).

4.2.2 Comparación de los perfiles de acumulación de etanol y de xilitol

La producción de etanol y/o xilitol—los principales intermediarios del catabolismo de la xilosa—se vio afectada por la especie en cuestión y por los niveles de oxigenación, los cuales dependían de la configuración de los reactores (Figura 43). La mayoría de las especies metabolizó la xilosa principalmente por la vía respiratoria en reactores aireados, favoreciendo la proliferación celular. Sin embargo, algunas fermentaron dicho azúcar. Concretamente, *Sp. passalidarum* produjo etanol en estas condiciones con un rendimiento de $0,12 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$. Al contrario, las especies *Meyerozyma* sp., *N. liquefaciens*, *M. guilliermondii* y *Yamadazyma* sp, mostraron un patrón peculiar del metabolismo de xilosa en alta oxigenación, caracterizado por la acumulación predominante de xilitol (Figura 43).

Las levaduras más eficientes en la fermentación de xilosa a etanol fueron *Sp. passalidarum*, *Sc. stipitis*, *P. tannophilus* y la cepa recombinante *S. cerevisiae* TMB3400. En estas especies, la producción de xilitol fue mínima o indetectable en cultivos aireados, mientras que la limitación de oxígeno favoreció el incremento de la producción de etanol (Figura 43). En particular, se obtuvieron los rendimientos más altos de etanol cuando dichas especies se cultivaron en la condición 40% HS (Figura 43; Tabla 3 del Apéndice III). Este comportamiento fue coherente con la limitada producción de biomasa y con un ambiente de oxigenación más restrictivo en los reactores con menos espacio de cabeza. Entre las levaduras mencionadas, *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis* se distinguieron por su desempeño fermentativo en los reactores 40% HS (Figura 44), con productividades y rendimientos máximos de $0,25 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$ y $0,50 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$ para *Sp. passalidarum*, y de $0,17 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$ y $0,49 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$ para *Sc. stipitis*.

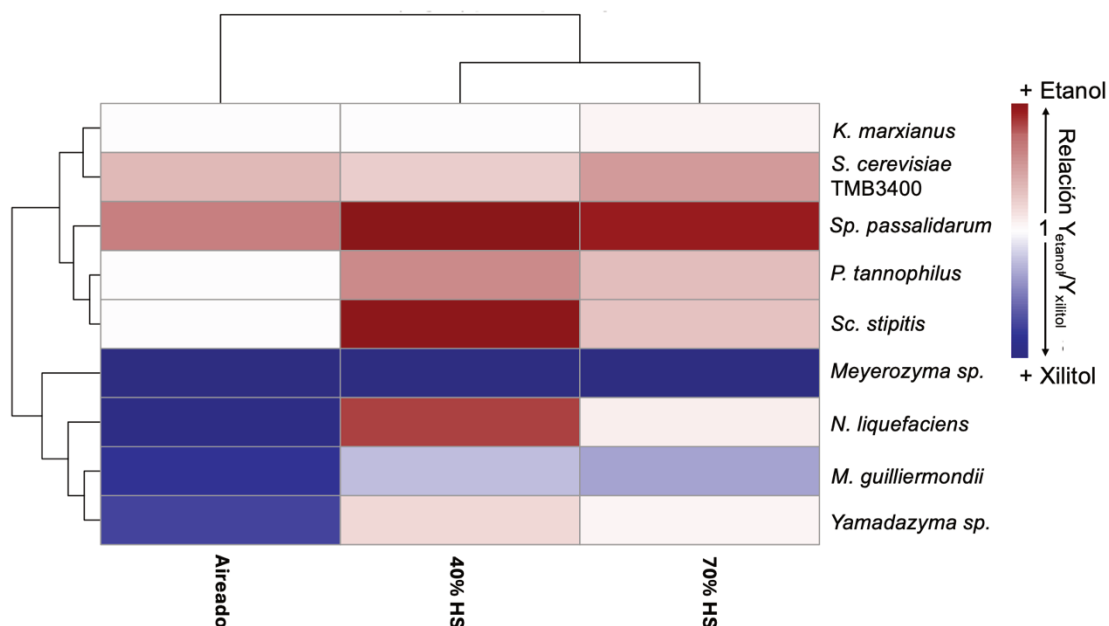


Figura 43. Diferenciación de las especies de levaduras en cuanto a su capacidad productora de etanol y/o xilitol, en función de los niveles de oxigenación evaluados. Heatmap basado en la proporción de los rendimientos $Y_{\text{etanol}} (g_{\text{etanol}}/g_{\text{xilosa}})/Y_{\text{xilitol}} (g_{\text{xilitol}}/g_{\text{xilosa}})$ de las nueve especies cultivadas en las tres condiciones de oxigenación: reactores aireados (aireación alta), 70% HS (aireación intermedia) y 40% HS (aireación reducida). La intensidad del color se corresponde con la magnitud del *ratio*, según la escala mostrada a la derecha: azul indica predominio de xilitol y rojo predominio de etanol, con los tonos más intensos representativos de un mayor rendimiento de cada metabolito. Los cuadrados blancos indican casos donde no predomina ninguno de los metabolitos o donde la producción de uno de ellos es mínima. Los datos complementarios se muestran en la Tabla 3 del Apéndice III.

En comparación, *S. cerevisiae* TMB3400, modificada genéticamente con la vía XR/XDH de *Sc. stipitis*, acumuló más xilitol que las especies fermentadoras nativas en condiciones de oxígeno limitante (Tabla 3 del Apéndice III) y su rendimiento en etanol en la condición 40% HS fue inferior ($0.39 g_{\text{etanol}}/g_{\text{xilosa}}$). No obstante, alcanzó la cantidad máxima de etanol en un tiempo menor (Figura 44).

En contraste con las especies fermentadoras de xilosa eficientes, *N. liquefaciens* y *Yamadazyma* sp.—que acumularon xilitol durante alta disponibilidad de oxígeno (Figura 43)—, generaron etanol en cultivos sin aireación, pero con productividades desfavorables (alrededor de $0,05 g_{\text{etanol}}/L.h$) y cantidades reducidas de etanol (Figura 44). La especie *K. marxianus* también dirigió la xilosa a etanol, pero con una productividad mínima ($0,06 g_{\text{etanol}}/L.h$), acumulando al mismo tiempo cantidades similares de xilitol en cultivos 40% HS con aireación reducida (Tabla III del Apéndice III).

Dentro del grupo de especies productoras de xilitol (Figura 43), *Meyerozyma* sp. y *M. guilliermondii* se diferenciaron de *N. liquefaciens* y *Yamadazyma* sp. en no rendir cantidades detectables de etanol, generando mayoritariamente xilitol. Curiosamente, las dos especies aisladas de efluentes de curtiembre, *Meyerozyma* sp. y *N. liquefaciens*,

mostraron los rendimientos más altos de xilitol y también los valores más bajos de producción de biomasa cuando se suministró oxígeno al reactor (Tabla 2 del Apéndice III).

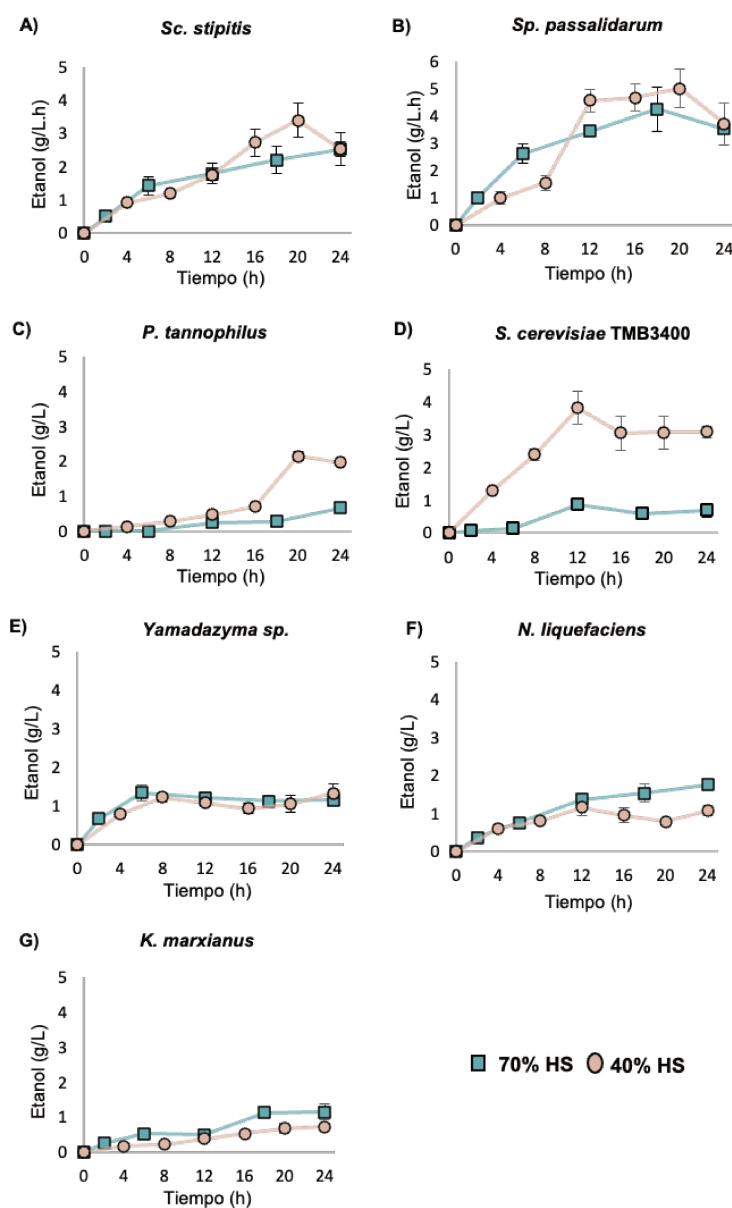


Figura 44. La condición de aireación restringida (40% HS) incrementa la producción de etanol a partir de xilosa en las levaduras fermentadoras *Sp. passalidarum*, *Sc. stipitis*, *P. tannophilus* y *S. cerevisiae* TMB3400. En *K. marxianus*, *Yamadazyma sp.* y *Naganishia sp.* la fermentación a etanol es menos eficiente. Las cinéticas de producción de etanol se determinaron en cultivos no aireados con diferente espacio de cabeza (HS): 70% y 40%. Resultados adaptados de Bolzico et al. (2024).

La levadura *Meyerozyma sp.* registró los mayores rendimientos de este metabolito en las tres condiciones evaluadas (Figura 43), sin un impacto evidente de la oxigenación, con valores en torno a 0,46 g_{xilitol}/g_{xilosa}. En cambio, en *M. guilliermondii* los rendimientos

de xilitol disminuyeron conforme se restringió la aireación (Figura 43; Tabla 3 del Apéndice III).

En general, el uso de xilosa se ve impactado por la oxigenación, aunque en mayor o menor medida según la especie. Las levaduras no convencionales más eficientes en la producción de etanol, como *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*, logran un mejor consumo de xilosa en reactores con oxigenación limitada. En otras especies, sobre todo en aquellas con habilidad fermentativa escasa o que redirigen el metabolismo principalmente hacia la acumulación de xilitol, la restricción de oxígeno compromete el consumo. En esta especie, la asimilación de xilosa mejora notoriamente en condiciones que favorecen la disponibilidad de oxígeno.

4.3 Impacto del glicerol como co-sustrato del metabolismo de xilosa

El estudio del co-metabolismo de xilosa y glicerol en levaduras no convencionales representa un enfoque interesante para el aprovechamiento de fuentes de carbono alternativas en bioprocesos industriales. En base a esto, se realizaron ensayos exploratorios para evaluar el impacto del glicerol en el desempeño fermentativo, considerando su influencia en la asimilación de xilosa y en la formación de intermediarios metabólicos. Los ensayos con glicerol como único sustrato y en mezclas con xilosa se llevaron a cabo en reactores con aireación moderada (70% HS) a dos temperaturas, 30 °C y 37 °C. Las especies analizadas fueron las fermentadoras de xilosa *Sp. passalidarum*, *Sc. stipitis* y *P. tannophilus*, y la levadura *K. marxianus*.

Todas las levaduras evaluadas fueron capaces de utilizar el glicerol como única fuente de carbono en las condiciones establecidas, con excepción de *Sc. stipitis*, la cual no consumió glicerol a 30 °C en un período de 48 h (Figura 45). Solo cuando *Sc. stipitis* se cultivó a una temperatura más elevada, de 37°C, se permitió el consumo de glicerol (Figura 46). Dicho incremento en la temperatura del cultivo también favoreció la utilización de glicerol por parte de *K. marxianus* (Figura 46). *Sp. passalidarum* y *P. tannophilus* fueron las levaduras con mayor capacidad de asimilación de glicerol, con consumos de entre 80 y 100%, respectivamente, en 48 h. Mientras que *Sp. passalidarum* redirigió el glicerol principalmente hacia la formación de biomasa, *P. tannophilus* lo fermentó con un rendimiento de etanol observado de 0,24 g_{etanol}/g_{glicerol}, siendo la única especie capaz de llevar a cabo una fermentación alcohólica productiva (Figura 47A).

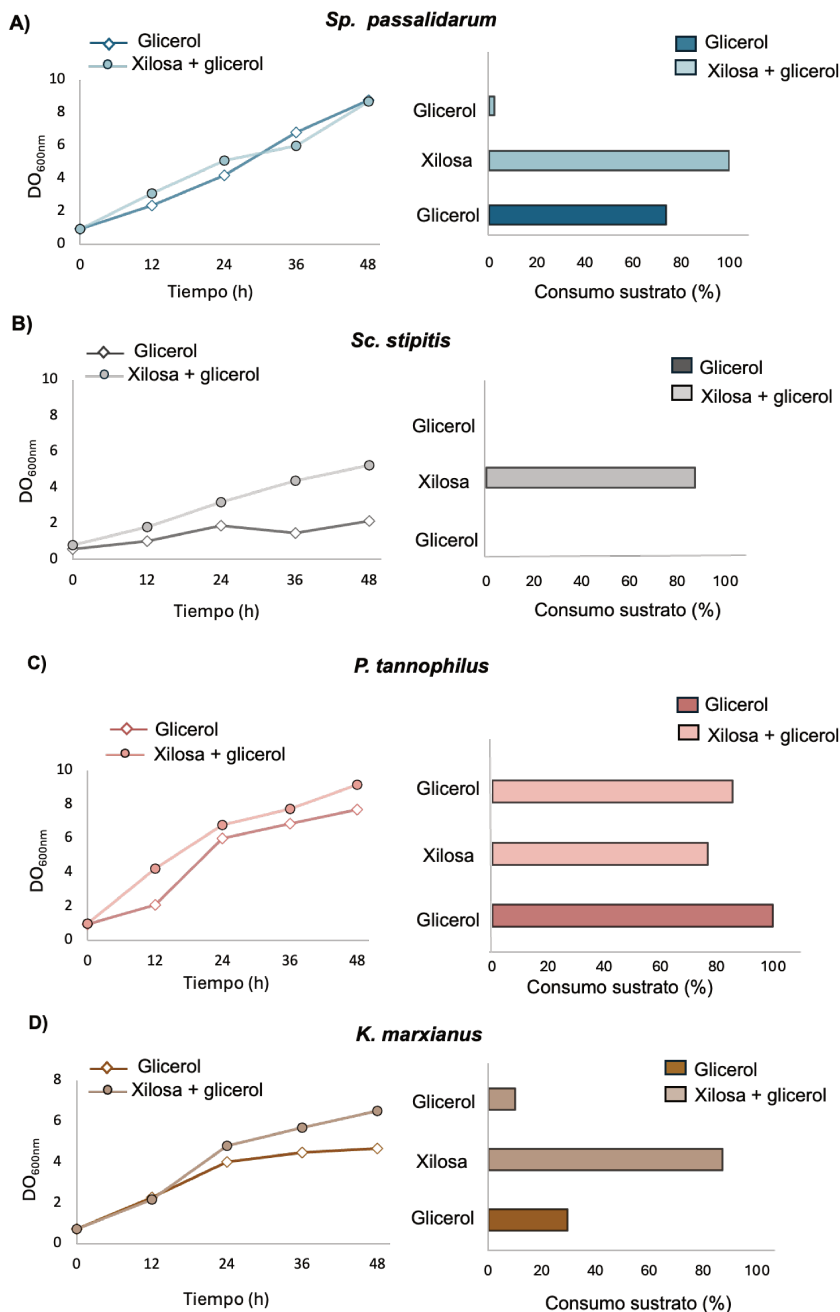


Figura 45. Utilización de xilosa y glicerol por *Spathaspora passalidarum* (A), *Scheffersomyces stipitis* (B), *Pachysolen tannophilus* (C) y *Kluyveromyces marxianus* (D). Las levaduras se cultivaron en reactores agitados con aireación moderada (70%HS) suplementados con 10 g/L de glicerol como única fuente de carbono (Glicerol) o con una mezcla de 10 g/L de xilosa y 10 g/L de glicerol (Xilosa + glicerol) a 30°C.

A nivel global, la adición de glicerol como co-sustrato de la xilosa no mejoró los rendimientos de etanol (Figura 47). Ninguna de las especies presentó un aumento en la producción de este metabolito en medios que contienen ambas fuentes de carbono, lo que sugiere un efecto no sinérgico de la combinación analizada en la fermentación alcohólica. Cuando la xilosa estaba presente en el medio de cultivo, *Sp. passalidarum* no consumió glicerol ni a 30°C ni a 37 °C, originando únicamente etanol a partir de la

xilosa (Figuras 45A , Figura 46A y Figura 47). *P. tannophilus* fue la única especie capaz de utilizar cantidades similares de ambos sustratos presentes en el medio mixto, aunque con un rendimiento en etanol menor que cuando fermentaba el glicerol de manera exclusiva (Figura 47). En cambio, la presencia simultánea de glicerol y xilosa fomentó la formación de xilitol, siendo este efecto especialmente marcado en las especies *Sc. stipitis* y *K. marxianus* a 37°C (Figura 47).

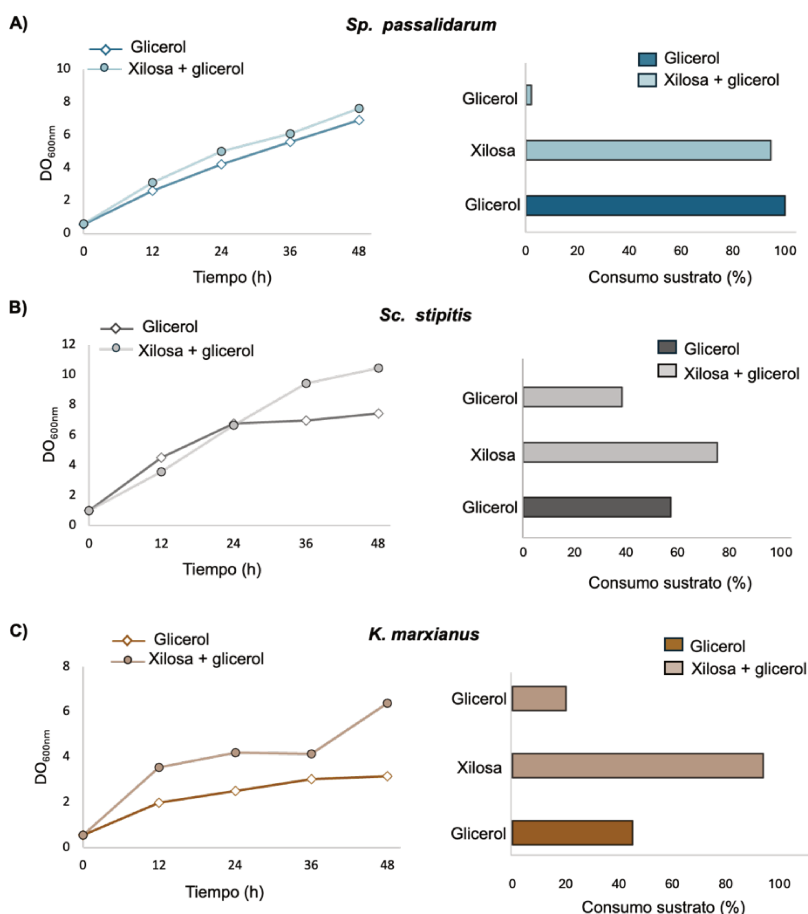


Figura 46. Un incremento en la temperatura favorece el consumo de glicerol por *Sp. passalidarum* (A), *Sc. stipitis* (B) y *K. marxianus* (C). En *Sp. passalidarum*, la utilización de glicerol mejora cuando se usa como único sustrato, mientras que en *Sc. stipitis* y *K. marxianus* también en se observa en mezcla con xilosa. Las especies se cultivaron en reactores agitados con aireación moderada (70%HS) suplementados con 10 g/L de glicerol como única fuente de carbono (Glicerol) o con una mezcla de 10 g/L de xilosa y 10 g/L de glicerol (Xilosa + glicerol) a 37 °C.

