



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Maria Luíza Rodrigues Albarello

Análise da produção simultânea de etanol e xilitol por leveduras do intestino da lagarta
Spodoptera frugiperda

Florianópolis

2023

Maria Luíza Rodrigues Albarello

Análise da produção simultânea de etanol e xilitol por leveduras do intestino da lagarta
Spodoptera frugiperda

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Sérgio Luiz Alves Júnior, Dr.
Coorientador: Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.

Florianópolis

2023

Albarelo, Maria Luíza Rodrigues

Análise da produção simultânea de etanol e xilitol por leveduras do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda* / Maria Luíza Rodrigues Albarelo ; orientador, Sérgio Luiz Alves Júnior, coorientador, Boris Juan Ugart Stambuk , 2023.

82 p.

2. leveduras. 3. xilitol. 4. etanol. 5. biorrefinarias. I. Júnior, Sérgio Luiz Alves. II. Stambuk , Boris Juan Ugart. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Maria Luíza Rodrigues Albarello

Análise da produção simultânea de etanol e xilitol por leveduras do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda*

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 26/06/2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

[Não é necessária a assinatura dos membros]

Prof. Thiago O. Basso, Dr.(a)

Instituição USP

Prof. Rubens Duarte, Dr.(a)

Instituição UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

Prof. Aguinaldo R. Pinto, Dr, Coordenador do PPGBTC

Prof. Sérgio Luiz Alves Jr. Dr.(a)

Florianópolis, 2023

Para minha Olginha.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Jean, por toda a ajuda e companheirismo durante esse processo; tu és o meu maior presente.

Às minhas gatinhas por todo o amor dado diariamente e aos meus ratinhos.

Aos meus pais Valdeneia e Luiz Augusto pelo incentivo e estímulo à educação dados desde pequena.

Aos meus colegas do LBMBL por toda a ajuda neste período.

Aos meus amigos Redson, Fernanda, Henrique, Luísa, Viviani, Eduardo, Luan por todo o apoio nesse período; vocês são a família que eu escolhi.

Aos meus sogros por todo o exemplo e apoio; amo vocês.

Ao meu orientador pela paciência, dedicação e apoio dado durante esses dois anos; eu aprendi muito contigo, muito obrigada.

Ao meu coorientador pelo exemplo durante todo o período.

À Capes pelo apoio financeiro.

Heal the world, make it a better place, for you and for me and the entire human race.

(Michael Jackson, 1995)

RESUMO

Para transpor dificuldades que ainda existem nas biorrefinarias quanto à sacarificação de compostos lignocelulósicos e rendimento na produção de bioprodutos derivados de pentoses, este estudo explorou o potencial biotecnológico de leveduras encontradas no intestino de larvas de *Spodoptera frugiperda* para a produção simultânea de etanol e xilitol em biorrefinarias de segunda geração (2G). Foram isoladas 46 cepas de leveduras com capacidade de crescimento em meios contendo xilose, das quais 14 foram capazes de hidrolisar celulose e 3 apresentaram atividade xilanolítica. Duas cepas, *Papiliotrema laurentii* CHAP-158 e *Meyerozyma caribbica* CHAP-204, destacaram-se por apresentar alto rendimento e produtividade de biomassa celular em diferentes condições de cultivo, sendo que *M. caribbica* também apresentou alta produtividade de etanol e xilitol em meios que simulam as condições observadas em biorrefinarias 2G e *P. laurentii* apresentou maior atividade xilanolítica. Utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) variando pH e concentração de açúcar, foi possível determinar a condição otimizada (uma faixa de concentração de açúcar de 55-85 g/L e entre valores de pH de 6,0 a 8,5) para a produção simultânea de etanol e xilitol. Avaliou-se também o potencial das leveduras *P. laurentii* e *M. caribbica*, consorciadas e separadamente, para produzir etanol e xilitol a partir de meios contendo carboximetilcelulose (CMC) e xilana. Os dados obtidos em consórcio demonstraram que, enquanto a *P. laurentii* hidrolizava a xilana, a *M. caribbica* produzia xilitol a partir da xilose.

Palavras-chave: xilana, celulose, biorrefinarias; *Papiliotrema laurentii*; *Meyerozyma caribbica*.

ABSTRACT

To overcome the remaining challenges in lignocellulosic compound saccharification and pentose-derived bioproduct production efficiency in biorefineries, this study explored the biotechnological potential of yeasts found in the gut of *Spodoptera frugiperda* larvae for the simultaneous production of ethanol and xylitol in second-generation (2G) biorefineries. Forty-six yeast strains capable of growing in xylose-containing media were isolated, of which 14 were able to hydrolyze cellulose and 3 exhibited xylanolytic activity. Two strains, *Papiliotrema laurentii* CHAP-158 and *Meyerozyma caribbica* CHAP-204, stood out for their high yield and productivity of cell biomass under different cultivation conditions. *M. caribbica* also demonstrated high productivity of ethanol and xylitol under conditions simulating those found in 2G biorefineries, while *P. laurentii* showed greater xylanolytic activity. Using a Central Composite Rotatable Design (CCRD) with pH and sugar concentration as variables, the optimized condition (a sugar concentration range of 55-85 g/L and pH values between 6.0 and 8.5) for simultaneous ethanol and xylitol production was determined. The potential of *P. laurentii* and *M. caribbica*, both individually and in a consortium, to produce ethanol and xylitol from carboxymethylcellulose (CMC) and xylan-containing media was also evaluated. The data obtained in consortium showed that, while *P. laurentii* provided xylan hydrolysis, *M. caribbica* produced xylitol from xylose