El cambio de temperatura de 30 °C a 37 °C modificó el metabolismo de la xilosa y del glicerol en las especies examinadas, con un impacto a nivel de los intermediarios asociados. En *Sp. passalidarum*, la incubación a 37 °C redujo el rendimiento de etanol a partir de xilosa cerca de la mitad (Figura 47C) y en *P. tannophilus* una reducción similar con glicerol pudo ser observada (Figura 47A). En *Sc. stipitis*, la producción de etanol

disminuyó en paralelo con un aumento del xilitol, mientras que en *K. marxianus* prácticamente no se detectó etanol utilizando xilosa a la temperatura más elevada (Figura 47).

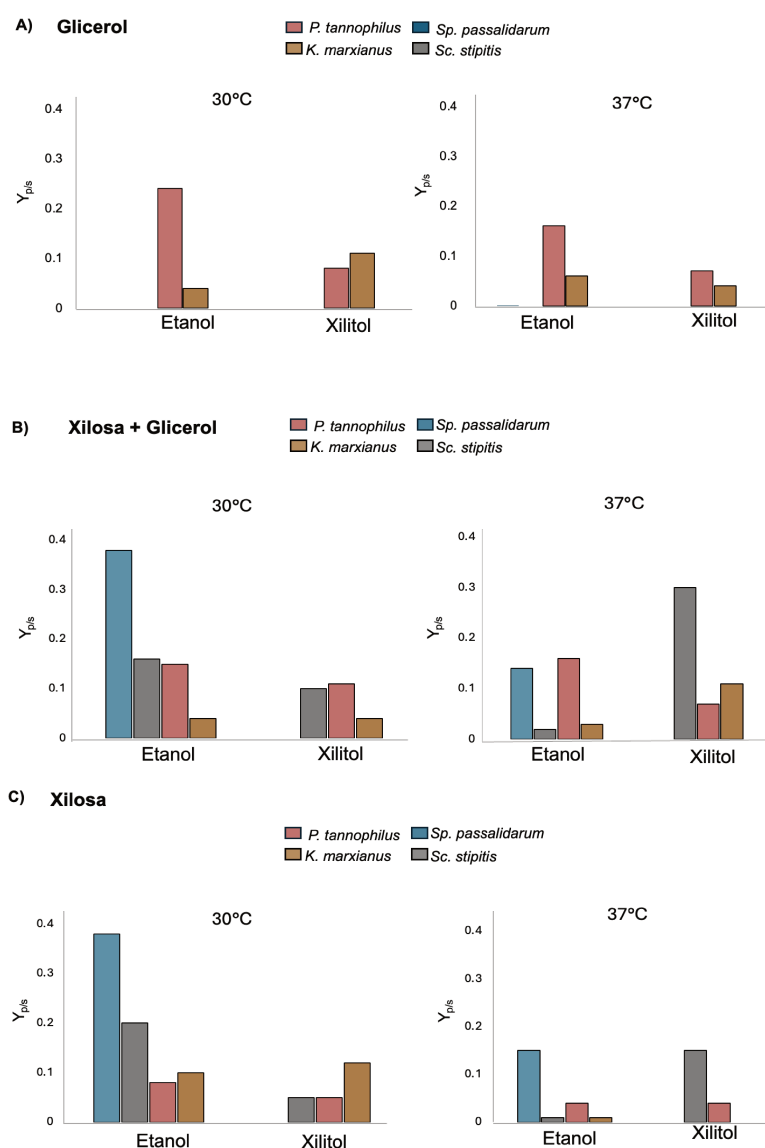


Figura 47. Rendimientos de etanol y xilitol ($Y_{p/s}$) obtenidos en reactores suplementados con (A) glicerol como única fuente de carbono, (B) mezcla de xilosa y glicerol, y (C) xilosa como único sustrato. Se emplearon 10 g/L de las fuentes de carbono en todas las condiciones. Las levaduras fueron cultivadas a 30 °C y 37 °C bajo condiciones de aireación moderada (70 %HS).

4.4 Impacto del hidrolizado lignocelulósico en la fermentación

Si bien los ensayos de caracterización anteriores se realizaron en medio rico, la fisiología y el comportamiento de las especies tienden a variar en medios

lignocelulósicos reales, los cuales son más complejos y contienen compuestos capaces de afectar su desempeño. La levadura de *Sp. passalidarum* y las levaduras industriales *S. bayanus* y *S. cerevisiae* var. Ethanol Red fueron evaluadas en hidrolizados lignocelulósicos provenientes de la cascarilla de soja, en cultivos únicos y mixtos de *Sp. passalidarum* y *S. bayanus*, como se muestra a continuación.

4.4.1 Aplicación de levaduras industriales de *Saccharomyces*

Se fermentó la glucosa liberada tras un pretratamiento ácido seguido de la hidrólisis enzimática de la celulosa, utilizando cascarilla de soja como material de partida. El método reportado por Gil-Rolón et al. (2023) se optimizó para maximizar la liberación de glucosa (aproximadamente 70 g/L), lograr una solubilización de la hemicelulosa—que contiene la fracción de azúcares pentosas—de alrededor del 90 % y reducir la concentración de furfural y HMF.

Ambas cepas industriales, *S. cerevisiae* var. Ethanol Red y *S. bayanus*, mostraron una alta eficiencia en el consumo de glucosa derivada de la fracción celulósica de la cascarilla de soja. *S. cerevisiae* var. Ethanol Red presentó un desempeño superior, consumiendo el 100 % de la glucosa liberada en 10 h (Figura 48), con una tasa máxima de aproximadamente 8,60 g/L.h. Por su parte, *S. bayanus* completó el consumo de la glucosa en 24 h, a una velocidad máxima cercana a 6,40 g/L.h (Tabla 4 del Apéndice III). Ninguna de las cepas presentó un tiempo de latencia apreciable al inicio de la fermentación (Figura 48), lo que sugiere una adaptación casi instantánea de las levaduras a las condiciones del hidrolizado lignocelulósico. Los perfiles de producción de etanol fueron igualmente favorables, alcanzándose las concentraciones superiores a las 12 h de iniciada la fermentación (Figura 48). Ambas cepas presentaron rendimientos de etanol cercanos al 96 % del valor teórico máximo (0,51 g_{etanol}/g_{glucosa}) (Tabla 4 del Apéndice III).

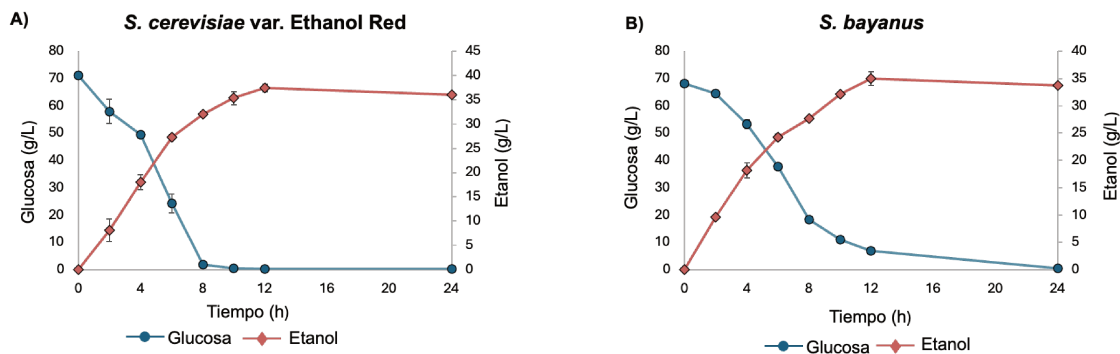


Figura 48. Fermentación de la glucosa en hidrolizados lignocelulósicos de cascarilla de soja por las levaduras industriales *Saccharomyces cerevisiae* var. Ethanol red (A) y *Saccharomyces bayanus* (B).

A pesar de la presencia de compuestos potencialmente inhibitorios en el medio, y sin necesidad de suplementar el mismo con fuentes adicionales de nitrógeno, las cepas industriales *S. cerevisiae* Ethanol Red y *S. bayanus* mostraron un elevado *fitness* en sustratos biomásicos de cascarilla de soja. Para su consideración en el desarrollo de un bioproceso de obtención de etanol 2G, futuros estudios deberían orientarse a la ingeniería metabólica de las cepas de *Saccharomyces* para lograr una utilización eficiente de las pentosas, ya que esto es necesario para el aprovechamiento global de los azúcares C5 y C6 presentes en el hidrolizado. Para integrar la utilización de xilosa, otra estrategia evaluada en este trabajo consistió en inocular la levadura *S. bayanus* junto con *Sp. passalidarum*, los resultados se muestran a continuación.

4.4.2 Desempeño de *Sp. passalidarum* sobre hidrolizado de cascarilla de soja y co-cultivo con *S. bayanus*

La cascarilla de soja pretratada mediante hidrólisis ácida y posterior sacarificación enzimática se empleó como sustrato para la fermentación de hexosas y pentosas por *Sp. passalidarum* (Figura 49A; Tabla 4 del Apéndice III). En estas condiciones, el comportamiento fermentativo difirió notablemente del observado en el medio control YPXG, que contenía una mezcla similar de glucosa y xilosa (Figura 49B). En el hidrolizado, la glucosa comenzó a consumirse desde las primeras horas de la fermentación, sin un período de latencia observable. La xilosa, en cambio, permaneció sin ser utilizada incluso después del agotamiento de la glucosa, registrado alrededor de las 32 h de cultivo (Figura 49A). Estas observaciones indican que el hidrolizado ofrece condiciones adecuadas para la fermentación de la glucosa, aunque impone una restricción evidente en el caso de la xilosa. El rendimiento en etanol fue inferior en el

hidrolizado, alcanzando $0,28 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$, frente al valor de $0,50 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$ obtenido cuando la xilosa se fermentó en el medio sintético como único azúcar. La imposibilidad de utilizar la xilosa en el hidrolizado durante el tiempo evaluado probablemente se deba a la represión catabólica provocada por la glucosa y al efecto inhibitorio de los compuestos tóxicos que componen el hidrolizado. Este último aspecto parece tener una mayor influencia, ya que se detectó una extensión de la fase lag de 12 h cuando la glucosa ya se había agotado. Además, en condiciones control (medio YPGX), el consumo de xilosa ocurrió casi de manera simultánea con la glucosa, aunque a una tasa menor que la de la hexosa (Figura 49B). Durante 48 horas, se consumió aproximadamente un 75 % de la glucosa disponible ante a un 25 % de la xilosa (Figura 49B). El rendimiento de etanol en estas condiciones fue comparable al obtenido en la fermentación de la glucosa presente en el hidrolizado (Tabla 4 del Apéndice III).

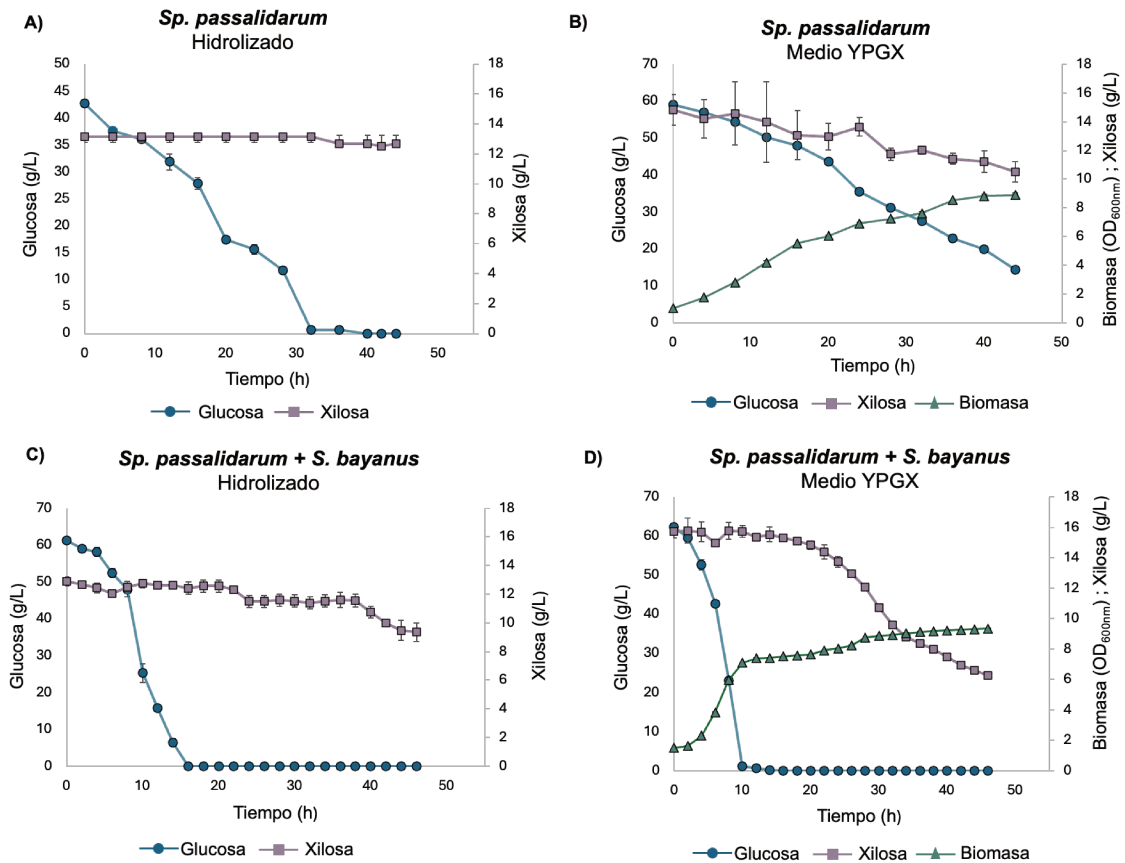


Figura 49. Desempeño fermentativo sobre hidrolizado de cascarilla de soja de *Spathaspora passalidarum* en cultivo puro (A y B) y en co-cultivo con *Saccharomyces bayanus* (C y D). Se muestran los perfiles de consumo de azúcares (glucosa y xilosa) y de producción de biomasa de las levaduras cultivadas en condiciones de oxigenación reducida (40 % HS), en hidrolizados de cascarilla de soja (A y C) y en medio control sintético YPGX (B y D). En el caso de co-cultivos, las especies fueron inoculadas en igual proporción de biomasa inicial (DO_{600nm} de 0,5). Los ensayos se realizaron en duplicados biológicos.

En presencia de un cultivo mixto entre *S. bayanus* y *Sp. passalidarum* en el hidrolizado, la glucosa se consumió con rapidez, probablemente como consecuencia de la robustez y cinética superior de *S. bayanus* (Figura 49C; Tabla 4 del Apéndice III). En este contexto, la utilización de la xilosa por *Sp. passalidarum* se vio favorecida; no obstante, este proceso ocurrió también de manera secuencial y no simultánea con la glucosa (Figura 49C). El retraso de 24 h en el consumo de la xilosa tras acabarse la glucosa podría deberse a una combinación de estreses sobre la actividad metabólica de *Sp. passalidarum*: la elevada concentración de etanol acumulada (casi 30 g/L) durante la fermentación de la hexosa y los efectos inhibitorios de los compuestos del hidrolizado, también observados durante el monocultivo. En el medio YPGX (Figura 49D), donde los inhibidores están ausentes, la glucosa se agotó con anterioridad y la fase de adaptación al consumo de xilosa se acortó significativamente (8 h), consumiéndose cerca del 60% de la xilosa en contraste con el 30% en el hidrolizado. Estas observaciones respaldan uno de los efectos centrales de los inhibidores del hidrolizado en prolongar la fase de latencia para el uso de xilosa durante las fermentaciones. En ambos medios, la alta velocidad de utilización de glucosa podría representar una mayor dominancia de *S. bayanus* durante esta etapa del proceso.

Por último, en sustratos YPGX (Figura 49B y 49D), el co-cultivo mostró un aprovechamiento más eficiente de los azúcares mixtos en comparación con el monocultivo de *Sp. passalidarum*. Aunque el consumo de la hexosa y la pentosa fue secuencial al inocular ambas especies en un mismo reactor, cada una pareció especializarse en un sustrato: *S. bayanus* en glucosa y *Sp. passalidarum* en xilosa. En este escenario, el consumo de la glucosa se completó en 10 h y se utilizó aproximadamente el doble de la xilosa, con una tasa máxima ligeramente superior que en el monocultivo (0,36 g/L.h frente a 0,22 g/L.h). Esto sugiere que, cuando *Sp. passalidarum* metaboliza ambos sustratos por sí sola, lo hace más lentamente, posiblemente debido a la división de recursos metabólicos, mientras que en co-cultivo, luego del agotamiento de la glucosa, se la levadura se concentra en el uso exclusivo de la xilosa.

5. Discusión

5.1 Factores influyentes en el metabolismo de la xilosa

La metabolización natural de la xilosa por levaduras no es una característica que se encuentre restringida a un solo grupo taxonómico, sino que pareciera distribuirse heterogéneamente en la naturaleza entre diversos géneros y especies. Las levaduras nativas capaces de asimilar la xilosa se han asociado con una gran diversidad de hábitats, incluyendo principalmente madera en descomposición, intestinos de insectos, corteza de árboles, frutas y muestras de suelo (Nguyen et al., 2006; Cadete et al., 2016; Wang et al., 2016; Barros et al., 2021). En este trabajo, el repertorio fue ampliado al caracterizar nuevas levaduras previamente aisladas de fuentes poco exploradas, como efluentes de curtiembre (Tabla 7). La adaptación de las especies a entornos específicos, especialmente a sustratos ricos en hemicelulosa, podría indicar cierta especialización de las levaduras en el uso de azúcares pentosas. Sin embargo, los ambientes de aislamiento explicarían solo en parte la existencia de esta característica metabólica, y la filogenia jugaría incluso un papel menor (Opulente et al., 2018; Nalabothu et al., 2023). Esto concuerda con los presentes hallazgos, donde especies aisladas de nichos semejantes, como efluentes de curtiembre, presentan capacidad de metabolizar xilosa a pesar de pertenecer a géneros evolutivamente tan divergentes—*Naganishia* y *Meyerozyma*—.

Por otro lado, estudios previos demostraron que el conjunto completo de los genes *XYL* es necesario, pero no suficiente para garantizar la utilización efectiva de la pentosa (Riley et al., 2016; Nalabothu et al., 2023). La fermentación de xilosa a etanol parece ser un rasgo aún más complejo y poco común entre las levaduras no convencionales, solo adquirido por unas pocas especies (Opulente et al., 2018; Nalabothu et al., 2023). Observaciones anteriores muestran que la duplicación del gen *XYL1* de la enzima XR y las divergencias funcionales entre sus copias—particularmente cuando una de ellas tiene preferencia por cofactores que compensan el desbalance redox—son características determinantes en levaduras capaces de fermentar xilosa (Mayr et al., 2000; Cadete et al., 2016; Nalabothu et al., 2023; Barros et al., 2024). Entre las levaduras analizadas en este trabajo comparativo, ninguna de las especies nativas aisladas, que incluyeron los géneros *Kluyveromyces*, *Yamadazyma*, *Naganishia* y *Meyerozyma*, pudo fermentar la xilosa a etanol con un rendimiento notable, en comparación con especies que se destacan por esta capacidad, como *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*. Un análisis más detallado de los genes *XYL* de estas levaduras podría

constituir un punto de partida clave para dilucidar las limitaciones del metabolismo fermentativo de la xilosa.