Keywords: xylan, cellulose, biorefineries; *Papiliotrema laurentii*; *Meyerozyma caribbica*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Decomposição da xilana para formação da xilose.....	21
Figura 1.2 - Formação de etanol e xilitol na célula de levedura.....	23
Figura 1.3 - Representação esquemática da parede celular da célula vegetal (bagaço da cana-de-açúcar). Porcentagens em peso de matéria seca.....	27
Figura 2.1 - Cellulase (white bars) and xylanase (black bars) activity by the forty-six strains	46
Figura 2.2 - Screening xylose-assimilating yeasts in the forty-six armyworm-isolated yeasts	48
Figura 2.3 - Cellular growth curves by the fourteen strains subjected to the CCRD in microscale culture summarized in Table 2.1.....	49
Figura 2.4 - Pareto charts of standardized effects (calculated t) of the studied variables (x1, sugar concentration; x2, pH) for cellular-biomass yield by strains CHAP-158 (A) and CHAP-204 (B), considering a significance level of 5%.....	54
Figura 2.5 - Phylogenetic tree assembled from the variable domains D1/D2 of large subunit (LSU) rRNA gene from CHAP-158 (A) and CHAP-204 (B) and forty-eight closely-related type strains.....	55
Figura 2.6 - Sugar consumption, ethanol production, and xylitol accumulation curves by <i>P. laurentii</i> CHAP-158 subjected to the CCRD in batch fermentation summarized in Table 2.1.....	57
Figura 2.7 - Sugar consumption, ethanol production, and xylitol accumulation curves by <i>M. caribbica</i> CHAP-204 subjected to the CCRD in batch fermentation summarized in Table 2.1.....	58
Figura 2.8 - Response surfaces of the studied variables (x1, sugar concentration; x2, pH) for ethanol (A) and xylitol (B) yields by the strain <i>M. caribbica</i> CHAP-204.....	59
Figura 3.1 - Crescimento das cepas. a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204	73
Figura 3.2 - Consumo de glicose e xilose pelas cepas, onde: a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204	74
Figura 3.3 - Produção de etanol e xilitol pelas cepas, onde: a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. - Quantidade de hemicelulose e celulose em resíduos agrícolas.....	28
Tabela 2.1 - Central Composite Rotatable Design (CCRD) matrix with two independent variables (sugar concentration and pH) for the microscale cellular growth and batch fermentation assays	44
Tabela 2.2 - Cellular biomass yield and productivity by the fourteen strains subjected to the CCRD in microscale culture	55

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1.1 Biorrefinarias.....	17
1.1.2 Insegurança alimentar vs produção de bioprodutos a partir de biomassa vegetal..	18
1.1.3 Resíduos lignocelulósicos.....	18
1.1.4 Etanol e xilitol.....	21
1.1.5 Prospecção de leveduras em insetos herbívoros.....	28
1.2 JUSTIFICATIVA.....	29
1.3 OBJETIVOS.....	29
1.3.1 Objetivo geral.....	29
1.3.2 Objetivos específicos.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
2 CAPÍTULO II - ANALYSIS OF THE HOLOCELLULOLYTIC AND FERMENTATIVE POTENTIALS OF YEASTS ISOLATED FROM THE GUT OF <i>Spodoptera frugiperda</i> LARVAE – ARTIGO PUBLICADO NO PERIODICO BIOENERGY RESEARCH - HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S12155-023-10616-4..	36
2.1 INTRODUCTION.....	39
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	40
2.2.1 Insect source.....	40
2.2.2 Yeast isolation and identification.....	40
2.2.3 Culture conditions and enzyme activity analyses.....	42
2.2.4 Screening xylose-assimilating yeasts.....	43
2.2.5 Microscale cellular growth.....	43
2.2.6 Batch fermentation.....	44
2.2.7 Analytical methods.....	45
2.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	45
2.3.1 Yeast isolation and enzymatic analysis.....	45
2.3.2 Xylose-assimilating yeasts.....	48
2.3.3 CCRD in microscale culture.....	48
2.3.4 CCRD in batch fermentation.....	56

2.4 CONCLUSION.....	61
REFERENCES.....	62
3 CAPÍTULO III - ANÁLISE DAS LEVEDURAS EM CONSÓRCIO.....	68
3.1 INTRODUÇÃO.....	69
3.2 METODOLOGIA.....	70
3.2.1 Preparação do inóculo.....	70
3.2.2 Preparação dos meios com CMC e xilana.....	70
3.2.3 Fermentação das cepas CHAP-158 e CHAP-204.....	70
3.2.4 Análise dos compostos produzidos por HPLC.....	71
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
4 CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
APÊNDICE A – Resumo publicado no Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada e VI Encontro Latinoamericano de Microbiologia Aplicada.....	80
APÊNDICE B – Artigo submetido para publicação no periódico Energy Nexus.....	81

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Biorrefinarias

As biorrefinarias têm a capacidade de converter biomassa em biocombustíveis e bioprodutos úteis, o que é uma grande vantagem em relação aos combustíveis fósseis. A introdução do termo "biorrefinaria" na década de 1990 foi uma resposta às tendências da indústria. O objetivo era diversificar os insumos e produtos, além de aproveitar as vantagens econômicas e de produção. As biorrefinarias usam tecnologias de processamento como fermentação, gaseificação, pirólise e hidrólise, que são componentes chave do processo (OECD, 2018).

A sustentabilidade das biorrefinarias se deve à integração de diferentes níveis, que permitem a diversificação dos insumos e produtos, além de benefícios econômicos e ambientais. A conversão de resíduos de biomassa em produtos de valor agregado também é uma grande vantagem (DEMIRBAS, 2009).

Além dos benefícios ambientais e econômicos, as biorrefinarias podem ter um impacto social significativo no setor industrial. A adoção total das biorrefinarias na economia circular depende de uma abordagem holística e integrada que leve em conta as questões sociais e econômicas (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020).

A Economia Circular (EC) tem sido reconhecida como uma estratégia crucial para o desenvolvimento sustentável, visando aprimorar a eficiência no uso de materiais e energia. É um modelo que abrange todo o ciclo de vida de um produto, desde o planejamento, recursos, aquisição, produção e reprocessamento, com o objetivo de maximizar o funcionamento do ecossistema e promover o bem-estar humano, sendo um conceito de economia norteador das biorrefinarias, e sendo vista como uma maneira eficaz de enfrentar as limitações de recursos por meio da circulação contínua de materiais, o que pode levar a um crescimento econômico desvinculado da extração de recursos finitos (MURRAY; SKENE; HAYNES, 2017; PAVEL, 2018).

Visando a diversificação de bioprodutos oriundos de biomassa lignocelulósica, surge a ideia de produzir simultaneamente etanol e xilitol, mas para isso a transposição de alguns desafios, que serão abordados nos próximos tópicos, é necessária.

1.1.2 Insegurança alimentar vs produção de bioprodutos a partir de biomassa vegetal

A necessidade de espaços agrícolas para produção de alimentos compete com os meios de produção de biocombustíveis. O Brasil ocupa o ranking dos 10 países que mais perdem alimentos no mundo, com cerca de 35% da produção agrícola desperdiçada (GARCÍA et al., 2020).

No mundo, a produção de biocombustíveis responde por 1,7 milhão de empregos, 845 mil deles no Brasil. As commodities para a produção de etanol pela cana-de-açúcar vêm crescendo e tomando espaço em meio à agricultura alimentar. Existe a preocupação sobre a competição entre a produção de alimentos e a de fontes renováveis de energia, gerando assim um risco de insegurança alimentar no cenário mundial (GUEVARA et al., 2017).

Um dos fatos mais importantes para o alerta entre essas divergências são os preços de insumos agrícolas, que vêm aumentando ao longo dos anos, gerando medo e desnutrição em vários lugares do planeta. Segundo a ONU (2018), a população mundial em 2024 será superior a 8 bilhões de pessoas e, em 2050, superior a 9,5 bilhões, demandando maior oferta de alimentos. Devido a isso, a garantia por alimentos em quantidade, qualidade e diversidade é direito de todas as pessoas e um dever do Estado (SAATH; FACHINELLO, 2018).

A solução para essa questão vem ao encontro da utilização de resíduos da indústria de alimentos como fonte para a geração de etanol e outros combustíveis, tendo assim um balanceamento estável entre alimentação, desperdício e produção de etanol (SILVA et al., 2020).

1.1.3 Resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos são resíduos de origem vegetal que contêm celulose, hemicelulose e lignina em diferentes proporções. Esses resíduos são gerados em processos agrícolas, florestais e industriais, como na produção de papel, madeira, açúcar, etanol e outros produtos que utilizam biomassa vegetal como matéria-prima. Entre os resíduos lignocelulósicos mais comuns estão as cascas de arroz, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, resíduos de poda de árvores, entre outros. No entanto, a utilização desses resíduos para produção de biocombustíveis ainda enfrenta desafios técnicos e econômicos,

como a baixa eficiência dos processos de conversão e a competição com outras fontes de energia e matérias-primas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Para a conversão desses resíduos em bioprodutos como etanol e xilitol, é necessária uma etapa de pré-tratamento, que consiste na desestruturação da biomassa lignocelulósica, seguida da hidrólise dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, que compõem essa biomassa. O pré-tratamento deve fornecer alta recuperação de açúcares de biomassa, evitando a degradação de carboidratos e compostos fenólicos derivados de lignina que podem ser inibidores de microrganismos no processamento biológico subsequente. Além disso, o pré-tratamento é uma etapa essencial que deve levar à diminuição da carga enzimática, permitindo alto rendimento de açúcares fermentescíveis (SILVEIRA, M. H. L.; VANELLI; CHANDEL, 2017). lignocelulósica sejam inicialmente hidrolisados.

A celulose pode ser submetida ao processo de hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas denominadas celulasas ou processos de hidrólise ácida, feitos com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, concentrados ou diluídos. No caso da hidrólise enzimática não há geração de inibidores na fermentação e o processo gera menos resíduos, sendo menos agressivo ao meio ambiente. Contudo, este tipo de hidrólise faz uso de enzimas que aumentam consideravelmente o custo do processo. Por outro lado, a hidrólise química, apesar de ser mais barata, gera compostos que podem inibir a fermentação (ácido acético, furfural, ácido fórmico e hidroximetilfurfural) (ALVES *et al.*, 2019; SJULANDER; KIKAS, 2020; VANMARCCKE *et al.*, 2021).

A hemicelulose é uma macromolécula complexa composta principalmente por carboidratos, especialmente pentoses e hexoses. É uma mistura de polissacarídeos ramificados e heterogêneos que estão fortemente ligados às fibras de celulose na parede celular das plantas. A estrutura química da hemicelulose é composta por unidades repetidas de açúcares que podem ser ligadas por diferentes tipos de ligações glicosídicas, dependendo do tipo de açúcar, também por acetato e arabinose. Por exemplo, as moléculas de xilose estão majoritariamente unidas entre si por ligações β -1,4, enquanto a arabinose está ligada através de ligações α -1,4 com a xilose (HUANG *et al.*, 2021). As hemiceluloses são geralmente classificadas em dois grupos principais: xilanas e pentosanas. As xilanas são as hemiceluloses mais comuns e são compostas principalmente de unidades de xilose, enquanto as pentosanas contêm outros açúcares como arabinose, galactose e manose (ZHOU *et al.*, 2017).