Como se mencionó anteriormente, el catabolismo de la pentosa en levaduras es regulado en función de la disponibilidad de oxígeno. Consistente con que muchas de las levaduras que asimilan la xilosa son Crabtree-negativas (Passoth et al., 1996), bajo condiciones de mayor aireación las especies analizadas respiraron la xilosa con formación de biomasa. Conforme se disminuyó la oxigenación al incrementar el volumen del medio, el metabolismo se orientó hacia la fermentación, generándose etanol como subproducto principal en especies como *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*, y xilitol en especies como *Meyerozyma* sp.

La aireación elevada también estimuló el consumo de xilosa, aunque en diferentes grados según la especie considerada. Las levaduras cuya utilización de xilosa se vio más afectada en condiciones de aireación limitante fueron aquellas que, bajo aireación elevada, acumularon mayoritariamente xilitol, como *Yamadazyma* sp., *N. liquefaciens* y *M. guilliermondii*, con excepción de *Meyerozyma* sp. Para estas especies, el aporte de aire mejoró marcadamente la asimilación de xilosa. En cambio, las levaduras con los mejores desempeños fermentativos, como *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*, fueron las más eficaces en asimilar xilosa frente a condiciones de oxigenación más restrictivas. Hallazgos previos también demostraron una tendencia similar en especies relacionadas. Cadete et al. (2016) observaron un mejor uso de la xilosa en cepas de *Sp. passalidarum* en comparación con especies del mismo género productoras de xilitol. Por su parte, Barros et al. (2024) reportaron resultados similares en cuanto a la dependencia del oxígeno en especies acumuladoras de xilitol, como *M. caribbica* y diversas especies cercanas de *Candida*.

En ciertas especies, en especial las que tienden a producir xilitol, la xilosa es reducida a xilitol por una enzima XR que prefiere o utiliza exclusivamente NADPH, mientras que en otras especies existe una XR asociada a NADH. Este último caso se ha correlacionado con una mejor capacidad fermentativa etanológica en especies como *Sp. passalidarum* (Cadete et al., 2016). Como se ha mencionado anteriormente, cuando la XR utiliza NADPH como cofactor en lugar de NADH, se genera un desbalance redox, ya que la enzima XDH que interviene en la reacción siguiente depende estrictamente de NAD^+ (Figura 35). Se cree que este desajuste en la preferencia de cofactores es la causa principal de la acumulación de xilitol, especialmente en condiciones anaeróbicas o de baja disponibilidad de oxígeno, cuando la cadena respiratoria no puede regenerar NAD^+ de manera eficiente (Kotter & Ciriacy, 1993). En casos donde la enzima XR utiliza NADH, se alivia el desequilibrio redox y el flujo metabólico de la xilosa es potenciado (Cadete et al., 2016).

En este trabajo, se detectaron cantidades significativas de xilitol en reactores aireados en las especies *Yamadazyma* sp., *Meyerozyma* sp., *M. guilliermondii* y *N. liquefaciens*. Bajo estas condiciones, el desbalance de cofactores debería compensarse y la oxidación del xilitol por la enzima XDH debería permitirse debido a la disponibilidad de NAD⁺. Estas observaciones sugieren que la teoría del desbalance de cofactores no puede explicar por completo la tendencia a la acumulación de xilitol en ciertas especies, lo que introduce la necesidad de explorar otros factores reguladores asociados. A favor de esta hipótesis, Barros et al. (2024) encontraron que el fenotipo de acumulación de xilitol en una especie del género *Scheffersomyces* se correlacionaba con una disminución en los niveles de expresión del gen *XYL2* de la enzima XDH, antes que una diferencia en el requerimiento de cofactores. En este caso, la velocidad de consumo de xilosa se redujo en condiciones de alta aireación, contrario a lo ocurrido con las levaduras analizadas en este trabajo. Además de considerar la preferencia por cofactores de las enzimas XR y sus actividades, futuros ensayos transcriptómicos deberían centrarse en analizar la expresión diferencial de genes durante distintas condiciones de oxigenación. Este tipo de análisis permitiría identificar no solo cambios en la expresión de genes *XYL*, sino también posibles modulaciones en otras rutas metabólicas implicadas en la regeneración de cofactores. Sumado a esto, estudios de este tipo también podrían revelar si las levaduras implementan cambios a nivel regulatorio o en vías de señalización que podrían facilitar, o no, un uso más eficiente de la xilosa.

5.2 *Sp. passalidarum* y su potencial aplicación en bioprocesos

Los resultados de la presente tesis confirman el estatus de *Sp. passalidarum* como especie distinguida en fermentar la xilosa a etanol, frente a diversos géneros de levaduras evaluados bajo las mismas condiciones experimentales. Esta levadura exhibió los rendimientos y productividades de etanol, así como también las tasas de consumo de xilosa más elevadas en comparación con otras especies nativas eficientes, como *Sc. stipitis*, y con la levadura recombinante *S. cerevisiae* TMB3400. En el escenario más exigente de disponibilidad de oxígeno, *Sp. passalidarum* alcanzó un rendimiento de etanol muy próximo al máximo teórico a partir de la xilosa ($0,51 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$) y agotó dicho sustrato sin observarse una acumulación residual. Los aspectos metabólicos que parecen relacionarse con un mejor rendimiento fermentativo y un uso superior de la xilosa incluyen: i) un metabolismo de la xilosa más equilibrado

desde el punto de vista redox, posibilitado por una XR dependiente de NADH y actividad elevada; ii) una expresión incrementada de los genes de la fase no oxidativa de del ciclo PPP; y iii) un mayor flujo metabólico dirigido hacia la vía PPP, hacia la glicólisis y hacia la ruta etanológica (Long et al., 2012; Veras et al., 2017; Veras et al., 2019; Barros et al., 2024). Resulta sumamente interesante que trabajos futuros se enfocaran también en comprender las rutas regulatorias de *Sp. passalidarum* que coordinan sus capacidades metabólicas y fermentativas, a fin de identificar potenciales blancos genéticos que puedan reconfigurar la respuesta de señalización peculiar observada por *S. cerevisiae* en xilosa.

Un parámetro experimental importante a tener en cuenta en la definición de un bioproceso de fermentación de pentosas es la aireación. En el presente estudio, la configuración que permitió maximizar la producción de etanol por *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis* correspondió a una relación reactor/volumen de medio ($V_{\text{reactor}}:V_{\text{medio}}$) de 1,67 (condición 40% HS), a una temperatura de 35°C (Bolzico et al., 2024). Una proporción similar fue utilizada por Su et al. (2015) para alcanzar una condición experimental de baja aireación y obtener los mayores rendimientos de etanol por *Sp. passalidarum*. La condición descrita en este trabajo (40% HS) podría ser implementada en bioprocesos fermentativos sin necesidad de regular estrictamente la aireación, un punto favorable para la aplicación de levaduras no convencionales.

En cuanto al tipo de sustrato empleado, los medios sintéticos con xilosa como único carbono y con una mezcla de xilosa y glucosa determinaron el desempeño fermentativo óptimo de *Sp. passalidarum* en comparación con el hidrolizado lignocelulósico de cascarilla de soja. En presencia de compuestos inhibidores derivados de los hidrolizados, la fisiología y eficiencia fermentativa de esta especie se ven notablemente comprometidas, tal y como se demostró en este trabajo, así como en los de los autores Hou & Yao (2012) y Lima et al. (2022) empleando bagazo de caña de azúcar. De acuerdo con las observaciones del presente estudio, la sensibilidad de *Sp. passalidarum* al estrés generado por las condiciones del medio se acentúa durante la asimilación de xilosa. El efecto negativo se observó principalmente sobre el uso de dicho azúcar y no sobre la glucosa, lo que sugiere una relación entre la respuesta al estrés inducida y el sustrato metabolizado. Las bases genéticas y moleculares que otorgan ciertos fenotipos de resistencia favorables en presencia de glucosa, pero no en xilosa, deberán investigarse en mayor profundidad. Un estudio muestra que ciertos mecanismos de tolerancia de *Sp. passalidarum* están relacionados con alteraciones en la homeostasis energética y en el balance redox intracelular, provocando una disrupción de la actividad de la ruta glicolítica, de la vía PPP y del ciclo TCA (Lima et al., 2022). Sin embargo, dicho trabajo no diferencia estos efectos entre la glucosa y la xilosa.

Para la aplicación de *Sp. passalidarum* en bioprocesos industriales es preciso optimizar su comportamiento frente a compuestos con efectos tóxicos y superar su reducida tolerancia al etanol (Guzmán et al., 2024). Algunas de las estrategias evaluadas para atenuar estas barreras incluyen la aplicación de cultivos de *Sp. passalidarum* de alta densidad celular inicial (15–30 g/L; Soares et al., 2020), la adaptación evolutiva de las células de esta especie a condiciones de fermentación fisiológicamente más estresantes (Pacheco et al., 2021; Saengphing et al., 2024; Barros et al., 2025) y, a escala de pre-tratamiento, la obtención de hidrolizados con un contenido reducido de productos inhibidores (Martinez-Jimenez et al., 2021).

5.2.1 Cultivos mixtos

La implementación de cultivos mixtos en bioprocesos tiene la ventaja de aprovechar las características metabólicas singulares de cada uno de los microorganismos involucrados, así como potenciales efectos sinérgicos que pueden generarse al cultivarse en un mismo reactor. En la estrategia de co-cultivo entre *S. bayanus* y *Sp. passalidarum* adoptada en el presente trabajo, la presencia de la especie de *Saccharomyces* claramente beneficia la utilización de la xilosa en comparación con el monocultivo de *Sp. passalidarum*. Es probable que esto ocurra a causa de una rápida depleción de la glucosa al inicio de la fermentación. Pese a ello, la etapa de conversión de la xilosa se ve considerablemente demorada en el reactor suplementado con el hidrolizado lignocelulósico, posiblemente como consecuencia de un efecto adverso del medio. Por consiguiente, los aspectos antes mencionados que mejoran la robustez de *Sp. passalidarum* deben ser igualmente contemplados durante el co-cultivo. Otras consideraciones futuras para perfeccionar la estrategia incluyen: i) optimizar la relación entre la cantidad inicial de inóculo de cada levadura; ii) implementar técnicas que permitan monitorear el crecimiento individual de cada especie, como la citometría de flujo combinada con recuento en placa; iii) evaluar diferentes momentos de inoculación de cada levadura (co-cultivo secuencial); iv) asegurar niveles adecuados de nutrientes al momento de consumir la xilosa, o suplementarlos de ser necesario. Por último, también se podrían considerar modelos que describan las dinámicas e interacciones metabólicas de las levaduras involucradas.

5.3 Acoplamiento del glicerol al metabolismo de la xilosa

Se evaluó si el glicerol podía actuar como un sustrato co-metabólico adecuado para acoplarse con la utilización de xilosa y favorecer su catabolismo, mediante el aporte de cofactores reducidos requeridos por la ruta XR/XDH. La hipótesis inicial propuesta fue

que el metabolismo del glicerol incrementaría los pools intracelulares de NADPH y NADH, promoviendo así el flujo metabólico hacia la formación de productos fermentativos. En algunas especies, la enzima GCY del catabolismo del glicerol es dependiente de NADP⁺, lo cual genera NADPH que podría satisfacer la demanda de la XR (Figura 35).

Si bien la ruta fermentativa del glicerol GCY/DAK no es común en *S. cerevisiae*, en otras levaduras parece ser más prominente, como en el caso de *P. tannophilus* (Liu et al., 2013). Esta especie se encuentra entre las pocas levaduras aptas para fermentar glicerol a etanol con rendimientos considerables (Liu et al., 2012), lo cual fue confirmado en este estudio durante condiciones de aireación moderada (70% HS).

Los ensayos con sustratos mixtos revelaron que el glicerol no supone un aporte metabólico compatible con la bioconversión de la xilosa a etanol en levaduras nativas, contrario a lo hipotetizado. En algunas especies, como *Sc. stipitis*, la presencia de glicerol incluso incrementó los niveles de xilitol, lo cual sugiere que los cofactores generados durante catabolismo del glicerol podrían intensificar el desbalance redox, por un exceso de NADPH e insuficiencia de NAD⁺. Con excepción de *P. tannophilus*, que utilizó la xilosa junto con el glicerol en cantidades notables, la mayoría de las levaduras priorizó el consumo de xilosa en medios de cultivos mixtos. *Sp. passalidarum* prácticamente no consumió glicerol, anteponiendo la utilización de xilosa sobre el sustrato adicional. Este comportamiento sugiere fuertemente la existencia de mecanismos regulatorios de represión catabólica ejercidos por la xilosa, los cuales podrían operar a nivel de transporte, de las rutas metabólicas involucradas y/o de la regulación transcripcional de los genes del catabolismo del glicerol.

Otro aspecto destacable es que, con el glicerol como único sustrato, algunas especies como *P. tannophilus* y *K. marxianus* produjeron xilitol, además de etanol. Este comportamiento sugiere que el metabolismo del glicerol puede conectarse, en ciertos puntos, con las rutas de las pentosas, contribuyendo así a la formación de polioles. En efecto, se han reportado cantidades significativas de arabitol durante la fermentación del glicerol en algunas levaduras (Dmytruk et al., 2025).

El hallazgo de que *Sc. stipitis* no consumiera glicerol a 30 °C, pero sí a 37 °C, podría interpretarse como una respuesta al estrés térmico, posiblemente vinculada al mantenimiento del equilibrio redox y a la homeostasis celular. Este aspecto resulta interesante para ser evaluado en mayor detalle en investigaciones futuras que deseen avanzar en el conocimiento de la fisiología de las levaduras no convencionales.

En conjunto, las observaciones indican que el glicerol puede considerarse un co-sustrato de la xilosa en bioprocesos orientados hacia la producción de xilitol,

constituyendo una alternativa más sostenible frente a los métodos de síntesis química de este compuesto.

5.4 Robustez frente a hidrolizados lignocelulósicos

5.4.1 Cepas industriales de *Saccharomyces*

Los ensayos de fermentación de la glucosa en hidrolizados lignocelulósicos con cepas industriales de *Saccharomyces* permiten contemplar un escenario más cercano a procesos industriales para la generación de etanol 2G. Además, la caracterización de cepas más robustas de *S. cerevisiae* suponen un primer paso antes de alterar sus propiedades metabólicas para un uso eficiente de pentosas.

En este trabajo, el proceso de fermentación de la glucosa explorado en cascarilla de soja no detoxificada mediante *S. cerevisiae* var. *Ethanol Red* o *S. bayanus* resultó prometedor. Las levaduras fermentaron de manera robusta la glucosa desde el momento de la inoculación del hidrolizado, sin presentar una fase lag, indicando ausencia o un efecto inhibitorio mínimo sobre su actividad. En línea con este desempeño, los rendimientos de etanol por ambas cepas se encontraron próximos al teórico máximo. Una ventaja relevante del proceso fermentativo es que no fue necesaria la adaptación previa de los inóculos de las levaduras a los hidrolizados de cascarilla, ya que las células se propagaron inicialmente en medio YPD, sin exposición a furfurales u a otros compuestos con potencial toxicidad celular.

Durante el procesamiento de la biomasa de la cascarilla de soja se buscó disminuir la liberación de compuestos inhibidores; en consecuencia, el hidrolizado contenía cantidades cercanas a 100 mg/L de furfural y a 80 mg/L de HMF (Gil-Rolón et al., 2023). En estas condiciones, no es necesario llevar a cabo la modificación genética de las cepas de *Saccharomyces* para incrementar la tolerancia celular al furfural, al HMF y a otros posibles compuestos tóxicos como fenoles o ácidos orgánicos. Esto representa un punto a favor, ya que en algunos casos las estrategias dirigidas a conferir resistencia a múltiples compuestos inhibidores pueden, paralelamente, influenciar negativamente la capacidad de las levaduras de consumir los azúcares presentes (Brandt et al., 2021).

Por otro lado, los hidrolizados de cascarilla de soja parecen proporcionar una cantidad suficiente de nutrientes adecuados para la fermentación de glucosa por las levaduras. En tal sentido, no fue necesario suplementar el hidrolizado con fuentes adicionales de nitrógeno, lo cual representa también un aspecto económico favorable del proceso.

En resumen, los patrones observados ponen de manifiesto el potencial del proceso, teniendo en cuenta la robustez de las cepas industriales utilizadas, en combinación con un pretratamiento y una sacarificación eficientes del material vegetal. No obstante, para que *S. cerevisiae* var. Ethanol Red y *S. bayanus* puedan asimilar pentosas, es necesario recurrir a técnicas de ingeniería genética que introduzcan rutas metabólicas heterólogas y transportadores de pentosas de alta eficiencia.

5.4.2 Levaduras *non-Saccharomyces*

En general, las levaduras *non-Saccharomyces* suelen asociarse con mejores fenotipos de tolerancia que *S. cerevisiae* frente al estrés osmótico, las altas temperaturas y la presencia de compuestos tóxicos (Vasylyshyn et al., 2025). Sin embargo, este último aspecto, en mi opinión, es cuestionable ya que depende de múltiple factores y no debería considerarse una tendencia generalizable. Entre los aspectos más influyentes se encuentran la especie y cepa en cuestión, la composición del hidrolizado, la concentración de los inhibidores presentes, sus efectos sinérgicos que potencian la toxicidad celular, y, sobre todo, los mecanismos moleculares específicos de resistencia que cada especie posee frente a ciertos compuestos (Frounnoon et al., 2025; Yu et al., 2025).

La mayoría de los estudios coinciden en que la obtención de cepas más robustas de levaduras no convencionales, como *Sc. stipitis*, *K. marxianus* y *Sp. passalidarum*, se obtienen mediante estrategias de ALE y/o mutagénesis por UV. La adaptación de cepas a sustratos complejos mejora significativamente su desempeño fermentativo, en contraste con los linajes parentales, cuyo fitness es limitado en hidrolizados lignocelulósicos (Tabla 8) (Senatham et al., 2016; Morales et al., 2017; Pacheco et al., 2021; Sandoval-Nuñez et al., 2023; Barros et al., 2025). Las estrategias de ALE se basan en someter a las células a una presión selectiva constante en medios sintéticos con distintas combinaciones de inhibidores y/o en los hidrolizados reales. Este proceso favorece la selección de fenotipos específicos que adquieren mutaciones génicas espontáneas beneficiosas, permitiéndoles a las células adaptarse y anteponerse ante dicha presión. Como consecuencia, las cepas suelen reducir la fase de adaptación del consumo de azúcares, y mejorar su productividades y rendimientos de etanol (Sandoval-Nuñez et al., 2023; Barros et al., 2025).

Para el caso de *Sp. passalidarum*, la atención se ha dirigido principalmente a mejorar su susceptibilidad al ácido acético, un inhibidor potente de su metabolismo y de su actividad fermentativa (Morales et al., 2017; Trichez et al., 2019; Pacheco et al., 2021; Barros et al., 2025). En un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con alta cantidad

de ácido acético, *Sp. passalidarum* fue la especie más afectada entre otras levaduras evaluadas, ya que no mostró crecimiento ni consumo considerable de los azúcares en el material lignocelulósico de partida (Trichez et al., 2019) (Tabla 8). Las levaduras como *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis* muestran actividades enzimáticas innatas dependientes de NAD(P)H para la reducción del furfural e HMF a derivados menos tóxicos (Trichez et al., 2019; Lima et al., 2022). En el caso de los ácidos débiles, como el acético, la tolerancia se relaciona con el mantenimiento del pH intracelular a través de bombas activas que expulsan protones a expensas de un gasto de ATP (Lima et al., 2022). Estas respuestas frente a los compuestos tóxicos alteran la fisiología celular y causan una reducción del flujo de carbono y de la eficiencia fermentativa (Lima et al., 2022).

En resumen, las levaduras no convencionales muestran perfiles diversos de producción de etanol y/o xilitol, donde las condiciones de oxigenación resultan determinantes en estos comportamientos. Los resultados presentados complementan el entendimiento del metabolismo de xilosa y de sus principales limitaciones, aportando información relevante para el diseño de bioprocesos. Para ello, cepas con mayor robustez y capacidad de adaptación a hidrolizados lignocelulósicos deben ser seleccionadas para la producción industrial de etanol o xilitol. De manera preliminar, la levadura *Sp. passalidarum* puede considerarse un candidato promisorio para un enfoque de co-cultivo con cepas industriales de *Saccharomyces*, aunque es igualmente necesario optimizar su desempeño en condiciones de fermentación más demandantes.

Tabla 8. Resumen los desempeños fermentativos reportados para especies de levaduras no convencionales en el aprovechamiento de diversos tipos de sustratos lignocelulósicos.

Levadura	Hidrolizado lignocelulósico	Pretratamiento	Inhibidores presentes	Característica	Rendimiento de producto máximo (g/g)	Consumo de azúcares	Referencia
<i>Sc. stipitis</i> NRRL Y-7124	Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis alcalina con NaOH (130 °C)	Sin cantidades apreciables de ácido acético, furfural y HMF	Cultivo Fed-batch secuencial con recirculación de biomasa y disminución de temperatura mejora el uso de xilosa	0,32*	Glucosa: 100% Xilosa: alrededor del 90%	Nakanishi et al. (2017)
<i>Sp. passalidarum</i> NRRL Y-27907	Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis alcalina con NaOH (130 °C)	Sin cantidades apreciables de ácido acético, furfural y HMF	Cultivo Fed-batch con recirculación de biomasa y disminución de temperatura mejora el uso de xilosa	0,46*	Glucosa: 100% Xilosa: alrededor del 90%	Nakanishi et al. (2017)
<i>Sp. passalidarum</i> NRRL Y-27907	Cascarilla de soja	Hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ (121 °C)	97 mg/L furfural, 69 mg/L HMF, ácido acético no cuantificado	Consumo de pentosas considerablemente afectado	0,28*	Glucosa: 100% Xilosa: 3%	Este trabajo

<i>Sc. stipitis</i> UFMG-XMD-15.2	Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ (121 °C) seguida de detoxificación	10 mg/L furfural, 10 mg/L HMF, 3200 g/L ácido acético	Mejor desempeño de un aislamiento nuevo que la cepa tipo NRRL Y-7124 en hidrolizado detoxificado	0,34**	Xilosa y glucosa: 81%	Cadete et al. (2012)
<i>Sc. shehatae</i>	Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ (121 °C)	280 mg/L furfural, 1600 mg/L HMF 6400 mg/L ácido acético	Mutagénesis por UV mejora significativamente el desempeño de la levadura en hidrolizado	0,46*	Glucosa: 100% Xilosa: alrededor de 85%	Senatham et al. (2016)
<i>Sp. arboriae</i>	Hidrolizado de cáscara de arroz	Hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ (121 °C)	70 mg/L HMF 10 mg/L furfural 1600 mg/L ácido acético	Consumo de pentosas y productividad de etanol reducidos en hidrolizado respecto al medio control	0,45*	Glucosa: 100% Xilosa: alrededor de 30%	Da Cunha-Pereira et al. (2011)
<i>Sp. passalidarum</i> NRRL Y-27907	Bagazo de caña de azúcar	Desacetilación alcalina (NaOH) + hidrólisis ácida H ₂ SO ₄ (121 °C)	660 mg/L furfural + 80 mg/L HMF 320 mg/L ácido acético	Incremento en la producción de etanol al disminuir la cantidad de ácido acético	0,27**	-	Lima et al. (2021)
<i>Sp. passalidarum</i> NRRL Y-27907	Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ (121 °C)	20 mg/L de HMF 200 mg/L furfural 5800 mg/L ácido acético	Desempeño limitado de la cepa salvaje. Producción de etanol solo con cepa sometida a ALE y en alta densidad celular inicial	0,40**	Xilosa: 12 % con la cepa salvaje y alrededor de 100% con la cepa adaptada	Pacheco et al. (2021)
<i>Sp. passalidarum</i> NRRL Y-27907	Bagazo de caña de azúcar	Explosión por vapor seguida de hidrólisis ácida	660 mg/L furfural, 110 mg/L HMF 6000 mg/L ácido acético	Alto contenido de ácido acético inhibe las capacidades metabólicas de la especie salvaje	n.d.	Glucosa: 24% Xilosa: 3%	Trichez et al. (2019)

<i>M. guilliermondii</i>	Bagazo de caña de azúcar	Explosión por vapor seguida de hidrólisis ácida	660 mg/L furfural, 110 mg/L HMF 6000 mg/L ácido acético	Producción de xilitol por la especie salvaje sin adaptación previa	0,22* 0,42***	Glucosa: 100% Xilosa: 75%	Trichez et al. (2019)
<i>K. marxianus</i> YHY013	Mazorca de maíz	Hidrólisis ácida (H ₂ SO ₄ + H ₃ PO ₄) con y sin detoxificación posterior	HFM 290 mg/L hidrolizado detoxificado 700 mg/L hidrolizado sin detoxificar	Producción eficiente de xilitol por cepa mejorada	0,75*** hidrolizado detoxificado 0,73*** hidrolizado no detoxificado	Xilosa: alrededor de 90% en ambos tipos de hidrolizados	Hua et al. (2019)

*Rendimiento de etanol correspondiente a las cantidades de etanol detectado por azúcar total consumido (glucosa y xilosa).

**Rendimiento de etanol correspondiente a la cantidad de etanol detectado por xilosa consumida.

***Rendimiento de xilitol correspondiente a la cantidad de xilitol detectado por xilosa consumida.

n.d. no detectado

Conclusiones globales

Mientras que la glucosa constituye la principal fuente de carbono para las levaduras, la utilización de pentosas raramente alcanza cinéticas compatibles con el desarrollo eficiente de bioprocesos fermentativos. En este trabajo de tesis, se puso de manifiesto que esta diferencia no se limita únicamente a las rutas de conversión, sino que también abarca mecanismos regulatorios, sistemas de transporte y condiciones fermentativas del proceso. Si bien *S. cerevisiae* metaboliza la xilosa, a raíz de estrategias recombinantes, no la reconoce como un sustrato fermentable. En su lugar, la célula percibe esta condición como un estado de 'limitación de nutrientes', lo que representa un panorama paradójico y desfavorable para la fermentación en medios mixtos como los hidrolizados lignocelulósicos.

En esta tesis se investigaron algunas de las señales implicadas en dicha respuesta, con el fin de comprender en mayor profundidad los mecanismos regulatorios de sustratos no nativos en *S. cerevisiae*. Se caracterizaron también transportadores novedosos y se compararon especies de levaduras que presentan mecanismos metabólicos nativos más especializados para la utilización de pentosas. Los principales hallazgos y conclusiones se resumen a continuación. En base a lo expuesto, se proponen estrategias para la integración de la fermentación de pentosas por levaduras que podrían explorarse en configuraciones futuras de bioprocesos.

1. Hallazgos más relevantes

- Antes de esta tesis, no estaba completamente claro si la xilosa, un sustrato exógeno, era reconocida por el sistema de señalización de superficie de *S. cerevisiae*. Mediante la aplicación de un método *in vivo* basado en biosensores fluorescentes junto con la modulación de los niveles de receptores, se evidenció la detección de la xilosa por el receptor Snf3p. Con la presencia de una ruta funcional del catabolismo de la xilosa, las señales se incrementaron, consistente con la participación de metabolitos intracelulares en las cascadas de señalización. Curiosamente, las señales observadas para la xilosa se asemejan a aquellas que emergen cuando las células perciben concentraciones de glucosa limitantes, en particular la activación del receptor Snf3p y la inducción del gen diana *HXT2*. Sin embargo, estas señales varían en intensidad y,

posiblemente, en la forma en que se conectan con otras rutas reguladas por diferentes factores intracelulares.

- Ante la necesidad de orientar el uso de xilosa en *S. cerevisiae* mediante enfoques que trasciendan la ingeniería metabólica, se implementaron receptores artificiales para la ingeniería de los componentes de señalización. Las configuraciones quiméricas finales, diseñadas para reemplazar la débil respuesta de Snf3p, no lograron funcionar adecuadamente como receptores sensibles a la xilosa. No obstante, los resultados obtenidos revelaron limitaciones estructurales que pueden guiar futuras estrategias de diseño.
- La modulación de la señalización por Snf3p debe equilibrarse cuidadosamente para no comprometer la fisiología de *S. cerevisiae*, ya que, como se reveló en este trabajo, la sobreactivación de la vía afectó negativamente el crecimiento y la utilización de la xilosa.
- La preferencia de los transportadores endógenos de *S. cerevisiae* por hexosas motivó la búsqueda de proteínas alternativas en especies que naturalmente asimilan pentosas, como *Sp. passalidarum*. Se identificaron tres transportadores putativos en el genoma de esta especie, de los cuales únicamente AraSp mostró una dinámica funcional adecuada para el transporte de pentosas, particularmente en la captación de arabinosa. Hasta el momento, este es el primer transportador de arabinosa aislado de esta levadura y expresado de forma heteróloga en una cepa industrial recombinante de *S. cerevisiae*. Una mejora notable en la estabilidad de AraSp se consiguió mediante la mutagénesis de residuos de lisina potencialmente susceptibles a la ubiquitinación. Este tipo de modificación cobra gran relevancia y debe considerarse para expresar transportadores heterólogos y sostener el consumo de pentosas, que suele darse en las etapas finales de la fermentación.
- La implementación de tres configuraciones de reactores con niveles de aireación diferenciados permitió analizar comparativamente la relación de este parámetro con el metabolismo fermentativo de las levaduras no convencionales. Varias levaduras nativas acumularon xilitol durante cultivos aireados, lo que sugiere que la hipótesis clásica del desbalance de cofactores no basta para explicar este fenómeno. Será necesario explorar otros factores genéticos y regulatorios involucrados en desviar el metabolismo de la xilosa hacia la producción de xilitol en lugar de etanol en ciertas especies. En contraste, las levaduras con mayor capacidad etanológica, *Sp. passalidarum* y *Sc. stipitis*, lograron cinéticas de consumo de xilosa más favorables en escenarios restrictivos de oxigenación.
- La levadura *Sp. passalidarum* mostró una notable habilidad en la fermentación de xilosa a etanol, pero este comportamiento no se replicó en hidrolizados obtenidos de

cascarilla de soja. En este medio, la presencia de glucosa junto con potenciales compuestos inhibidores imposibilitó la utilización de la xilosa. Este efecto se alivió, en parte, al inocular el hidrolizado con un cultivo mixto entre las especies nativas de *S. bayanus* y *Sp. passalidarum*. Considero que, una vez optimizada la robustez de *Sp. passalidarum* frente a los efectos tóxicos del medio y al etanol acumulado, el consorcio tiene potencial para desempeñarse mejor que un monocultivo de la especie no convencional en condiciones industriales de fermentación.

En conjunto, los aspectos evaluados en esta tesis demuestran que, para una utilización eficiente de azúcares pentosas por las levaduras, es indispensable considerar tres procesos celulares fundamentales: la detección del sustrato mediante rutas de señalización, su captación al interior celular y las condiciones que permiten su procesamiento metabólico. En la presente tesis se profundizó acerca de estos componentes y se desarrollaron estrategias para modificar elementos de la señalización y de los sistemas de transporte, con el objetivo de avanzar en la optimización del uso de pentosas en cepas recombinantes de *S. cerevisiae*. En lo referente a levaduras no convencionales, se evidenciaron factores clave, principalmente relacionados con la oxigenación, que impactan en el metabolismo nativo de xilosa. También se demostró el potencial de estas levaduras para incorporarse en consorcios especializados junto con especies industriales de *Saccharomyces*. Esta estrategia podría explotarse para la fermentación de glucosa y xilosa en hidrolizados lignocelulósicos destinados a bioprocesos de producción de etanol 2G.

2. Consideraciones finales y futuras

Todavía restan aspectos a mejorar relacionados con la ingeniería de *S. cerevisiae* y con la implementación de levaduras no convencionales en los bioprocesos que dependen del aprovechamiento de pentosas. El panorama beneficioso de *S. cerevisiae* como plataforma modelo cambia cuando las cepas se modifican extensamente para fermentar la xilosa. Incluso, se ha llegado a observar un antagonismo entre la optimización del metabolismo C5 y la robustez de las cepas recombinantes frente a los medios lignocelulósicos (Sun et al., 2025). Resulta necesario, entonces, replantear la visión tradicional de la ingeniería metabólica de los azúcares no nativos e incluir en ella los mecanismos regulatorios, ya que estos coordinan no solo la asimilación del sustrato, sino también las respuestas a diversos estreses. Asimismo, debe existir un equilibrio entre la expresión sostenida de los genes necesarios para la degradación catabólica de

pentosas y la carga que esto impone en las células. La demanda de cofactores reducidos, la competencia con reacciones nativas y el estado regulatorio subóptimo que imita una carencia de nutrientes frente a los sustratos C5 pueden restringir, en conjunto, la tolerancia de las cepas. Por otro lado, las levaduras no convencionales aportan capacidades nativas valiosas—desde una captación especializada hasta una notable plasticidad metabólica—, aunque aún queda por comprender cómo integrarlas plenamente en procesos industriales robustos. A mi parecer, los consorcios microbianos constituyen un punto de partida prometedor, especialmente si se avanza en el desarrollo de herramientas genéticas, como las basadas en CRISPR-Cas, para potenciar las propiedades de las levaduras *non-Saccharomyces*. Además, dado el creciente número de especies estudiadas y su importancia en la biología fundamental y en las aplicaciones biotecnológicas, el propio término "no convencional" está perdiendo progresivamente relevancia. Esto anticipa un futuro en el que estas levaduras pasarán a ocupar un mayor protagonismo en los bioprocesos. En aquellos que utilizan la biomasa lignocelulósica, el desafío final no pasa por elegir entre *S. cerevisiae* o las levaduras no convencionales, sino por comprender cómo aprovechar lo mejor de cada una.

Por último, podría plantearse alterar la configuración típica de los procesos que involucran azúcares C6 y C5, ya que las pentosas suelen quedar en una clara desventaja al consumirse la glucosa en primera instancia. Cabe preguntarse, además, si realmente conviene forzar a que una misma cepa co-utilice por completo todos los azúcares, dado que esto puede incluso empeorar las velocidades de consumo. Reducir al máximo el tiempo de fermentación de pentosas es clave. Para ello, podría explorarse un bioproceso con una división temporal de laborales. En la fase inicial, en donde la liberación de estos azúcares es más alta, por ejemplo, tras la hidrólisis ácida, se podría inocular una cepa especialista en azúcares C5. Esta podría ser una levadura no convencional o una cepa de *S. cerevisiae* diseñada exclusivamente para fermentar pentosas. Luego, en una segunda instancia, se continuaría con la sacarificación de la celulosa y la fermentación simultánea de la glucosa utilizando cepas industriales de *Saccharomyces*. Este enfoque permitiría aprovechar las fortalezas de dos sistemas distintos sin imponer sobre una única cepa "generalista" la demanda de un consumo completo que suele comprometer la eficiencia metabólica.

Apéndice I

Información complementaria del Capítulo 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las respuestas de señalización mediadas por receptores de glucosa en *S. cerevisiae*. Las secuencias subrayadas pertenecen a sitios de restricción, mientras que las resaltadas en negrita son secuencias homólogas a la región de un gen o lugar específico del genoma. Las bases resaltadas en rojo corresponden a cambios de codones y mutagénesis dirigida.

Primer	Secuencia (5'-3')	Descripción
35-36_F	actgggaaaaccctggcg	Amplificación de plásmidos integrativos pCfB3035 y pCfB3036
35_R	agg tt aGGCGCGCCaat ctgctcttgaatggcg	Amplificación del <i>backbone</i> pCfB3035 con <i>Ascl</i>
36_R	agg tt aGGCGCGCCctcc gagaaagtttgatgcg	Amplificación del <i>backbone</i> pCfB3036 con <i>Ascl</i>
XI-1_Ver_ Cloning_R	cccc a actagcaaccctc	Verificación de las construcciones pBB01INT, pBB03INT, pBB04INT y pBB05INT
Int_SNF3_tail_ Ver_F	CACTCAAGCGAAGAAAACGC	Verificación de la construcción pBB01INT y de la integración de la quimera <i>SNF3</i>
X-4_Ver_ Cloning_R	caagggattttatcggtcaaagg	Verificación de las construcción pBB02INT
Int_RGT2_tail_ Ver_F	CTACAAGCAACGACACATCG	Verificación de la construcción pBB01INT y de la integración de la quimera <i>RGT2</i>
X-4_Ver_ Int_R	CAGAGATTGATAGGAAGGGTGG	Verificación integración de cassettes de expresión en locus X4
XI-1_Ver_ Int_R	CTTGTGTTGATGCCAACGAC	Verificación integración de cassettes en locus XI-1
BB51_F	gcagtatgtttatcatcgcc	Secuenciación de vectores integrativos
BB52_R	GACTACACCAATGACAATGG	Secuenciación de vectores integrativos
BB53_F	ACTGGCTGGCAATGCG	Secuenciación de vectores integrativos
BB54_F	ggtacaggatagcctaattg	Secuenciación de vectores integrativos
BB55_F	CCTGAAGGCTCCCAAAGTG	Secuenciación de vectores integrativos
GAL2Cter_ NcoI_F	agattaCCATGGcgaggtattctagc atggcctg	Amplificación de la región C-terminal de <i>GAL2</i>
GAL2_ MfeI_R	cacagcagaatcattccac	Amplificación de <i>GAL2</i> ; verificación de las construcciones de <i>GAL2</i> e integración
GAL2_BgIII_F	CCATTGCTAAGTCTAACAAGGTGTC	Amplificación de <i>GAL2</i>

GAL2_trunc_ NcoI_R	agattaCCATGGTTAAATTTCTTCTAACG ATAGGCCTTTAGTTTCTG	Amplificación GAL2 truncado con NcoI
GAL2_trunc_ CT_ NcoI_R	agattaCCATGGTTAAAAGAAA AAGACATAAAAAACATGGCAACCAAAC	Amplificación de GAL2 truncado eliminando C- terminal completo
Gal2_ Mut_Fw	GGTGTAGTCTACGTTGCCTCA CTTTCTTTAG	Primer fosforilado introduce <i>mismatches</i> para mutagénesis F377V y S379F del receptor quimérico
Gal2_ Mut_Rv	AATGACAATGGATGTTTCA AAGGAATC	Primer fosforilado para mutagénesis del receptor quimérico
BB65	gcaggAGTATCCAAAAGTGTATAG	Secuenciación de las variantes de GAL2 pBB03INT; pBB04INT; pBB05INT
BBg1_F	CGTAAGGTGCTGGTTGTTGG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target SNF3</i>
BBg2_F	CCGAATGTGAGGAAGCCGTGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target SNF3</i>
BBg3_F	CTTTAAGGAACACCCAACAAG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target SNF3</i>
BBg6_R	GATCATTATCTTTCACTGC	<i>Primer reverse</i> general para construcción de vectores ARNg
BBg7_F	TAATTTTTCAACAACACAG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target RGT2</i>
BBg8_F	CGATCCACTAAATACATACC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target RGT2</i>
BBg9_F	GATCACACTTCTTCAATGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target RGT2</i>
BBg13_F	ACGGTAACATATTCAGACATG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target GAL2</i>
BBg15_F	CACCTCACATAAATAACGTGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg con 20pb <i>target GAL2</i>
BBg12_F	GCGGTGCACGGATTTCAAGCA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Construcción del plásmido ARNg <i>target locus</i> XI-1 de w303
LW_8_F	gctatactgctgtcgattcg	Secuenciación de plásmidos ARNg
BB01_F	GTCAATTATTCTATAATCTGGGG AAATCAGTCATACTGAGAAA ACTAGGAATGAAGCCATACCAAACG	Amplificación DNA donar. 50 pb <i>target SNF3</i> para delección
BB02_R	AATTATAATGCACGTCCGCTTAA TTAATACATCGAATAACATTAATT AATCAGCGATCTGTCTATTTTCG	Amplificación DNA donar. 5 0 pb <i>target SNF3</i> para delección
BB03_F	AGCCTTCTCAACCGCCAAC	Verificación de la delección <i>SNF3</i>
BB15_R	CTACAGGCATCGTGGTGTCA	Verificación de la delección de genes
BB06_F	GGGTCCGATACATCATTAGG	Verificación interna <i>SNF3</i>
BB07_R	GTCAGCCATCACGGAGAGAG	Verificación interna <i>SNF3</i>
BB08_F	TTCCGATTTTTCAATCTA ACTCCGTCATTTCTTATCTGA GTTTTCTCGAATGAAGCCAT ACCAAACG	Amplificación DNA donar. 50 pb <i>target RGT2</i> para delección
BB09_R	ATGTCTATCATGTTGGAATGTT	Amplificación DNA donar.