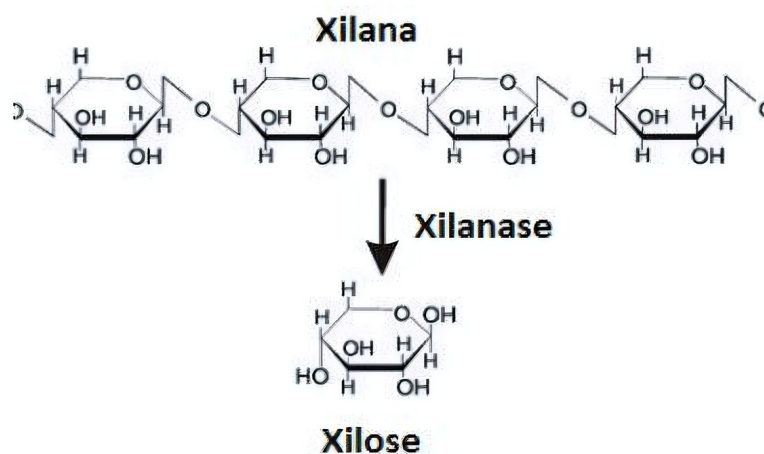
As hemiceluloses são caracterizadas pela presença de grupos funcionais em suas estruturas. Por exemplo, muitas hemiceluloses contêm grupos hidroxila (-OH) que podem estar sujeitos a modificação química para melhorar sua solubilidade ou reatividade química. Além disso, a presença de grupos acetil é comum em hemiceluloses de madeira e pode afetar as propriedades físicas e químicas da molécula. A estrutura química das hemiceluloses também pode variar entre diferentes tipos de plantas e entre diferentes partes da mesma planta. Por exemplo, as hemiceluloses presentes nas sementes de leguminosas geralmente contêm mais galactomananas, enquanto as hemiceluloses nas folhas de gramíneas são compostas principalmente de xilanas (DELBECQ et al., 2018).

A xilana (Figura 1.1) é um polissacarídeo estrutural presente em muitas plantas, sendo encontrado principalmente na parede celular das células vegetais. É composto por uma cadeia de unidades de xilose, que são ligadas entre si por ligações β -1,4 glicosídicas. A estrutura da xilana é bastante variável, podendo apresentar diferentes graus de ramificação e diferentes tipos de substituições. Além disso, a xilana está associada a outros compostos da parede celular, como lignina e hemicelulose, o que confere uma complexidade adicional à sua estrutura (SOUZA NOEL SIMAS BARBOSA, DE; HYTÖNEN; VAINIKKA, 2017).

A xilana é degradada por um grupo de enzimas conhecidas como xilanases, que quebram as ligações β -1,4 glicosídicas entre as unidades de xilose. Existem vários tipos de xilanases, que diferem em sua especificidade de substrato e em sua estrutura molecular. Algumas xilanases são capazes de degradar também outras hemiceluloses, enquanto outras são específicas para a xilana (WIERZBICKI et al., 2019).

A degradação da xilana resulta em uma mistura de oligossacarídeos e monossacarídeos, incluindo a xilose. A xilose é um substrato crucial para a produção de xilitol e outras substâncias bioquímicas de interesse industrial.

Figura 1.1 - Decomposição da xilana para formação da xilose.



Fonte: BOUÇA; COSTA, DA, 2017.

1.1.4 Etanol e xilitol

O etanol, ou álcool etílico, é um composto orgânico que possui átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio em sua estrutura molecular. Este composto é extensivamente utilizado como combustível, solvente e matéria-prima na fabricação de diversos produtos químicos.

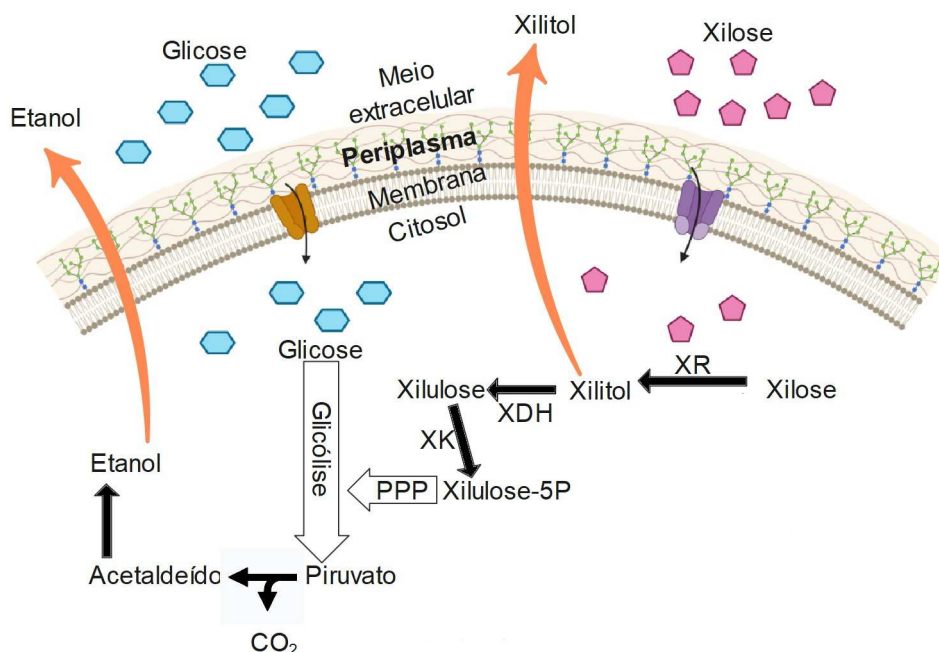
A história do etanol remonta há muitos séculos, quando as civilizações antigas descobriram como fermentar substâncias orgânicas para produzir bebidas alcoólicas. Há evidências de que a produção de bebidas alcoólicas era praticada na China há mais de 9.000 anos, e acredita-se que os egípcios produziam cerveja há cerca de 5.000 anos. A destilação, processo pelo qual se obtém álcool puro, foi desenvolvida posteriormente pelos árabes, no século VIII. No século XVII, o etanol começou a ser utilizado como combustível em lâmpadas, substituindo a iluminação à base de óleo e cera. No século XIX, com a Revolução Industrial, a demanda por etanol aumentou consideravelmente, principalmente para uso como combustível. Na década de 1970, com a crise do petróleo, a produção de etanol ganhou novo impulso, especialmente no Brasil, onde a produção de álcool combustível a partir da cana-de-açúcar se tornou uma das principais fontes de energia do país. Hoje, o etanol é utilizado em todo o mundo como combustível renovável, e continua a ser um importante ingrediente em bebidas alcoólicas (ABEBE, 2008; SILVA et al., 2020; VARLINSKAYA; SPEAR, 2015).

As propriedades químicas do etanol são determinadas tanto pelas ligações químicas presentes em sua estrutura, quanto pelas forças intermoleculares existentes entre suas moléculas (GALBE; ZACCHI, 2002; PACHECO; SILVA, 2019; SILVA, et al., 2020).

O etanol é formado nas células (Figura 1.3) por meio do processo de fermentação alcoólica, que ocorre em duas etapas principais: glicólise e fermentação. Na primeira etapa, chamada de glicólise, moléculas de glicose são quebradas em duas moléculas de piruvato, gerando energia na forma de ATP. Na segunda etapa, conhecida como fermentação, o piruvato pode seguir diferentes vias metabólicas, dependendo do tipo de microrganismo envolvido. Nas leveduras e bactérias que realizam a fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase, gerando dióxido de carbono (CO₂) e acetaldeído, que é então convertido em etanol pela álcool desidrogenase. Esse processo ocorre sem a utilização de oxigênio (HENDERSON et al., 2013).

É importante mencionar que algumas leveduras, chamadas de "Crabtree-positivas", têm a capacidade de fermentar açúcares mesmo em presença de oxigênio. Nessas leveduras, quando a glicose está presente em concentrações elevadas, ocorre uma preferência pela fermentação alcoólica mesmo em condições aeróbicas, resultando na produção de etanol. Esse fenômeno é conhecido como efeito Crabtree e tem implicações importantes na produção de etanol em escala industrial (IMURA *et al.*, 2020).

Figura 1.2 - Produção de etanol e xilitol na célula de levedura. Onde: XR é xilose redutase, XDH é xilose desidrogenase, XK é xilose quinase, PPP é via das pentoses-fosfatos e CO₂ é dióxido de carbono.



Fonte: elaborado pela autora.

Os maiores produtores de etanol no mundo são os Estados Unidos e o Brasil, que respondem por 84% da produção total mundial (HOANG; NGHIEM, 2021). Este composto na indústria de combustíveis começou a ser produzido no Brasil no início do século XX a partir da cana-de-açúcar. No Brasil na safra de 2019/2020 colheram-se 642,7 milhões de toneladas métricas (valor dentro da média dos cinco anos anteriores) de cana-de-açúcar (matéria úmida), obtendo-se 160,1 toneladas de matéria seca, sendo desta 22 milhões de toneladas métricas de bagaço de cana e 22 milhões de toneladas métricas de palha (OLIVEIRA, et al., 2020).

Nas últimas décadas, muitos países têm firmado compromissos para reduzir o uso de combustíveis fósseis visando diminuir a sujeição ao petróleo e as emissões de dióxido de carbono na atmosfera (SUSMOZAS et al., 2020). Nesse contexto, o desenvolvimento de fontes renováveis de energia que possam ser alternativas ao uso dos combustíveis fósseis, como o biocombustível etanol, é de fundamental importância. O etanol de segunda geração (ou etanol 2G) pressupõe a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima, diferentemente do etanol de 1ª geração que é produzido a partir de açúcares. Essas matérias-

primas são provenientes de resíduos de produtos naturais, dentre eles: milho, arroz, cacau, palha, batata doce e bagaço de cana-de-açúcar (PRABHU et al., 2020). A partir dessa biomassa pode-se obter outros bioprodutos de interesse tal como o xilitol.

O xilitol foi obtido pela primeira vez na forma de xarope de faia em 1890 pelo alemão Emil Fischer (1852-1919), vencedor do Prêmio Nobel de Química em 1902. O interesse na comercialização do xilitol como adoçante começou devido à escassez de açúcar durante a Segunda Guerra Mundial. A matéria-prima utilizada foi madeira de bétula (um gênero de árvores da família Betulaceae, à qual pertence também a aveleira), e por isso muitas vezes é chamado de “açúcar de bétula”, embora possa ser feito de qualquer fonte rica em xilose (KÖSTER et al., 2018).