	AAAAGAACTCAAGAGTGCG TGTATAAGTCAGCGATCTGTC TATTTTCG	50 pb <i>target RGT2</i> para delección
BB10_F	GCGTCGATATGCTGTATCCC	Verificación de la delección <i>RGT2</i>
BB13_F	GATCCAAGACTCTTAGAGGAGC	Verificación interna <i>RGT2</i>
BB14_R	GTGATGGAGAGAACGATGTGTC	Verificación interna <i>RGT2</i>
BB62_F	CAGCAATATAGGACTAGAAAA TATCAGGTAGCCGCACTCAA CTTGTAAGTGAATGAAGC CATACCAAACG	Amplificación DNA donar. 50 pb <i>target GAL2</i> para delección
BB63_R	GATAATTAATAATGAAGAAAA ACGTCAGTCATGAAAAATTAAG AGAGATGTCAGCGATCTG TCTATTTTCG	Amplificación DNA donar. 50 pb <i>target GAL2</i> para delección
BB64_F	CAACCCAGAGTGGTTAC TAAAGTG	Verificación de la delección <i>GAL2</i>
BB67_R	ccagccttcagattccaag	Verificación interna <i>GAL2</i>
V52_F	AAAACGCCACTAATCAAC CTGTAAATGAAAATAATGA TTTGAACGCGGC atgtcta aaggtgaagaattattcac	Amplificación de GFP; cola de 50pb con homología a <i>SNF3tail</i>
BB56_F	agattaGCGATCGCTAAATGG ATCCTAATAGTAACAGTTC	Amplificación de <i>SNF3</i> adicionando sitio <i>Sfal</i>
BB57_R	agattaCGCCGGCGTTATTTTC AAATCATTATTTTTCATTTACAGG	Amplificación de <i>SNF3</i> adicionando sitio <i>Mrel</i>
BB04_R	CATTACGCCAAGAGAAACAGGG	Verificación clonado <i>SNF3</i>
HR-TEF1p -X-4-US-R	ccgagaaaatctggaagagtaaaaaagg agtagaaacattttgaagctat CTGCT CTTGAATGGCGACA	Amplificación del fragmento X-4 con 56 pb homología con <i>TEF1p</i>
X-4_US_F	CCCAAAGCTAAGAGTCCCATTTTATTC	Amplificación del fragmento X-4
X-4_DS_R	CTGGTGAGGATTTACGGTATG	Amplificación del fragmento X-4
HR-PGM1t- X4-DS-F	GTAGGAGTGCACCAATTGC AAAGGGAAAAGCTGAATGGGCA GTTCGAATAACAGGCATGGGAAGATTTCG	Amplificación del fragmento X-4 con homología a <i>PGM1t</i>
V43_R	ttattgtacaattcatcataccatg	Amplificación de GFP
V41_F	TAGAGGATTTACAACATGACG ACAAACCGTGGTACAAGGCC ATGCTAGAA atgtctaaaggtgaaga attattcac	Amplificación de GFP; cola de 50 pb con homología a <i>GAL2</i>
V44_F	ttgttactgctgctggtattaccatggta tggatgaattgtacaataa CCATGGT TAATTTAATGTTATTC	Amplificación del terminador de <i>SNF3</i> ; cola de 50 pb con homología a GFP
V45_R	CTAAAGGGAACAAAAGCT GGAGCTCCACCGCGGTG GCGGCCGCTCTAGAAg AGT ATCCAAAAGTGTTATAG	Amplificación del terminador de <i>SNF3</i> ; cola de 50 pb con homología al vector pRS42n
V50_R	gccgcgTTTCAAATCATTAT TTTCATTTACAGGTTG	Amplificación de <i>Snf3p- Gal2trunc-Snf3tail</i>
V51_F	ACTATAGGGCGAATTGGGTA CCGGCCCCCCTCGAGGT CGACGGTATCGTTTCAGTCT CAAACCTTTCAGTAC	Amplificación del promotor <i>Snf3p-Gal2</i> transportador con 50 pb de homología al vector pRS42n
V47_R	ttctagcatggcctgtgac	Amplificación de <i>Snf3p-Gal2p</i> transportador
GAL2_BgIII_ R	gacgcattgccagccag	Amplificación de fragmento de <i>GAL2</i> que incluye <i>BgIII</i>

TDH3p-Sall_F	agattaGTCGACagtttatcattatcaa tactgcc	Amplificación de TDH3p- GAL2 adicionando Sall
V54_F	ttcattaatgcagctggcac	Verificación clonado en pRS42n
ACT1_F	TGGATTCCGGTGATGGTGTT	RT-qPCR gen de referencia
ACT1_R	TCAAATGGCGTGAGGTAGAGA	RT-qPCR gen de referencia
HXT2_F	GGCTCTCAACAACTTCTATCCAC	RT-qPCR gen target
HXT2_R	GGGAGTTCAGCGTTAGTGATT	RT-qPCR gen target

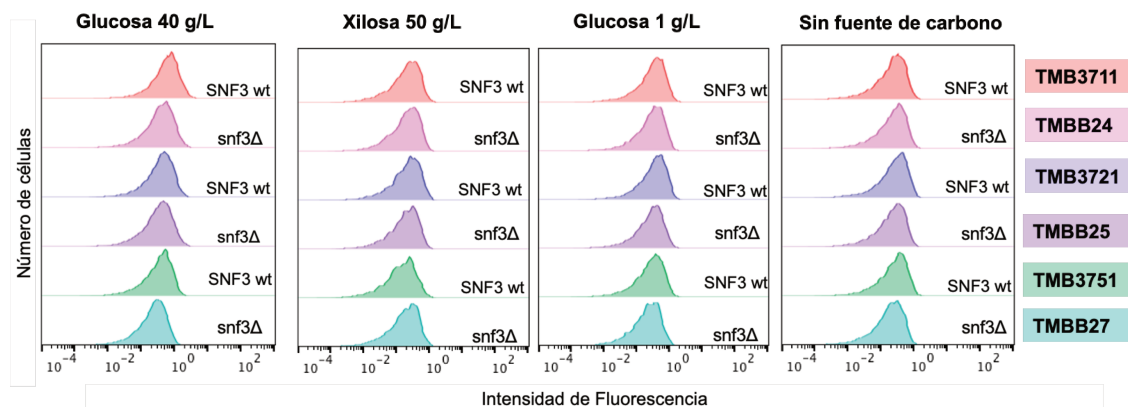


Figura 1. Histogramas de fluorescencia para las cepas de *S. cerevisiae* sin GFP. Los perfiles de fluorescencia permanecieron sin cambios tras la delección de SNF3 a las 6h de cultivo en las diferentes condiciones. Se muestran histogramas para TMB3711 (cepa background y su cepa isogénica correspondiente TMBB24 con Snf3p inactivado; para TMB3721 (transporte de xilosa) y su cepa isogénica TMBB25 con delección de Snf3p; y para TMB3751 (transporte + asimilación) y su cepa isogénica sin Snf3p, TMBB27. Los histogramas representan resultados representativos de experimentos por duplicado biológicos.

Tabla 2. Valores de *fold change* (FC) de las señales fluorescentes del biosensor *HXT2p* para las cepas *SNF3* wild-type y *snf3Δ* en diferentes condiciones de cultivo. La media geométrica de la intensidad de fluorescencia (IF) de los histogramas se calculó a las 0 h (represión) y luego de 6 h para cada cepa y cada condición experimental. Estos valores se utilizaron para calcular el FC mediante la normalización de la intensidad de fluorescencia de la GFP obtenida al final del ensayo respecto al valor inicial de la señal. Los datos corresponden al promedio de duplicados biológicos independientes.

*Durante el cultivo con xilosa, se detectaron dos poblaciones con diferentes IF para las cepas TMB3713, TMBB11, TMB3723 y TMBB26. En estos casos, se indican los valores de FC para la población de la derecha y la de la izquierda por separado, junto con los % de distribución de las

	Glucosa 1 g/L	Xilosa * 50 g/L	Sin fuente de carbono
	FC	Población %	FC
TMB3713	4,11 ±0,35	Alta IF 32 ±3	3,36 ±0,93
		Baja IF 68 ±3	0,27 ±0,03
TMBB11	1,86 ±0,34	Alta IF 29 ±4	1,78 ±0,33
		Baja IF 71 ±4	0,26 ±0,03
TMB3723	4,10 ±0,18	Alta IF 42 ±8	3,72 ±0,18
		Baja IF 57 ±8	0,44 ±0,15
TMBB26	1,82 ±0,05	Alta IF 31 ±2	2,16 ±0,32
		Baja IF 69 ±2	0,30 ±0,01
TMB3753	3,02 ±0,53	Única 100%	3,39 ±0,18
TMBB28	1,72 ±0,19	Única 100%	2,72 ±0,10

poblaciones.

Tabla 3. Valores de intensidad de fluorescencia a las 6 h normalizados por el tamaño celular (FSC) para las cepas *SNF3* wild-type y sus mutantes cultivadas en alta xilosa y baja glucosa.

Cepa <i>SNF3</i> wt	Glucosa 1 g/L	Xilosa 50 g/L Población inducida	Cepa <i>snf3Δ</i>	Glucosa 1 g/L	Xilosa 50 g/L Población inducida
TMB3713	0,36 ±0,03	0,13 ±0,01	TMBB11	0,15 ±0,00	0,07 ±0,01
TMB3723	0,33 ±0,02	0,14 ±0,01	TMBB26	0,13 ±0,00	0,06 ±0,00
TMB3753	0,25 ±0,02	0,12 ±0,01	TMBB28	0,11 ±0,01	0,08 ±0,02

Apéndice II

Información complementaria del Capítulo 2.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación, clonado y secuenciación de transportadores. Las secuencias subrayadas corresponden a regiones homólogas entre transportadores o sitios de clonado entre promotor y terminador. Las bases resaltadas en negrita indican los cambios de codones y mutagénesis dirigida.

Primer	Secuencia (5' - 3')	Descripción
p416_Xtsp _Rv	<u>CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGA</u> <u>TATCGAATTCTACTCGATGT</u> GTTCAATGGCAAC	Clonado de XtSp, homología con p416
p416_Xtsp_CTGmut _Fw	<u>GAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGA</u> CTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGATGA CTTCCTATAATAAAGATAACTCATCGTTA TCTCAAGAAAGTG	Clonado de XtSp, homología con p416, optimización de CTG
p416_Ara1 _Fw	<u>TCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGC</u> <u>AGGATGATTTTATCAAGAATTGATCA</u> AGCTTTATTTCGAC	Clonado de AraSp, homología con p416
p416_Ara1_CTGmut _Rv	<u>CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGC</u> <u>TTGATATCGAATTTTAAACGAGGG</u> ATC AGAG ATTGAAGGTTCGCAC	Clonado de AraSp, homología con p416, optimización de CTG
p416GPD_TsSp1 _Fw	<u>TCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGC</u> ATGGGTATTGAAGAAAGTTTATTC	Clonado de TsSp, homología con p416
p416_TsSp1 _Rv	<u>CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTT</u> <u>GATATCGAATTTTATACAGATACC</u> TTTTCAGCTTGTTTC	Clonado de TsSp, homología con p416
XtSp_K1_K2 _Fw	CGTTGTT AGG ATTGCTCGTGAATTACCTT ACGAAAGCCAAACCCGTGAAGGTGACA TTGAA AGGG TTGCC	Amplificación de XtSp, mutación lisina por arginina
XtSp_K1_K2 _Rv	GGCAACC CTTT CAATGTACACCTTCACGG GTTTGGCTTTTCGTAAGGTAA TTCACGAGCAAT CCTAACA ACG	Amplificación de XtSp, mutación lisina por arginina
1_K1_K2 _Fw	CAGAAACAGAA AGGG CTGCCAGAA TATCTCTTGAACGTGAAGAAAGAC GAAGAGCAAG	Amplificación de AraSp, mutación lisina por arginina
Ara1_K1_K2 _Rv	CTTGCTCTTCGT CTTT CTTCACGTTCAA GAGATATTCTGGCAGCC CTTT CTGTTTCTG	Amplificación de AraSp, mutación lisina por arginina
TsSp_K1_K2 _Fw	CTTCGATAGAA AGAG CTGACAG CGAACAAGCTGAA AGGG TATCTG	Amplificación de TsSp, mutación lisina por arginina
TsSp_K1_K2 _Rv	CAGATACC CTTT CAGCTTGTTTCGCT GTCAGCT CTTT CTATCGAAG	Amplificación de TsSp, mutación lisina por arginina
Seq_cloning_Fw	GACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG	Verificación del ensamblaje y secuenciación
Seq_cloning_Rv	TCGGTTAGAGCGGATGTG	
XtsSp_Rv	CCATAGAGGCAGCTTGAC	

TsSp_Rv	CCAAGTTGATGCGAAACC	
Ara1Sp_Rv	CCCAAATACCAACACCCC	
yeGFP_ATG _Fw	ATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGT	Amplificación de GFP
yeGFP_STOP-p416 _Rv	<u>CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTT</u> GATATCGAATTTTATTTGT ACAATTCATCCATACCATGG	Amplificación de GFP, homología con p416
Ara1Sp-GFP _Rv	<u>TGGGACAACACCAGTGAATAATTCTTCA</u> CCTTTAGACATAACT GAGGGATCAGAGATTGAAGGTCGC	Amplificación de AraSp, homología con GFP

Tabla 2. Proteínas transportadoras y sensoras utilizadas para la identificación de nuevos transportadores y para el análisis filogenético. Los nombre de los genes se indican en mayúscula y cursiva, mientras que los nombres de las proteínas se presentan en minúsculas. Las proteínas que no han sido funcionalmente caracterizadas se señalan como *putativas*, asignando su preferencia de sustrato como "desconocida".

Número de acceso	Nombre	Sustrato	Función	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
NP_010087	Snf3	Glucosa, fructosa, xilosa	Sensor	Ozcan et al. (1998), Dietvorst et al. (2010), Bolzico et al. (2025)
NP_010143	Rgt2	Glucosa	Sensor	Ozcan et al. (1998)
NP_013182	Gal2	Galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa	Transportador	Kou et al. (1970), Subtil & Boles (2011), Knoshaug et al. (2015)
NP_013724	Hxt2	Glucosa, xilosa	Transportador	Sedlak & Ho (2004), Gonçalves et al. (2014)
NP_011962	Hxt11	Glucosa, xilosa	Transportador	Sedlak & Ho (2004), Gonçalves et al. (2014)
NP_010629	Hxt7	Glucosa, xilosa	Transportador	Sedlak & Ho (2004), Young et al. (2011), Gonçalves et al. (2014)
<i>Scheffersomyces stipitis</i>				
XP_001386416.2	Snf3	Desconocido	Sensor putativo	
<u>XP_001386588.1</u>	Rgt2	Glucosa, xilosa	Sensor /transportador	Moon et al. (2013), Young et al. (2014)
XP_001386589	Xut6, STL12, Xyp29	Xilosa, glicerol	Transportador	Du et al. (2010)
XP_001382755	AraT, HGT2	Arabinosa	Transportador	Subtil & Boles (2011)
XP_001385583	Xut1	Xilosa	Transportador	Young et al. (2011)
XP_001387898	Sut1	Glucosa, xilosa	Transportador, tipo HXT	Weierstall et al. (1999)

XP_001387138	Xut3	Xilosa, glucosa	Transportador	Young et al. (2011)
<i>Spathaspora passalidarum</i>				
XP_007374835	Sut1	Desconocido	Transportador putativo	
XP_007373756	Xut1	Xilosa, glucosa	Transportador	Knychala et al. (2022)
XP_007376192	Snf3	Desconocido	Sensor putativo	
XP_007372242	HGT2	Desconocido	Transportador putativo	
<i>Spathaspora xylofermentans</i>				
SpG, Spaxylofer 2423		Glucosa, xilosa	Transportador	Fiamenghi et al. (2022)
<i>Spathaspora gorwiae</i>				
SpX, Spagorwiae 6242		Glucosa, xilosa	Transportador	Fiamenghi et al. (2022)
<i>Debaryomyces hansenii</i>				
XP_458532	DEHA 2D01474	Glucosa, xilosa	Transportador /sensor	Young et al. (2014)
XP_458169	DEHA 2C11374; XylhP	Xilosa, glucosa	Transportador	Ferreira et al. (2013), Young et al. (2011)
<i>Candida intermedia</i>				
Q2MDH1	Gxf1	Glucosa, xilosa	Transportador	Leandro et al. (2006)
Q2MEV7	Gxs1	Glucosa, xilosa	Transportador	Leandro et al. (2006)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>				
XP_001482176	Mg t05196	Xilosa, glucosa	Transportador	Wang et al. (2015)
<i>Penicillium chrysogenum</i>				
CAP85508	PcAraT	Arabinosa	Transportador	Bracher et al. (2018)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>				
XP_022677576	Snf3	Glucosa	Sensor	Wang et al. (2023)
BAP72918	STL1; KMAR 60179	Xilosa, glicerol	Transporter, tipo HGT	Donzella et al. (2021)
GZ791039	Axt1	Arabinosa, xilosa	Transportador, tipo HGT	Knoshaug et al. (2015)
BAP69739	KMAR 10531	Xilosa, arabinosa	Transportador, tipo HGT	Donzella et al. (2021)
<i>Kluyveromyces lactis</i>				
XP_451484	Hgt1	Galactosa, glucosa	Transportador	Baruffini et al. (2006)
XP_455315	Rag4	Glucosa	Sensor	Betina et al. (2001)
<i>Candida albicans</i>				
XP_723173	Hgt4	Glucosa	Sensor	Brown et al. (2006)
XP_720385	Hgt12; SNF32	Glucosa	Transportador /sensor	Maidan et al. (2005)

Apéndice III

Información complementaria del Capítulo 3.

Tabla 1. Números de acceso de las secuencias de aminoácidos de las enzimas XR y XDH usadas en el análisis filogenético

Levadura	XR	XDH
<i>Sc. stipitis</i>	<u>XP_001385181.1</u> <u>ALP00843.1</u> (XYL1.1)	<u>XP_001386982.1</u> <u>XP_007373266.1</u> (XYL2.1)
<i>Sp. passalidarum</i>	<u>XP_007375534.1</u> (XYL1.2)	<u>XP_007374048.1</u> (XYL2.2)
<i>Y. tenuis</i>	<u>O74237.1</u>	<u>XP_006689111.1</u>
<i>Y. mexicana</i>	-	-
<i>Y. terventina</i>	-	-
<i>M. guilliermondii</i>	<u>ABB87187.1</u>	<u>XP_001481963.2</u>
<i>M. carphophila</i>	-	-
<i>M. caribbica</i>	<u>AWX90327.1</u>	<u>QAV56481.1</u>
<i>P. tannophilus</i>	<u>P78736.1</u>	<u>ODV98336.1</u>
<i>O. siamensis</i>	<u>ACN78427.2</u>	-
<i>K. marxianus</i>	<u>ADV91498.1</u>	<u>ADW84693.1</u>
<i>S. cerevisiae</i>	<u>NP_011972.1</u> (GRE3)	<u>NP_012693.1</u> (SOR1)
<i>N. liquefaciens</i>	<u>GHJ89122.1</u>	<u>GHJ86911.1</u>
<i>R. arrhizus</i>	<u>AHG97682.1</u>	<u>KAG0737167.1</u>

Tabla 2. Parámetros del crecimiento y del consumo de xilosa como único sustrato en las tres condiciones de aireación evaluadas.

Levadura	Aireado		70% HS		40% HS	
	ΔS (%)	ΔDO_{600nm}	ΔS (%)	ΔDO_{600nm}	ΔS (%)	ΔDO_{600nm}
<i>Sc. stipitis</i>	100,00	9,37	89,92	5,78	84,98	2,26
<i>P. tannophilus</i>	69,73	9,85	49,33	5,32	36,28	2,70
<i>Sp. passalidarum</i>	100,00	12,14	97,76	4,02	100,00	1,47
<i>K. marxianus</i>	89,70	9,04	70,19	4,19	37,90	1,45
<i>N. liquefaciens</i>	98,18	6,58	87,52	4,80	39,20	0,67
<i>Yamadazyma</i> sp.	96,46	10,39	53,86	3,14	32,43	1,00
<i>M. guilliermondii</i>	94,45	9,03	60,96	5,10	17,23	2,67
<i>Meyerozyma</i> sp.	93,90	6,37	91,65	6,06	55,74	1,62
<i>S.cerevisiae</i> TMB 3400	89,38	7,78	57,77	2,82	80,72	1,22

ΔS , consumo neto de xilosa; ΔOD_{600nm} , aumento neto de biomasa en términos de densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 3. Rendimientos en etanol y en xilitol a partir de la fermentación de la xilosa en las tres condiciones de aireación evaluadas.

Levadura	Y _e (g _{etanol} /g _{xilosa})			Y _x (g _{xilitol} /g _{xilosa})		
	Aireado	70% HS	40% HS	Aireado	70% HS	40% HS
	<i>Sc. stipitis</i>	0,01	0,22	0,49	n.d.	0,07
<i>P. tannophilus</i>	n.d.	0,07	0,42	0,03	0,02	0,04
<i>Sp. passalidarum</i>	0,12	0,40	0,50	0,01	n.d.	n.d.
<i>K. marxianus</i>	0,01	0,14	0,16	0,01	0,11	0,16
<i>N. liquefaciens</i>	n.d.	0,18	0,27	0,38	0,12	0,01
<i>Yamadazyma</i> sp.	n.d.	0,23	0,41	0,17	0,18	0,19
<i>M. guilliermondii</i>	n.d.	0,04	0,04	0,23	0,15	0,10
<i>Meyerozyma</i> sp.	n.d.	0,01	0,01	0,47	0,46	0,46
<i>S.cerevisiae</i> TMB 3400	0,04	0,30	0,39	n.d.	0,04	0,14

Y_e, rendimiento de etanol correspondiente a la cantidad de etanol generado por cantidad de xilosa consumida; Y_x, rendimiento de xilitol correspondiente a la cantidad de xilitol generado por cantidad de xilosa consumida.

Tabla 4. Parámetros fermentativos sobre hidrolizados de cascarilla de soja

Levadura	ΔS glucosa (%)	ΔS xilosa (%)	r _s glucosa (g/L.h)	Tiempo de agotamiento de la glucosa (h)	r _s xilosa (g/L.h)	Y _e (g _{etanol} /g _{azúcar})
<i>S. bayanus</i>	100	-	6,35	24	-	0,48
<i>S. cerevisiae</i> var. Ethanol Red	100	-	8,65	10	-	0,48
<i>Sp.</i> <i>passalidarum</i>	100	3	1,25	32	-	0,28
<i>Sp.</i> <i>passalidarum</i> + <i>S. bayanus</i>	100	27,5	5,30	16	0,34	0,49

ΔS, consumo neto del azúcar; r_s, velocidad máxima de consumo de sustrato; Y_e, rendimiento máximo de etanol.

Referencias bibliográficas

Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631-653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>

Ali, S., Rani, A., Dar, M., Qaisrani, M., Noman, M., Yoganathan, K., Asad, M., Berhanu, A., Barwant, M., & Zhu, D. (2024). Recent advances in characterization and valorization of lignin and its value-added products: Challenges and future perspectives. *Biomass*, 4(3), 947-977. <https://doi.org/10.3390/biomass4030053>

Allen, S. A., Clark, W., McCaffery, J. M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P. J., Liu, Z. L., & Gorsich, S. W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>

Almeida, J. R. M., Karhumaa, K., Bengtsson, O., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2009). Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. *Bioresource Technology*, 100(14), 3674-3677. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.057>

Apel, A. R., Ouellet, M., Szmidt-Middleton, H., Keasling, J. D., & Mukhopadhyay, A. (2016). Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep19512>

Atkinson, E., Tuza, Z., Perrino, G., Stan, G.-B., & Ledesma-Amaro, R. (2022). Resource-aware whole-cell model of division of labour in a microbial consortium for complex-substrate degradation. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01842-0>

Attfield, P. V., & Bell, P. J. (2006). Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. *FEMS yeast research*, 6(6), 862-868. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00098.x>

Attfield, P. V., Boyd, K., Purkovic, D., Ng, W. S., Arcenal, P., Kroukamp, H., & Bell, P. J. L. (2025). Perspectives on current and future yeast technologies for ethanol-based biofuels and bioproducts. *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf044>

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (2003). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.

Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., Rajesh Banu, J., Rao, C. V., Kim, Y.-G., & Yang, Y.-H. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300, 122724. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>

Banu J, R., Sugitha, S., Kavitha, S., Kannah R, Y., Merrylin, J., & Kumar, G. (2021). Lignocellulosic biomass pretreatment for enhanced bioenergy recovery: Effect of lignocelluloses recalcitrance and enhancement strategies. *Frontiers in Energy Research*, 9, 646057. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.646057>

Baptista, S. L., Soares, P. O., Romani, A., Alonso, J. L., & Domingues, L. (2024). Engineering arabinose-to-arabitol conversion in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for sugar beet pulp valorization. *Industrial Crops and Products*, 222, 119718. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119718>

- Barnett, J. A. (2008). A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites 1. *Yeast*, 25(10), 689-731. <https://doi.org/10.1002/yea.1630>
- Baruffini, E., Goffrini, P., Donnini, C., & Lodi, T. (2006). Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: Major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Research*, 6(8), 1235-1242. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00107.x>
- Barros, K. O., Fisher, K. J., Crandall, J. G., Magni, G., Serate, J., Xie, D., Zhang, Y., Silva, S. S., Sato, T. K., Hittinger, C. T., & Rosa, C. A. (2025). An evolved strain of *Spathaspora passalidarum* produces ethanol from sugarcane bagasse and switchgrass lignocellulosic hydrolysates. <https://doi.org/10.1101/2025.09.26.678828>
- Barros, K. O., Mader, M., Krause, D. J., Pangilinan, J., Andreopoulos, B., Lipzen, A., Mondo, S. J., Grigoriev, I. V., Rosa, C. A., Sato, T. K., & Hittinger, C. T. (2024). Oxygenation influences xylose fermentation and gene expression in the yeast genera *Spathaspora* and *Scheffersomyces*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02467-8>
- Basak, B., Kumar, R., Bharadwaj, A. V. S. L. S., Kim, T. H., Kim, J. R., Jang, M., Oh, S.-E., Roh, H.-S., & Jeon, B.-H. (2023). Advances in physicochemical pretreatment strategies for lignocellulose biomass and their effectiveness in bioconversion for biofuel production. *Bioresource Technology*, 369, 128413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128413>
- Becker, J., & Boles, E. (2003). A Modified *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Consumes l - Arabinose and Produces Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4144-4150. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4144-4150.2003>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91-106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Bergmann, J. C., Trichez, D., De Moraes Junior, W. G., Ramos, T. G. S., Pacheco, T. F., Carneiro, C. V. G. C., Honorato, V. M., Serra, L. A., & Almeida, J. R. M. (2019). Biotechnological application of non-conventional yeasts for xylose valorization. En A. Sibirny (Ed.), *Non-conventional Yeasts: From Basic Research to Application*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_2
- Bertels, L.-K., Fernández Murillo, L., & Heinisch, J. J. (2021). The pentose phosphate pathway in yeasts—more than a poor cousin of glycolysis. *Biomolecules*, 11(5), 725. <https://doi.org/10.3390/biom11050725>
- Betina, S., Goffrini, P., Ferrero, I., & Wésolowski-Louvel, M. (2001). Rag4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*, 158(2), 541-548. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.541>
- Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., Rajesh Banu, J., Rao, C. V., Kim, Y.-G., & Yang, Y.-H. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300, 122724. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>
- Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L., & Lewis, D. A. (1993). Yeast sugar transporters. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 28(4), 259-308. <https://doi.org/10.3109/10409239309078437>
- Blazeck, J., Hill, A., Liu, L., Knight, R., Miller, J., Pan, A., Otoupal, P., & Alper, H. S. (2014). Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nature Communications*, 5(1), 3131. <https://doi.org/10.1038/ncomms4131>

- Boles, E., & Hollenberg, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(1), 85-111. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x>
- Bolzico, B. C., Persson, V. C., Comelli, R. N., & Gorwa-Grauslund, M. (2025). Glucose receptor deletion and engineering: Impact on xylose sensing and utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 25, foaf040. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf040>
- Bolzico, B. C., Racca, S., Khawam, J. N., Leonardi, R. J., Tomassi, A. H., Benzzo, M. T., & Comelli, R. N. (2024). Exploring xylose metabolism in non-conventional yeasts: Kinetic characterization and product accumulation under different aeration conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 51. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae023>
- Borgström, C., Persson, V. C., Rogova, O., Osiro, K. O., Lundberg, E., Spéjel, P., & Gorwa-Grauslund, M. (2022). Using phosphoglucose isomerase-deficient (*pgi1Δ*) *Saccharomyces cerevisiae* to map the impact of sugar phosphate levels on d-glucose and d-xylose sensing. *Microbial Cell Factories*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01978-z>
- Borgström, C., Wasserstrom, L., Almqvist, H., Broberg, K., Klein, B., Noack, S., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2019). Identification of modifications procuring growth on xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying the Weimberg pathway. *Metabolic Engineering*, 55, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.010>
- Bracher, J. M., Verhoeven, M. D., Wisselink, H. W., Crimi, B., Nijland, J. G., Driessen, A. J. M., Klaassen, P., Van Maris, A. J. A., Daran, J.-M. G., & Pronk, J. T. (2018). The *Penicillium chrysogenum* transporter PcAraT enables high-affinity, glucose-insensitive l-arabinose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1047-6>
- Brandt, B. A., García-Aparicio, M. D. P., Görgens, J. F., & Van Zyl, W. H. (2021). Rational engineering of *Saccharomyces cerevisiae* towards improved tolerance to multiple inhibitors in lignocellulose fermentations. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02021-w>
- Brethauer, S., & Studer, M. H. (2014). Consolidated bioprocessing of lignocellulose by a microbial consortium. *Energy & Environmental Science*, 7(4), 1446. <https://doi.org/10.1039/c3ee41753k>
- Brink, D. P., Borgström, C., Persson, V. C., Osiro, K. O., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2021). D-Xylose Sensing in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights from D-Glucose Signaling and Native D-Xylose Utilizers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12410. <https://doi.org/10.3390/ijms222212410>
- Brink, D. P., Borgström, C., Tueros, F. G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2016). Real-time monitoring of the sugar sensing in *Saccharomyces cerevisiae* indicates endogenous mechanisms for xylose signaling. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0580-x>
- Broda, M., Yelle, D. J., & Serwańska, K. (2022). Bioethanol production from lignocellulosic biomass—Challenges and solutions. *Molecules*, 27(24), 8717. <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>
- Brown, J., Lindstrom, J. K., Ghosh, A., Rollag, S. A., & Brown, R. C. (2024). Production of sugars from lignocellulosic biomass via biochemical and thermochemical routes. *Frontiers in Energy Research*, 12, 1347373. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2024.1347373>
- Brown, V., Sexton, J. A., & Johnston, M. (2006). A Glucose Sensor in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1726-1737. <https://doi.org/10.1128/EC.00186-06>

- Bueno, J. G. R., Borelli, G., Corrêa, T. L. R., Fiamenghi, M. B., José, J., De Carvalho, M., De Oliveira, L. C., Pereira, G. A. G., & Dos Santos, L. V. (2020). Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01782-0>
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M. (2010). Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors*, 10(6), 6195–6240. <https://doi.org/10.3390/s100606195>
- Cadete, R. M., De Las Heras, A. M., Sandström, A. G., Ferreira, C., Gírio, F., Gorwa-Grauslund, M. F., Rosa, C. A., & Fonseca, C. (2016). Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0570-6>
- Cadete, R. M., Melo, M. A., Dussán, K. J., Rodrigues, R. C. L. B., Silva, S. S., Zilli, J. E., Vital, M. J. S., Gomes, F. C. O., Lachance, M.-A., & Rosa, C. A. (2012). Diversity and physiological characterization of d-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. *PLoS ONE*, 7(8), e43135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043135>
- 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. (2013). *Spathaspora brasiliensis* sp. Nov., *Spathaspora suhii* sp. Nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. Nov. And *Spathaspora xylofermentans* sp. Nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(2), 421–431. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9822-z>
- Cai, P., Wu, X., Deng, J., Gao, L., Shen, Y., Yao, L., & Zhou, Y. J. (2022). Methanol biotransformation toward high-level production of fatty acid derivatives by engineering the industrial yeast *Pichia pastoris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.2201711119>
- Cai, Z., Zhang, B., & Li, Y. (2012). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: Reflections and perspectives. *Biotechnology Journal*, 7(1), 34–46. <https://doi.org/10.1002/biot.201100053>
- Chambers, P., Issaka, A., & Palecek, S. P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* JEN1 promoter activity is inversely related to concentration of repressing sugar. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 8–17. <https://doi.org/10.1128/aem.70.1.8-17.2004>
- Chen, Z., & Liu, D. (2016). Toward glycerol biorefinery: Metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0625-8>
- Choi, K. M., Kwon, Y. Y., & Lee, C. K. (2014). Disruption of Snf3/Rgt2 glucose sensors decreases lifespan and caloric restriction effectiveness through Mth1/Std1 by adjusting mitochondrial efficiency in yeast. *FEBS Letters*, 589(3), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.020>
- Chomvong, K., Benjamin, D. I., Nomura, D. K., & Cate, J. H. D. (2017). Cellobiose consumption uncouples extracellular glucose sensing and glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.00855-17>
- Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2013). Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, 31(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.006>

- Comelli, R. N., Seluy, L. G., & Isla, M. A. (2016). Performance of several *Saccharomyces* strains for the alcoholic fermentation of sugar-sweetened high-strength wastewaters: Comparative analysis and kinetic modelling. *New Biotechnology*, 33(6), 874-882. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.09.007>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Cunha, J. T., Romaní, A., Costa, C. E., Sá-Correia, I., & Domingues, L. (2019). Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 159-175. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9478-3>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Baptista, S. L., Costa, C. E., & Domingues, L. (2020). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic valorization: A review and perspectives on bioethanol production. *Bioengineered*, 11(1), 883-903. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1801178>
- Da Cunha-Pereira, F., Hickert, L. R., Sehnem, N. T., De Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. (2011). Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresource Technology*, 102(5), 4218-4225. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.060>
- Dahms, A. (1974). 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60(4), 1433-1439. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(74\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(74)90358-1)
- Das, N., Jena, P. K., Padhi, D., Kumar Mohanty, M., & Sahoo, G. (2023). A comprehensive review of characterization, pretreatment and its applications on different lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(2), 1503-1527. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01294-3>
- De Deken, R. H. (1966). The crabtree effect: A regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(2), 149-156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- Demeke, M. M., Dietz, H., Li, Y., Foulquié-Moreno, M. R., Mutturi, S., Deprez, S., Abt, T. D., Bonini, B. M., Liden, G., Dumortier, F., Verplaetse, A., Boles, E., & Thevelein, J. M. (2013). Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-89>
- Devi, A., Bajar, S., Kour, H., Kothari, R., Pant, D., & Singh, A. (2022). Lignocellulosic biomass valorization for bioethanol production: A circular bioeconomy approach. *BioEnergy Research*, 15(4), 1820-1841. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10401-9>
- Dias, C., Sousa, S., Caldeira, J., Reis, A., & Lopes Da Silva, T. (2015). New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospidium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, 189, 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.009>
- Dickinson, J.R., & Schweizer, M. (Eds.). (2004). Metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces Cerevisiae* (2nd ed.). CRC Press.

- Dien, B. S., Kurtzman, C. P., Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1996). Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58(1), 233-242. <https://doi.org/10.1007/BF02941704>
- Dietvorst, J., Karhumaa, K., Kielland-Brandt, M. C., & Brandt, A. (2010). Amino acid residues involved in ligand preference of the Snf3 transporter-like sensor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 27(3), 131-138. <https://doi.org/10.1002/yea.1737>
- Dmytruk, K., Semkiv, M., & Sibirny, A. (2025). Glycerol bioconversion to biofuel and value-added products by yeasts. *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf038>
- Does, A. L., & Bisson, L. F. (1989). Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. *Applied and environmental microbiology*, 55(1), 159-164. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.159-164.1989>
- Donzella, L., Sousa, M. J., & Morrissey, J. P. (2023). Evolution and functional diversification of yeast sugar transporters. *Essays in Biochemistry*, 67(5), 811-827. <https://doi.org/10.1042/ebc20220233>
- Donzella, L., Varela, J. A., Sousa, M. J., & Morrissey, J. P. (2021). Identification of novel pentose transporters in *Kluyveromyces marxianus* using a new screening platform. *FEMS Yeast Research*, 21(4), foab026. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab026>
- Dos Santos, L. V., Carazzolle, M. F., Nagamatsu, S. T., Sampaio, N. M. V., Almeida, L. D., Pirolla, R. A. S., Borelli, G., Corrêa, T. L. R., Argueso, J. L., & Pereira, G. A. G. (2016). Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Scientific Reports*, 6(1), 38676. <https://doi.org/10.1038/srep38676>
- Du, J., Li, S., & Zhao, H. (2010). Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. *Molecular BioSystems*, 6(11), 2150. <https://doi.org/10.1039/c0mb00007h>
- Du Preez, J. C., Bosch, M., & Prior, B. A. (1986). The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23(3-4), 228-233. <https://doi.org/10.1007/BF00261920>
- European Environment Agency. (2024). *Greenhouse gas emission intensity of fuels and biofuels for road transport in Europe*. <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/greenhouse-gas-emission-intensity-of>
- Farwick, A., Bruder, S., Schadeweg, V., Oreb, M., & Boles, E. (2014). Engineering of yeast hexose transporters to transport d -xylose without inhibition by d -glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5159-5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323464111>
- Ferreira, D., Nobre, A., Silva, M. L., Faria-Oliveira, F., Tulha, J., Ferreira, C., & Lucas, C. (2013). Xylh encodes a xylose/h+ symporter from the highly related yeast species *debaryomyces fabryi* and *debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 13(7), 585-596. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.1206120>
- Fiamenghi, M. B., Bueno, J. G. R., Camargo, A. P., Borelli, G., Carazzolle, M. F., Pereira, G. A. G., Dos Santos, L. V., & José, J. (2022). Machine learning and comparative genomics approaches for the discovery of xylose transporters in yeast. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02153-7>
- Flick, K. M., Spielwoy, N., Kalashnikova, T. I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.-C., & Wittenberg, C. (2003). Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of rgt1 from hxt gene promoters. *Molecular Biology of the Cell*, 14(8), 3230-3241. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-03-0135>