O xilitol é um álcool penta-hidratado, sendo um composto de alto valor agregado, obtido por hidrogenação catalítica da xilose, o principal componente da hemicelulose. A partir do xilitol, é possível obter vários produtos, como polietilenoglicol e etilenoglicol, e assim substituir matérias-primas de origem fóssil. Na indústria, pode ser produzido a partir de sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e cascas de sementes e de nozes (PRABHU et al., 2020).

A produção biotecnológica oferece várias vantagens, pois a purificação inicial da xilose pode ser dispensada, uma vez que ela é convertida em xilitol via fermentação de hidrolisados hemicelulósicos. A conversão da xilose em xilitol pode ser feita via microrganismos ou enzimas isoladas com um alto rendimento do produto favorecendo sua separação. Neste processo, os catalisadores metálicos podem ser dispensados porque os próprios microrganismos realizam a catálise da reação. Dentre os microrganismos capazes de converter a xilose em xilitol, destacam-se as leveduras, particularmente as espécies de *Candida tropicalis* e *Candida mogii* (CORTIVO et al., 2018) e outras espécies que pertencem ao gênero *Meyerozyma* (TADIOTO et al., 2022).

A conversão da xilose em xilitol (Figura 1.2) inicia-se pela entrada da xilose na célula por difusão facilitada através de transportadores específicos dependendo do pH do meio e da temperatura da fermentação. Após a entrada na célula, a xilose pode ser utilizada na respiração celular, na fermentação alcoólica ou ser apenas convertida em xilitol pela xilose redutase (XR) das leveduras (BAPTISTA et al., 2021). Posteriormente, para a conversão do xilitol em etanol, o xilitol será oxidado em xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase (XDH). Em seguida, a enzima xilulose quinase (XK) fosforila a xilulose em xilulose-5-fosfato (X5P).

Na próxima etapa a xilulose-5- fosfato entrará na via das pentoses fosfato para ser convertida por transcetolases e transaldolases em intermediários glicolíticos como o gliceraldeído-3- fosfato (GAP3) e frutose-6- fosfato (HIRSCH, 2017). Na rota descrita por Embden-Meyerhof- Parna (EMP), os intermediários glicolíticos são convertidos em piruvato. O piruvato pode então ser descarboxilado pela piruvato descarboxilase (PDC) em acetaldeído , que, por fim, é convertido em etanol pela álcool desidrogenase (ADH) (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Além disso, é desejável que XR e XDH sejam capazes de reciclar a mesma coenzima em ambas as reações de óxido-redução (NADH/NAD^+), evitando assim um possível desequilíbrio redox dentro das células, que tende a acumular xilitol em detrimento da produção do etanol (BAPTISTA, et al., 2021; KÖSTER et al., 2018).

A produção mundial de xilitol aumenta devido aos efeitos benéficos que este traz para a saúde humana e à sua empregabilidade diversificada nos mais diferentes tipos de indústria, principalmente alimentícia, odontológica e farmacêutica (UR-REHMAN et al., 2015). O xilitol atua como anticariogênico, e previne e trata doenças como otite média aguda e anemia hemolítica. O mercado anual global de xilitol em 2020 foi cerca de US\$ 972,85 milhões e, em 2021, passou para US\$ 1.053,07 milhões (MARTINS et al., 2022). Ainda, no Painel de Preços do Ministério da Economia do Brasil (ECONOMIA, 2022), consta que o valor do quilograma de xilitol adquirido pelo Governo Federal em 2022 foi em média R\$ 520,00.

A sacarificação da xilana e da celulose é, portanto, um processo químico ou enzimático que envolvem a quebra da xilana em xilose e da celulose em glicose. Após a sacarificação da xilana e da celulose, os açúcares simples podem então ser utilizados como fonte de energia ou fontes de carbono pelas células microbianas. As xilanases são produzidas naturalmente por muitos microrganismos, incluindo fungos, bactérias e leveduras (PAWAR et al., 2017; ROMANÍ et al., 2020). Além disso, a sacarificação da xilana pode ser influenciada pela concentração de xilana no substrato, bem como pela presença de outros compostos, como lignina e celulose, que podem interferir na ação das enzimas.