- Flores, C.-L., Rodríguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 507-529. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x>
- Foncillas, R. P., Sebastiá, M. S., Wallberg, O., Carlquist, M., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2023). Assessment of the TRX2p-yEGFP biosensor to monitor the redox response of an industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Strain during Propagation and Fermentation. *Journal of Fungi*, 9(6), 630. <https://doi.org/10.3390/jof9060630>
- Fonseca, C., Romão, R., Rodrigues De Sousa, H., Hahn-Hägerdal, B., & Spencer-Martins, I. (2007). L-arabinose transport and catabolism in yeast. *The FEBS Journal*, 274(14), 3589-3600. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05892.x>
- Frousnoon, T. B., Pham, N. N., Wu, Z.-Y., Hsieh, P.-H., & Yoshikuni, Y. (2025). Comparison of stress tolerance mechanisms between *Saccharomyces cerevisiae* and the multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii*. *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf024>
- Gancedo, J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 673–704. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x>
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998>
- Ganger, M. T., Dietz, G. D., & Ewing, S. J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5>
- Gao, M., Zhao, Y., Yao, Z., Su, Q., Van Beek, P., & Shao, Z. (2023). Xylose and shikimate transporters facilitates microbial consortium as a chassis for benzyloquinoline alkaloid production. *Nature Communications*, 14(1), 7797. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43049-w>
- Gárdonyi, M., Jeppsson, M., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M. F., & Hahn-Hägerdal, B. (2003). Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 818-824. <https://doi.org/10.1002/bit.10631>
- Geijer, C., Ledesma-Amaro, R., & Tomás-Pejó, E. (2022). Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. *FEMS yeast research*, 22(1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab071>
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Gil Rolón, M., Leonardi, R. J., Bolzico, B. C., Seluy, L. G., Benzzo, M. T., & Comelli, R. N. (2023). Multi-response optimization of thermochemical pretreatment of soybean hulls for 2g-bioethanol production. *Fermentation*, 9(5), 454. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050454>
- Gonçalves, D. L., Matsushika, A., De Sales, B. B., Goshima, T., Bon, E. P., & Stambuk, B. U. (2014). Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme and Microbial Technology*, 63, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.003>
- Gopinarayanan, V. E., & Nair, N. U. (2018a). Pentose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the need to engineer global regulatory systems. *Biotechnology Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201800364>
- Gopinarayanan, V., & Nair, N. U. (2018b). A semi-synthetic regulon enables rapid growth of yeast on xylose. *Nature Communications*, 9(1), 1233. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03645-7>

- Guo, H., Zhao, Y., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2022). Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. *Bioresource Technology*, 361, 127666. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127666>
- Guo, Y., Zhang, Z., Dou, J., Liu, G., Li, X., & Zhao, J. (2023). Structural characterization of corn fiber hemicelluloses extracted by organic solvent and screening of degradation enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 313, 120820. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120820>
- Guzmán, V. M., Leonardi, R. J., Racca, S., & Comelli, R. N. (2024). Assessing process conditions on xylose fermentation in *Spathaspora passalidarum*: Effects of pH, substrate-to-inoculum ratio, temperature, and initial ethanol concentration. *Current Microbiology*, 81(12), 448. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03976-3>
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., & Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., & Prior, B. A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(11), 933-943. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90002-7)
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. En L. Olsson (Ed.), *Biofuels* (Vol. 108, pp. 147-177). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2007_062
- Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B., & Boles, E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology*, 148(9), 2783–2788. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2783>
- Hedbacker, K. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 2408. <https://doi.org/10.2741/2854>
- Hill, J., Donald, K. G., & Griffiths, D. E. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research*, 19(20), 5791. <https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5791>
- Hittinger, C. T., Rokas, A., Bai, F.-Y., Boekhout, T., Gonçalves, P., Jeffries, T. W., Kominek, J., Lachance, M.-A., Libkind, D., Rosa, C. A., Sampaio, J. P., & Kurtzman, C. P. (2015). Genomics and the making of yeast biodiversity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.10.008>
- Hoang, T.-D., & Nghiem, N. (2021). Recent developments and current status of commercial production of fuel ethanol. *Fermentation*, 7(4), 314. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040314>
- Horák, J. (2013). Regulations of sugar transporters: Insights from yeast. *Current Genetics*, 59(1-2), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0388-8>
- Hou, X., & Yao, S. (2012). Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2591-2601. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3693-5>
- Hua, Y., Wang, J., Zhu, Y., Zhang, B., Kong, X., Li, W., Wang, D., & Hong, J. (2019). Release of glucose repression on xylose utilization in *Kluyveromyces marxianus* to enhance glucose-xylose co-utilization and xylitol production from corncob hydrolysate. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1068-2>
- Industry Research. (2024). *Ethanol market size, share | Industry forecast, 2034* [Informe de mercado]. <https://www.industryresearch.biz/market-reports/ethanol-market-103320>

Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)

Isla, M. A., Comelli, R. N., & Seluy, L. G. (2013). Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 136, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.089>

Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., De Bruijn, H., De Waal, P. P., Van Maris, A. J. A., Klaassen, P., & Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: From academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Research*, 17(5). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>

Jeffries, T. W. (1983). Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Pentoses and Lignin* (Vol. 27, pp. 1-32). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BFb0009101>

Jeffries, T. W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.008>

Jeffries, T. W., & Van Vleet, J. R. H. (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Research*, 9(6), 793-807. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00525.x>

Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.-S., Passoth, V., & Richardson, P. M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, 25(3), 319-326. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>

Jessop-Fabre, M. M., Jakočiūnas, T., Stovicek, V., Dai, Z., Jensen, M. K., Keasling, J. D., & Borodina, I. (2016). EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR-Cas9. *Biotechnology Journal*, 11(8), 1110–1117. <https://doi.org/10.1002/biot.201600147>

Jin, Y. S., Laplaza, J. M., & Jeffries, T. W. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6816–6825. <https://doi.org/10.1128/aem.70.11.6816-6825.2004>

Johansson, B., & Hahn-Hagerdal, B. (2002). The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 277-282. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00114-9)

Johnston, M., & Kim, J. (2005). Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 247–252. <https://doi.org/10.1042/bst0330247>

Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>

Jouandot, D. J., II, Roy, A., & Kim, J. (2011). Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (HXT) repressor Rgt1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(11), 3268–3275. <https://doi.org/10.1002/jcb.23253>

Kahlhofer, J., Leon, S., Teis, D., & Schmidt, O. (2021). The α -arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biology of the Cell*, 113(4), 183-219. <https://doi.org/10.1111/boc.202000137>

- Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J. H., & Johnston, M. (2004). Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 3(1), 221–231
- Karagöz, P., & Özkan, M. (2014). Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. *Bioresource Technology*, 158, 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.022>
- Katahira, S., Ito, M., Takema, H., Fujita, Y., Tanino, T., Tanaka, T., Fukuda, H., & Kondo, A. (2008). Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.03.001>
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov068. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>
- Kim, H. J., Kim, B. C., Park, H., Cho, G., Lee, T., Kim, H. T., Bhatia, S. K., & Yang, Y.-H. (2024a). Microbial production of levulinic acid from glucose by engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biotechnology*, 395, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.09.015>
- Kim, J. H., & Rodriguez, R. (2021). Glucose regulation of the paralogous glucose sensing receptors Rgt2 and Snf3 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1865(6), 129881.
- Kim, J. H., Mailloux, L., Bloor, D., Tae, H., Nguyen, H., McDowell, M., Padilla, J., & DeWaard, A. (2024b). Multiple roles for the cytoplasmic C-terminal domains of the yeast cell surface receptors Rgt2 and Snf3 in glucose sensing and signaling. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54628-2>
- Kim, J.-H., Block, D. E., & Mills, D. A. (2010). Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: An optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1077-1085. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2839-1>
- Kim, J.-H., Polish, J., & Johnston, M. (2003). Specificity and regulation of dna binding by the yeast glucose transporter gene repressor rgt1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(15), 5208-5216. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5208-5216.2003>
- Kim, J., & Johnston, M. (2006). Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26144–26149. <https://doi.org/10.1074/jbc.m603636200>
- Kim, J., Bloor, D., Rodriguez, R., Mohler, E., Mailloux, L., Melton, S., & Jung, D. (2022). Casein kinases are required for the stability of the glucose-sensing receptor Rgt2 in yeast. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05569-1>
- Kim, J., Roy, A., Jouandot, D., & Cho, K. H. (2013). The glucose signaling network in yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(11), 5204–5210. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.025>
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J. M., & Nevoigt, E. (2017). Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: Established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, 19(3), 878-893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13617>
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10-26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>

- Knoshaug, E. P., Vidgren, V., Magalhães, F., Jarvis, E. E., Franden, M. A., Zhang, M., & Singh, A. (2015). Novel transporters from *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia guilliermondii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* enable growth on L-arabinose and d -xylose. *Yeast*, 32(10), 615-628. <https://doi.org/10.1002/yea.3084>
- Knudsen, J. D., Carlquist, M., & Gorwa-Grauslund, M. (2014). NADH-dependent biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*: principle and validation at the single cell level. *AMB Express*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0081-4>
- Knychala, M. M., Dos Santos, A. A., Kretzer, L. G., Gelsleichter, F., Leandro, M. J., Fonseca, C., & Stambuk, B. U. (2022). Strategies for efficient expression of heterologous monosaccharide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fungi*, 8(1), 84. <https://doi.org/10.3390/jof8010084>
- Kobayashi, Y., Sahara, T., Ohgiya, S., Kamagata, Y., & Fujimori, K. E. (2018). Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 8(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0670-8>
- Kotter, P., & Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 776-783. <https://doi.org/10.1007/BF00167144>
- Kou, S.-C., Christensen, M. S., & Cirillo, V. P. (1970). Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* ii. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells. *Journal of Bacteriology*, 103(3), 671-678. <https://doi.org/10.1128/jb.103.3.671-678.1970>
- Kretzer, L. G., Knychala, M. M., Da Silva, L. C., Da Fontoura, I. C. C., Leandro, M. J., Fonseca, C., Verstrepen, K. J., & Stambuk, B. U. (2024). Screening and engineering yeast transporters to improve cellobiose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*, 10(9), 490. <https://doi.org/10.3390/fermentation10090490>
- Kruckeberg, A. L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 166(5), 283-292. <https://doi.org/10.1007/s002030050385>
- Kruckeberg, A. L., Ye, L., Berden, J. A., & van Dam, K. (1999). Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *The Biochemical Journal*, 339, 299–307.
- Kumari, P., Mathur, P., Sharma, C., & Chaturvedi, P. (2025). Xylitol production from lignocellulosic biowastes. *Bioresource Technology Reports*, 29, 102025. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102025>
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2010). *The yeasts: A taxonomic study* (5th ed.). Elsevier.
- Kuyper, M., Hartog, M. M. P., Toirkens, M. J., Almering, M. J. H., Winkler, A. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2005). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.010>
- Kwak, S., & Jin, Y. S. (2017). Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microbial Cell Factories*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0694-9>
- Lafuente, M. J., Gancedo, C., Jauniaux, J., & Gancedo, J. M. (2000). Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 35(1), 161–172. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01688.x>

- Lakshmanan, J., Mosley, A. L., & Zcan, S. (2003). Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Current Genetics*, 44(1), 19-25. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0423-2>
- Leandro, M. J., Fonseca, C., & Goncalves, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 511-525. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x>
- Leandro, M. J., Gonçalves, P., & Spencer-Martins, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: First molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochemical Journal*, 395(3), 543-549. <https://doi.org/10.1042/BJ20051465>
- Lee, W.J., Kim, M.D., Ryu, Y.W., Bisson, L.F., Seo, J.H. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1-2), 186-191. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1085-6>
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307-1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Li, B., Wang, L., Xie, J.-Y., Xia, Z.-Y., Xie, C.-Y., & Tang, Y.-Q. (2022). Regulatory mechanism of Haa1p and Tye7p in *Saccharomyces cerevisiae* when fermenting mixed glucose and xylose with or without inhibitors. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01822-4>
- Li, X., Wang, Y., Chen, X., Eisentraut, L., Zhan, C., Nielsen, J., & Chen, Y. (2025). Modular deregulation of central carbon metabolism for efficient xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, 16(1), 4551. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59966-x>
- Lima, C. S., Neitzel, T., De Oliveira Pereira, I., Rabelo, S. C., Lenczak, J. L., Roberto, I. C., & Rocha, G. J. M. (2021). Effect of the sugarcane bagasse deacetylation in the pentoses fermentation process. *BioEnergy Research*, 14(4), 1171-1183. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10243-3>
- Lima, C. S., Neitzel, T., Pirolla, R., Dos Santos, L. V., Lenczak, J. L., Roberto, I. C., & Rocha, G. J. M. (2022). Metabolomic profiling of *Spathaspora passalidarum* fermentations reveals mechanisms that overcome hemicellulose hydrolysate inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), 4075-4089. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11987-y>
- Liu, X., Mortensen, U. H., & Workman, M. (2013). Expression and functional studies of genes involved in transport and metabolism of glycerol in *Pachysolen tannophilus*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-27>
- Liu, X., Jensen, P. R., & Workman, M. (2012). Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresource Technology*, 104, 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.065>
- Llamas, M., Greses, S., Magdalena, J. A., González-Fernández, C., & Tomás-Pejó, E. (2023). Microbial co-cultures for biochemicals production from lignocellulosic biomass: A review. *Bioresource Technology*, 386, 129499. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129499>
- Long, T. M., Su, Y.-K., Headman, J., Higbee, A., Willis, L. B., & Jeffries, T. W. (2012). Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5492-5500. <https://doi.org/10.1128/AEM.00374-12>

- Lu, J., Li, J., Gao, H., Zhou, D., Xu, H., Cong, Y., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2021). Recent progress on bio-succinic acid production from lignocellulosic biomass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 16. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02979-z>
- Maidan, M. M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J. M., & Van Dijck, P. (2005). The g protein-coupled receptor gpr1 and the gα protein gpa2 act through the camp-protein kinase a pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 1971-1986. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0780>
- Mäki-Arvela, P., Salmi, T., Holmbom, B., Willför, S., & Murzin, D. Yu. (2011). Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- a review. *Chemical Reviews*, 111(9), 5638-5666. <https://doi.org/10.1021/cr2000042>
- Mans, R., Daran, J.-M. G., & Pronk, J. T. (2018). Under pressure: Evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.011>
- Martinez-Jimenez, F. D., Neitzel, T., Biazi, L. E., Pereira, I. O., Dos Santos, L. V., Da Costa, A. C., & Ienczak, J. L. (2021). Exploiting the non-conventional yeast *Spathaspora passalidarum* as a platform for hemicellulosic hydrolysate conversion into bioproducts: A mini review. *BioEnergy Research*, 14(2), 689-708. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10257-5>
- Matsushika, A., Goshima, T., & Hoshino, T. (2014). Transcription analysis of recombinant industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals the molecular basis for fermentation of glucose and xylose. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-16>
- Mayr, P., Brüggler, K., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (2000). D-xylose metabolism by candida intermedia: Isolation and characterisation of two forms of aldose reductase with different coenzyme specificities. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 737(1-2), 195-202. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00380-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00380-1)
- Moreira, J. R., Romeiro, V., Fuss, S., Kraxner, F., & Pacca, S. A. (2016). BECCS potential in Brazil: Achieving negative emissions in ethanol and electricity production based on sugar cane bagasse and other residues. *Applied Energy*, 179, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.044>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- McMillan, J. D. (1993). Xylose fermentation to ethanol. A review. <https://doi.org/10.2172/10117941>
- Modig, T., Almeida, J. R. M., Gorwa-Grauslund, M. F., & Lidén, G. (2008). Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(3), 423-429. <https://doi.org/10.1002/bit.21789>
- Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M., & Valen, E. (2014). CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic acids research*, 42(Web Server issue), W401–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gku410>
- Moon, J., Lewis Liu, Z., Ma, M., & Slininger, P. J. (2013). New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.005>

- Moon, S. Y., An, N.-Y., & Lee, J. Y. (2025). Transforming non-conventional yeasts into key players in biotechnology: Advances in synthetic biology applications. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1600187. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1600187>
- Morales, P., Gentina, J. C., Aroca, G., & Mussatto, S. I. (2017). Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of Eucalyptus globulus. *Industrial Crops and Products*, *106*, 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.023>
- Moriya, H., & Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(6), 1572–1577. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305901101>
- Morrissey, J. P., Etschmann, M. M. W., Schrader, J., & De Billerbeck, G. M. (2015). Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*, *32*(1), 3-16. <https://doi.org/10.1002/yea.3054>
- Moysés, D., Reis, V., Almeida, J., Moraes, L., & Torres, F. (2016). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 207. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- My, R., Gupte, A. P., Bizzotto, E., Frizzarin, M., Antoniali, P., Campanaro, S., & Favaro, L. (2025). Unveiling the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* strains for lignocellulosic bioethanol: A genomic exploration through fermentation stress tests. *New Biotechnology*, *85*, 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2024.12.004>
- Nair, L. G., & Verma, P. (2025). Harnessing carbon potential of lignocellulosic biomass: Advances in pretreatments, applications, and the transformative role of machine learning in biorefineries. *Bioresources and Bioprocessing*, *12*(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s40643-025-00935-z>
- Nakanishi, S. C., Soares, L. B., Biazi, L. E., Nascimento, V. M., Costa, A. C., Rocha, G. J. M., & Ienczak, J. L. (2017). Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*(10), 2211-2221. <https://doi.org/10.1002/bit.26357>
- Nalabothu, R. L., Fisher, K. J., LaBella, A. L., Meyer, T. A., Oplente, D. A., Wolters, J. F., Rokas, A., & Hittinger, C. T. (2023). Codon optimization improves the prediction of xylose metabolism from gene content in budding yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, *40*(6), msad111. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad111>
- Naseeruddin, S., Desai, S., & Venkateswar Rao, L. (2021). Co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* (Vs3) and *Pichia stipitis* (NCIM 3498) enhances bioethanol yield from concentrated *Prosopis juliflora* hydrolysate. *3 Biotech*, *11*(1), 21. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02595-6>
- Ndubuisi, I. A., Amadi, C. O., Nwagu, T. N., Murata, Y., & Ogbonna, J. C. (2023). Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second-generation bioethanol. *Biotechnology Advances*, *63*, 108100. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108100>
- Nguyen, N. H., Suh, S.-O., Marshall, C. J., & Blackwell, M. (2006). Morphological and ecological similarities: Wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycological Research*, *110*(10), 1232-1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.002>

- Nijland, J. G., Shin, H. Y., De Jong, R. M., De Waal, P. P., Klaassen, P., & Driessen, A. J. (2014). Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0168-9>
- Nijland, J. G., Shin, H. Y., De Waal, P. P., Klaassen, P., & Driessen, A. J. M. (2018). Increased xylose affinity of Hxt2 through gene shuffling of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 503-510. <https://doi.org/10.1111/jam.13670>
- Nijland, J. G., & Driessen, A. J. M. (2020). Engineering of pentose transport in *Saccharomyces cerevisiae* for biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 464. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00464>
- Nijland, J. G., Vos, E., Shin, H. Y., De Waal, P. P., Klaassen, P., & Driessen, A. J. M. (2016). Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0573-3>
- O'Donnell, A. F., McCartney, R. R., Chandrashekarappa, D. G., Zhang, B. B., Thorner, J., & Schmidt, M. C. (2015). 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*, 35(6), 939-955. <https://doi.org/10.1128/MCB.01183-14>
- Opulente, D. A., Rollinson, E. J., Bernick-Roehr, C., Hulfachor, A. B., Rokas, A., Kurtzman, C. P., & Hittinger, C. T. (2018). Factors driving metabolic diversity in the budding yeast subphylum. *BMC Biology*, 16(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0498-3>
- Osiro, K. O., Borgström, C., Brink, D. P., Fjölnisdóttir, B. L., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2019). Exploring the xylose paradox in *Saccharomyces cerevisiae* through in vivo sugar signalomics of targeted deletants. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1141-x>
- Osiro, K. O., Brink, D. P., Borgström, C., Wasserstrom, L., Carlquist, M., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2018). Assessing the effect of d-xylose on the sugar signaling pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in strains engineered for xylose transport and assimilation. *FEMS Yeast Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox096roj>
- Ozcan, S. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(9), 2566–2573. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2566>
- Özcan, S., & Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1564–1572. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.3.1564>
- Özcan, S., & Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 554-569. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.554-569.1999>
- Özcan, S., Dover, J., & Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 17(9), 2566–2573. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2566>
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wöfl, S., & Johnston, M. (1996). 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*, 93(22), 12428–12432. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12428>
- Pacheco, T. F., Machado, B. R. C., De Morais Júnior, W. G., Almeida, J. R. M., & Gonçalves, S. B. (2021). Enhanced tolerance of *Spathaspora passalidarum* to sugarcane bagasse hydrolysate

for ethanol production from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(7), 2182-2197. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03544-6>

Palomino, A. (2006). Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1427-1438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl028>

Parapouli, M., Vasileiadi, A., Afendra, A., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Passoth, V., Zimmermann, M., & Klinner, U. (1996). Peculiarities of the regulation of fermentation and respiration in the crabtree-negative, xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58(1), 201-212. <https://doi.org/10.1007/BF02941701>

Peeters, K., & Thevelein, J. M. (2014). Glucose sensing and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. En J. Piškur & C. Compagno (Eds.), *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* (pp. 21-56). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3_2

Peeters, K., Van Leemputte, F., Fischer, B., Bonini, B. M., Quezada, H., Tsytlonok, M., Haesen, D., Vanthienen, W., Bernardes, N., Gonzalez-Blas, C. B., Janssens, V., Tompa, P., Versées, W., & Thevelein, J. M. (2017). Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01019-z>

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., & Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology*, 21(8), 921-926. <https://doi.org/10.1038/nbt849>

Periyasamy, S., Beula Isabel, J., Kavitha, S., Karthik, V., Mohamed, B. A., Gizaw, D. G., Sivashanmugam, P., & Aminabhavi, T. M. (2023). Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review. *Chemical Engineering Journal*, 453, 139783. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139783>

Persson, V. C., Perruca Foncillas, R., Anderes, T. R., Ginestet, C., & Gorwa-Grauslund, M. (2023). Impact of xylose epimerase on sugar assimilation and sensing in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying different xylose-utilization pathways. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02422-z>

Petropavlovskiy, A. A., Tauro, M. G., Lajoie, P., & Duennwald, M. L. (2020). A quantitative imaging-based protocol for yeast growth and survival on agar plates. *STAR Protocols*, 1(3), 100182. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100182>

Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>

Pianale, L. T., Rugbjerg, P., & Olsson, L. (2022). Real-Time monitoring of the yeast intracellular state during bioprocesses with a toolbox of biosensors. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.802169>

Pinheiro, L. P., Longati, A. A., Elias, A. M., Perez, C. L., Pereira, L. P. R. D. C., Zangirolami, T. C., Furlan, F. F., Giordano, R. D. C., & Milessi, T. S. (2025). Improving the feasibility of 2g ethanol production from lignocellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast: A technical-economic analysis and life cycle assessment. *Fermentation*, 11(3), 116. <https://doi.org/10.3390/fermentation11030116>

Polish, J. A., Kim, J.-H., & Johnston, M. (2005). How the rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics*, 169(2), 583-594. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.034512>

- Racca, S., Leonardi, R. J., & Comelli, R. N. (2025). New insights into carbon metabolism in *Spathaspora passalidarum* for second-generation ethanol production. *Frontiers in Fungal Biology*, 6, 1657121. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2025.1657121>
- Rafieenia, R., Atkinson, E., & Ledesma-Amaro, R. (2022). Division of labor for substrate utilization in natural and synthetic microbial communities. *Current Opinion in Biotechnology*, 75, 102706. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102706>
- Rafieenia, R., Klemm, C., Hapeta, P., Fu, J., García, M. G., & Ledesma-Amaro, R. (2025). Designing synthetic microbial communities with the capacity to upcycle fermentation byproducts to increase production yields. *Trends in Biotechnology*, 43(3), 601-619. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.10.015>
- Rapier, R. (2024). Global oil consumption hits historic 100 million barrels per day milestone. *OilPrice.com*. <https://oilprice.com/Energy/Crude-Oil/Global-Oil-Consumption-Hits-Historic-100-Million-Barrels-Per-Day-Milestone.html>
- Reifenberger, E., Boles, E., & Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, 245(2), 324-333. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00324.x>
- Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., De Souza, G. B., Mendonça, J. G. P., Rosa, C. A., Mendes, T. A. O., Santana, M. F., Da Silveira, W. B., & Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*, 157, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>
- Richard, P., Putkonen, M., Väänänen, R., Londesborough, J., & Penttilä, M. (2002). The missing link in the fungal l-arabinose catabolic pathway, identification of the l-xylulose Reductase Gene. *Biochemistry*, 41(20), 6432-6437. <https://doi.org/10.1021/bi025529i>
- Riley, R., Haridas, S., Wolfe, K. H., Lopes, M. R., Hittinger, C. T., Göker, M., Salamov, A. A., Wisecaver, J. H., Long, T. M., Calvey, C. H., Aerts, A. L., Barry, K. W., Choi, C., Clum, A., Coughlan, A. Y., Deshpande, S., Douglass, A. P., Hanson, S. J., Klenk, H.-P., ... Jeffries, T. W. (2016). Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(35), 9882-9887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603941113>
- Roell, G. W., Zha, J., Carr, R. R., Koffas, M. A., Fong, S. S., & Tang, Y. J. (2019). Engineering microbial consortia by division of labor. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1083-3>
- Rojas, S. a. T., Schadeweg, V., Kirchner, F., Boles, E., & Oreb, M. (2021a). Identification of a glucose-insensitive variant of Gal2 from *Saccharomyces cerevisiae* exhibiting a high pentose transport capacity. *Scientific Reports*, 11(1), 24404. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03822-7>
- Rojas, S. a. T., Schmidl, S., Boles, E., & Oreb, M. (2021b). Glucose-induced internalization of the *S. cerevisiae* galactose permease Gal2 is dependent on phosphorylation and ubiquitination of its aminoterminal cytoplasmic tail. *FEMS Yeast Research*, 21(3). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab019>
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(5), 310-317. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01805-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01805-9)

- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 183–201. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00084.x>
- Rose, M., Albig, W., & Entian, K. (1991). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *European Journal of Biochemistry*, 199(3), 511–518. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16149.x>
- Rosero-Chasoy, G., Rodríguez-Jasso, R. M., Aguilar, C. N., Buitrón, G., Chairez, I., & Ruiz, H. A. (2021). Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation – an overview. *Bioresource Technology*, 321, 124458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124458>
- Roy, A., Kim, Y. B., Cho, K. H., & Kim, J. H. (2014). Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9), 2878–2885. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.004>
- Roy, A., Shin, Y. J., Cho, K. H., & Kim, J.-H. (2013). Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt1. *Molecular Biology of the Cell*, 24(9), 1493-1503. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-01-0047>
- Ruchala, J., & Sibirny, A. A. (2021). Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa069>
- Runquist, D., Hahn-Hägerdal, B., & Rådström, P. (2010). Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-5>
- Saengphing, T., Sattayawat, P., Kalawil, T., Suwannarach, N., Kumla, J., Yamada, M., Panbangred, W., & Rodrussamee, N. (2024). Improving furfural tolerance in a xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* CMUWF1–2 via adaptive laboratory evolution. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02352-x>
- Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O. V., Sibirny, A. A., Penttilä, M., & Ruohonen, L. (2007). Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 1041-1052. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0747-1>
- Salusjärvi, L., Kankainen, M., Soliymani, R., Pitkänen, J. P., Penttilä, M., & Ruohonen, L. (2008). Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-18>
- Salusjärvi, L., Pitkänen, J. P., Aristidou, A., Ruohonen, L., & Penttilä, M. (2006). Transcription Analysis of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Novel Responses to Xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128(3), 237–274. <https://doi.org/10.1385/abab:128:3:237>
- Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270-5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
- Sandoval-Nuñez, D., Romero-Gutiérrez, T., Gómez-Márquez, C., Gshaedler, A., Arellano-Plaza, M., & Amaya-Delgado, L. (2023). Physiological and transcriptome analyses of *Kluyveromyces marxianus* reveal adaptive traits in stress response. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(4), 1421-1438. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12354-7>

- Sandri, J. P., Milessi, T. S., Zangirolami, T. C., & Mussatto, S. I. (2023). Screening of yeast co-culture using crude hydrolysate for co-fermentation of pentose and hexose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 17(6), 1639-1653. <https://doi.org/10.1002/bbb.2529>
- Scharff-Poulsen, P., Moriya, H., & Johnston, M. (2018). Genetic analysis of signal generation by the Rgt2 glucose sensor of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 8(8), 2685–2696. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200338>
- Schmidt, M. C., McCartney, R. R., Zhang, X., Tillman, T. S., Solimeo, H., Wöfl, S., Almonte, C., & Watkins, S. C. (1999). Std1 and Mth1 Proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 4561–4571. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.7.4561>
- Schothorst, J., Kankipati, H. N., Conrad, M., Samyn, D. R., Van Zeebroeck, G., Popova, Y., Rubio-Teixeira, M., Persson, B. L., & Thevelein, J. M. (2013). Yeast nutrient transceptors provide novel insight in the functionality of membrane transporters. *Current Genetics*, 59(4), 197–206. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0413-y>
- Secretaría de Energía de la Nación. (2008). *Energía Biomasa – Energías Renovables* [Informe]. Argentina. https://www.energia.gov.ar/contenidos/archivos/publicaciones/libro_energia_biomasa.pdf
- Sedlak, M., & Ho, N. W. Y. (2004). Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces yeast*. *Yeast*, 21(8), 671-684. <https://doi.org/10.1002/yea.1060>
- Sen, A., Acosta-Sampson, L., Alvaro, C. G., Ahn, J. S., Cate, J. H. D., & Thorner, J. (2016). Internalization of heterologous sugar transporters by endogenous α -arrestins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7074-7085. <https://doi.org/10.1128/AEM.02148-16>
- Senatham, S., Chamduang, T., Kaewchingduang, Y., Thammasittirong, A., Srisodsuk, M., Elliston, A., Roberts, I. N., Waldron, K. W., & Thammasittirong, S. N.-R. (2016). Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. *SpringerPlus*, 5(1), 1040. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2713-4>
- Sethupathy, S., Murillo Morales, G., Gao, L., Wang, H., Yang, B., Jiang, J., Sun, J., & Zhu, D. (2022). Lignin valorization: Status, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 347, 126696. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126696>
- Sharma, S., & Arora, A. (2020). Tracking strategic developments for conferring xylose utilization/fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01590-9>
- Shin, H. Y., Nijland, J. G., De Waal, P. P., & Driessen, A. J. M. (2017). The amino-terminal tail of Hxt11 confers membrane stability to the Hxt2 sugar transporter and improves xylose fermentation in the presence of acetic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(9), 1937-1945. <https://doi.org/10.1002/bit.26322>
- Shin, J., Liao, S., Kuanyshev, N., Xin, Y., Kim, C., Lu, T., & Jin, Y.-S. (2024). Compositional and temporal division of labor modulates mixed sugar fermentation by an engineered yeast consortium. *Nature Communications*, 15(1), 781. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45011-w>
- Signori, L., Passolunghi, S., Ruohonen, L., Porro, D., & Branduardi, P. (2014). Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-51>

- Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2012). Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, *37*(1), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.032>
- Skoog, K., & Hahn-Hägerdal, B. (1988). Xylose fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *10*(2), 66-80. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90001-4)
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., Van Cauwenberge, J. E., & Kurtzman, C. P. (1982). Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*, *24*(2), 371-384. <https://doi.org/10.1002/bit.260240210>
- Snowdon, C., & Johnston, M. (2016). A novel role for yeast casein kinases in glucose sensing and signaling. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(21), 3369–3375. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-05-0342>
- Soares, L. B., Bonan, C. I. D. G., Biazzi, L. E., Dionísio, S. R., Bonatelli, M. L., Andrade, A. L. D., Renzano, E. C., Costa, A. C., & Ienczak, J. L. (2020). Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-*Saccharomyces* species. *Biomass and Bioenergy*, *137*, 105549. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105549>
- Sreenivas, K., Eisentraut, L., Brink, D. P., Persson, V. C., Carlquist, M., Gorwa-Grauslund, M. F., & Van Niel, E. W. J. (2024). Evaluation of pyrophosphate-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Microorganisms*, *12*(3), 625. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030625>
- Stambuk, B. U., Franden, M. A., Singh, A., & Zhang, M. (2003). D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, *105-108*, 255–263. <https://doi.org/10.1385/abab:106:1-3:255>
- Stasyk, O. G., & Stasyk, O. V. (2019). Glucose sensing and regulation in yeasts. In *Springer eBooks* (pp. 477–519). https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_14
- Stepchenkova, E. I., Zadorsky, S. P., Shumega, A. R., & Aksenova, A. Y. (2023). Practical approaches for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome modification. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(15), 11960. <https://doi.org/10.3390/ijms241511960>
- Stovicek, V., Borodina, I., & Forster, J. (2015). CRISPR–Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metabolic Engineering Communications*, *2*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2015.03.001>
- Su, Y., Willis, L. B., & Jeffries, T. W. (2015). Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(3), 457-469. <https://doi.org/10.1002/bit.25445>
- Subtil, T., & Boles, E. (2011). Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotechnology for Biofuels*, *4*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-38>
- Subtil, T., & Boles, E. (2012). Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, *5*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-14>
- Sun, D., Wu, L., Lu, X., Li, C., Xu, L., Li, H., He, D., Yu, A., Yu, T., Zhao, J., Tang, H., & Bao, X. (2025). Engineering transcriptional regulatory networks for improving second-generation fuel ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *10*(1), 207-217. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2024.10.006>

- Taxis, C., & Knop, M. (2006). System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques*, 40(1), 73–78. <https://doi.org/10.2144/000112040>
- Tellechea-Luzardo, J., Stiebritz, M. T., & Carbonell, P. (2023). Transcription factor-based biosensors for screening and dynamic regulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1118702. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1118702>
- Toivari, M. H., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., & Penttilä, M. (2004). Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3681-3686. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3681-3686.2004>
- Tomás-Cobos, L., Casadomé, L., Mas, G., Sanz, P., & Posas, F. (2004). Expression of the *HXT1* low affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the hog and glucose signalling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22010-22019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400609200>
- Trichez, D., Steindorff, A. S., Soares, C. E. V. F., Formighieri, E. F., & Almeida, J. R. M. (2019). Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. *FEMS Yeast Research*, 19(4), foz034. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz034>
- Trichez, D., Steindorff, A. S., De Morais Júnior, W. G., Vilela, N., Bergmann, J. C., Formighieri, E. F., Gonçalves, S. B., & De Almeida, J. R. M. (2023). Identification of traits to improve co-assimilation of glucose and xylose by adaptive evolution of *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(4), 1143-1157. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12362-1>
- Varela, J. A., Gethins, L., Stanton, C., Ross, P., & Morrissey, J. P. (2017). Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. En T. Satyanarayana & G. Kunze (Eds.), *Yeast Diversity in Human Welfare* (pp. 439-453). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_17
- Vasylyshyn, R., Kurylenko, O., Ruchala, J., Shevchuk, N., Kuliesiene, N., Khroustalyova, G., Rapoport, A., Daugelavicius, R., Dmytruk, K., & Sibirny, A. (2020). Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 96.
- Vasylyshyn, R., Ruchala, J., Dmytruk, K., & Sibirny, A. (2025). Recent progress in engineering yeast producers of cellulosic ethanol. *FEMS Yeast Research*, 25. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf035>
- Veras, H. C. T., Campos, C. G., Nascimento, I. F., Abdelnur, P. V., Almeida, J. R. M., & Parachin, N. S. (2019). Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts. *BMC Biotechnology*, 19(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0548-0>
- Veras, H. C. T., Parachin, N. S., & Almeida, J. R. M. (2017). Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0766-x>
- Verhoeven, M. D., de Valk, S. C., Daran, J. G., van Maris, A. J. A., & Pronk, J. T. (2018). Fermentation of glucose-xylose-arabinose mixtures by a synthetic consortium of single-sugar-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS yeast research*, 18(8), 10.1093/femsyr/foy075. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy075>

- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., & Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the SNF1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes & Development*, 15(9), 1104–1114. <https://doi.org/10.1101/gad.879301>
- Wagner, E. R., & Gasch, A. P. (2023). Advances in *Saccharomyces cerevisiae* engineering for xylose fermentation and biofuel production: Balancing growth, metabolism, and defense. *Journal of Fungi*, 9(8), 786. <https://doi.org/10.3390/jof9080786>
- Wagner, E. R., Myers, K. S., Riley, N. M., Coon, J. J., & Gasch, A. P. (2019). PKA and HOG signaling contribute separable roles to anaerobic xylose fermentation in yeast engineered for biofuel production. *PLOS ONE*, 14(5), e0212389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212389>
- Wahlbom, C., Vanzyl, W., Jonsson, L., Hahn-Hagerdal, B., & Otero, R. (2003). Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. *FEMS Yeast Research*, 3(3), 319-326. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00206-4)
- Wang, C., Bao, X., Li, Y., Jiao, C., Hou, J., Zhang, Q., Zhang, W., Liu, W., & Shen, Y. (2015). Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. *Metabolic Engineering*, 30, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.04.007>
- Wang, C., Li, Y., Qiu, C., Wang, S., Ma, J., Shen, Y., Zhang, Q., Du, B., Ding, Y., & Bao, X. (2017). Identification of important amino acids in Gal2p for improving the l-arabinose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01391>
- Wang, L., Wang, A., Wang, D., & Hong, J. (2023). The novel properties of *Kluyveromyces marxianus* glucose sensor/receptor repressor pathway and the construction of glucose repression-released strains. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02138-7>
- Wang, Y., Ren, Y. C., Zhang, Z. T., Ke, T., & Hui, F. L. (2016). *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabaeid beetle *Allomyrina dichotoma*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 2008–2012. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000979>
- Weierstall, T., Hollenberg, C. P., & Boles, E. (1999). Cloning and characterization of three genes (*SUT1–3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Molecular Microbiology*, 31(3), 871-883. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01224.x>
- Westholm, J. O., Nordberg, N., Murén, E., Ameer, A., Komorowski, J., & Ronne, H. (2008). Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3. *BMC Genomics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-601>
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., & Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 464(3), 123–128. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01698-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01698-1)
- Wisselink, H. W., Cipollina, C., Oud, B., Crimi, B., Heijnen, J. J., Pronk, J. T., & Van Maris, A. J. A. (2010). Metabolome, transcriptome and metabolic flux analysis of arabinose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 12(6), 537-551. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.08.003>
- Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., Del Rosario Franco Berriel, M., Winkler, A. A., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T., & Van Maris, A. J. A. (2007). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4881-4891. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-07>

- Wu, M., Li, H., Wei, S., Wu, H., Wu, X., Bao, X., Hou, J., Liu, W., & Shen, Y. (2020). Simulating extracellular glucose signals enhances xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 8(1), 100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010100>
- Yamaoka, C., Kurita, O., & Kubo, T. (2014). Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. *Microbiological Research*, 169(12), 907-914. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.04.007>
- Yan, N. (2015). Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 257-283. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>
- Yan, N., Luan, T., Yin, M., Niu, Y., Wu, L., Yang, S., Li, Z., Li, H., Zhao, J., & Bao, X. (2023). Co-fermentation of glucose–xylose–cellobiose–XOS mixtures using a synthetic consortium of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Fermentation*, 9(8), 775. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080775>
- Ye, L., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., & Van Dam, K. (1999). Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *Journal of Bacteriology*, 181(15), 4673-4675. <https://doi.org/10.1128/JB.181.15.4673-4675.1999>
- Youk, H., & Van Oudenaarden, A. (2009). Growth landscape formed by perception and import of glucose in yeast. *Nature*, 462(7275), 875-879. <https://doi.org/10.1038/nature08653>
- Young, E. M., Comer, A. D., Huang, H., & Alper, H. S. (2012). A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 14(4), 401-411. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.03.004>
- Young, E. M., Tong, A., Bui, H., Spofford, C., & Alper, H. S. (2014). Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 131-136. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311970111>
- Young, E., Poucher, A., Comer, A., Bailey, A., & Alper, H. (2011). Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3311-3319. <https://doi.org/10.1128/AEM.02651-10>
- Yu, J., Li, C., Cheng, Y., Guo, S., Lu, H., Xie, X., Ji, H., & Qiao, Y. (2025). Mechanism and improvement of yeast tolerance to biomass-derived inhibitors: A review. *Biotechnology Advances*, 81, 108562. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2025.108562>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 751-774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zeng, W., Tang, Y., Gou, M., Xia, Z., & Kida, K. (2016). Transcriptomes of a xylose-utilizing industrial flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain cultured in media containing different sugar sources. *AMB Express*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0223-y>
- Zhao, X., Tang, J., Wang, X., Yang, R., Zhang, X., Gu, Y., Li, X., & Ma, M. (2015). Ynl134c from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity for detoxification of furfural derived from lignocellulosic biomass. *Yeast*, 32(5), 409-422. <https://doi.org/10.1002/yea.3068>
- Zhao, Z., Xian, M., Liu, M., & Zhao, G. (2020). Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>
- Zhou, Q., Son, K., Liu, Y., & Revzin, A. (2015). Biosensors for cell analysis. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(1), 165-190. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040525>

Zoghiami, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7, 874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