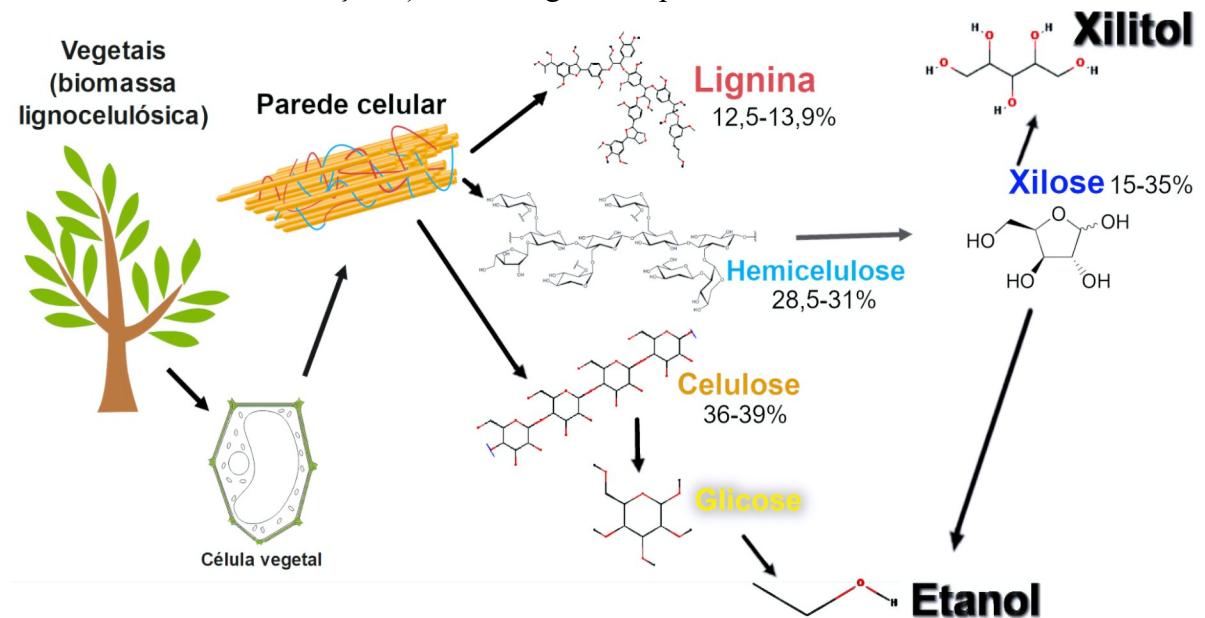
As enzimas celulolíticas são produzidas naturalmente por vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos e alguns animais, como cupins. Essas enzimas são classificadas em três categorias principais, dependendo do tipo de ligação glicosídica que quebram: endoglucanases, que quebram as ligações internas da cadeia de celulose; exoglucanases, que

quebram as ligações na extremidade da cadeia; e celobiohidrolases, que quebram as ligações internas e externas (ORTEGA; BUSTO; PEREZ-MATEOS, 2001; TEUGJAS; VÄLJAMÄE, SHARMA; SATYANARAYANA, 2021).

Os microrganismos com potencial de sacarificação são mais desejáveis na fermentação do que as enzimas porque têm maior tolerância ao estresse e diversidade fenotípica, tornando-os mais adequados para as condições desafiadoras encontradas na fermentação do bioetanol (RADECKA et al., 2015). Economicamente o uso de microrganismos no lugar de enzimas na sacarificação torna o processo de produção de bioprodutos mais baratos, além de acelerar o processo como um todo pois a etapa de sacarificação pode ocorrer simultaneamente à conversão de monossacarídeos em etanol e xilitol, por exemplo (BARAL; KUMAR; AGRAWAL, 2022).

No contexto geral, deseja-se empregar resíduos lignocelulósicos como matéria prima para a geração de diferentes bioprodutos. Nesse sentido, almeja-se aproveitar o substrato da melhor forma possível, ou seja, extraíndo dele produtos com o máximo de valor agregado da forma mais eficiente possível. Com isso, muitos trabalhos acerca de biorrefinarias têm buscado atrelar a produção de etanol 2G a outro produto, especialmente em razão da dificuldade que as leveduras têm de converter xilose em etanol. Assim sendo, leveduras que convertem xilose em xilitol (Figura 1.3) aparecem como excelente alternativa: enquanto a maioria das leveduras fermentam a glicose a etanol, a xilose pode ser convertida tanto em etanol como em xilitol, a depender da levedura empregada no processo (AQUINO et al., 2017).

Figura 1.3 - Representação esquemática da parede celular da célula vegetal (bagaço da cana-de-açúcar). Porcentagens em peso de matéria seca



Fonte: elaborado pela autora.

A ampla produção de etanol 1G brasileira consequentemente eleva a geração de resíduos no setor. O processo de moagem da cana-de-açúcar gera em média 200 kg de palha e 250 kg de bagaço para cada tonelada moída. A destinação desses resíduos é majoritariamente a queima para geração de energia elétrica, e uma pequena parte permanece no campo tendo a decomposição como destino (OLIVEIRA, et al., 2020).

Entretanto, resíduos do bagaço e da palha da cana-de-açúcar são biomassas lignocelulósicas que, como dito anteriormente, podem ser substratos de processos fermentativos, obtendo-se, até mesmo, mais etanol (etanol 2G) e outros bioprodutos como o xilitol. Dessa forma, a capacidade de produção de etanol por hectare aumenta, se comparada à produção do etanol de primeira geração (DIONÍSIO et al., 2021) além de permitir a produção de xilitol, que é um produto de alto valor agregado. Exemplificando, a produção de etanol de segunda geração, proveniente dos resíduos da cana, aumentaria a fabricação total deste combustível no Brasil em até 50%, sem ampliar a área plantada com a cultura (CHACÓN-NAVARRETE; MARTÍN; MORENO-GARCÍA, 2021).

A partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, têm-se 36-39% de celulose, 28,5-31% de hemicelulose e 12,5 - 3,9% de lignina (CHILAKAMARRY et al., 2021). Tendo em

vista todos estes fatores, a produção de etanol 2G é uma grande ferramenta de sustentabilidade com um grande viés econômico (VANMARCKE et al., 2021). Vale ressaltar, no entanto, que a quantidade destes substratos pode variar de acordo com o tipo de resíduo (Tabela 1.1)

Tabela 1.1. Quantidade de hemicelulose e celulose em resíduos agrícolas.

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Referência
Bagaço de cana	42,8	25,8	(SARROUH, 2009)
Folhas de milho	37,6	34,5	(CRUZ et al, 2000)
Casca de arroz	30,3	31,1	(SUYAMA; GROSSA, 2019)
Folhas de trigo	37,8	28,2	(COIMBRA et al, 2016)

Fonte: adaptado de COIMBRA et al., (2016).

1.1.5 Prospecção de leveduras em insetos herbívoros

As leveduras são reconhecidas historicamente por sua capacidade fermentativa, sendo organismos eucariotos pertencentes ao reino Fungi. Elas exercem papel similar ao das bactérias, sendo consumidores de matéria orgânica. A utilização de leveduras, em especial *Saccharomyces cerevisiae*, representa a maior parte da produção de etanol, tanto de primeira quanto de segunda geração (OC; ERASLAN; KIRDAR, 2020).

É crescente a busca por leveduras selvagens que consigam superar os obstáculos decorrentes das etapas de pré-fermentação (pré-tratamento e hidrólise). Existem alguns problemas que devem ser considerados durante as etapas de produção de etanol 2G, como a geração de inibidores (furanos, resinas, ácidos graxos e compostos fenólicos) que mesmo em pequenas quantidades são potencialmente inibidores (ALVES et al., 2019). Ocorre também formação de ácido acético; pensando nisso, é necessário encontrar microrganismos fermentadores capazes de tolerar esse estresse celular (SUSMOZAS et al., 2020).

A bioprospecção de enzimas e microrganismos em insetos herbívoros é uma ideia que está sendo estudada. Esses insetos absorvem açúcares provenientes de biomassa lignocelulósica com a ajuda de leveduras existentes na sua microbiota intestinal. Sendo assim, estes insetos podem ser uma alternativa de fonte de leveduras para a fermentação e produção

de etanol. Alguns destes insetos, vistos em pesquisas anteriores, são cupins, como *Reticulitermes speratus*, *Coptotermes formosanus* e *Neotermes koshunensis*, coleópteros, como *Anoplophora glabripennis*, lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* e *Bombyx mori*, e dípteros como a *Hermetia illucens* (ALVES et al., 2019).

A lagarta do cartucho de milho (*Spodoptera frugiperda*) é uma das maiores pragas da agricultura no Brasil. Este inseto reproduz-se facilmente, possui ampla quantidade de hospedeiros, fazendo com que sua disseminação seja extremamente rápida, e traz diversos prejuízos econômicos na agricultura. A *S. frugiperda* pode ser encontrada por todo o continente americano, Ásia, Índia e China. Em sua fase larval, a *S. frugiperda* consome uma grande variedade de vegetais em seu ciclo alimentar, que possui diversos carboidratos que podem ser fonte para leveduras que estão presentes no seu intestino, por isso o interesse neste inseto para produção de etanol e xilitol (WAN, et al., 2021).

1.2 JUSTIFICATIVA

A demanda cada vez maior por espaços agricultáveis, energia e redução da pegada ambiental, faz com que a busca por maior eficiência nos bioprocessos nas biorrefinarias seja almejado. Buscando melhor aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, este trabalho propõe a utilização destes para a produção simultânea de etanol biocombustível e xilitol, um produto de alto valor agregado.

Pensando ainda na sustentabilidade e na economia do processo de maneira geral, busca-se utilizar microrganismos capazes de ao mesmo tempo sacarificar os componentes lignocelulósicos e produzir os bioprodutos de interesse. Logo, a prospecção destes microrganismos em insetos herbívoros pode ser um excelente ponto de partida.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Produzir simultaneamente etanol e xilitol por microrganismo isolado do intestino de *Spodoptera frugiperda*.

1.3.2 Objetivos específicos

i) Estudar o processo de fermentação de linhagens de leveduras isoladas do intestino da lagarta *Sp. Frugiperda* sob diferentes concentrações de xilose e glicose e diferentes valores de pH;

ii) Avaliar os graus de tolerância das leveduras aos inibidores da fermentação comumente observados em hidrolisados lignocelulósicos;

iii) Selecionar as cepas com maior potencial biotecnológico a partir dos seus rendimentos de etanol e xilitol durante análises cinéticas de fermentação;

iv) Avaliar o potencial xilanolítico e celulolítico das cepas selecionadas;

v) Avaliar o desempenho fermentativo das cepas selecionadas em consórcio;

vi) Avaliar o potencial xilanolítico e celulolítico das cepas selecionadas em consórcio.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, M. History of Ethanol. 2008. Disponível em: <<https://digitalcommons.unl.edu/journalismstudent>>.
- ALVES, S. L. *et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology**, 2019. v. 15, n. 6, p. 336–349.
- ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 2014. v. 35, n. 2, p. 125.
- AQUINO, C. *et al.* e xilana / gelatina para produção de embalagens biodegradáveis Development of xylan and xylan / gelatin biofilms for production of biodegradable packages. 2017. v. 27, p. 35–41.
- BAPTISTA, S. L. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from biorefinery carbohydrates. **Biotechnology Advances**, 2021. v. 47, n. January, p. 107697. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107697>>.
- BARAL, P.; KUMAR, V.; AGRAWAL, D. Emerging trends in high-solids enzymatic saccharification of lignocellulosic feedstocks for developing an efficient and industrially deployable sugar platform. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2022. v. 42, n. 6, p. 873–891.
- BOUÇA, G.; COSTA, M. DA. Produção e Caracterização de Xilanases obtidas por Fermentação em Estado Sólido. 2017.
- CHACÓN-NAVARRETE, H.; MARTÍN, C.; MORENO-GARCÍA, J. Yeast immobilization systems for second-generation ethanol production: actual trends and future perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2021. v. 15, n. 5, p. 1549–1565.
- CHILAKAMARRY, C. R. *et al.* Technological perspectives for utilisation of waste glycerol for the production of biofuels: A review. **Environmental Technology & Innovation**, 2021. v. 24, p. 101902. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101902>>.
- COIMBRA, M. C. *et al.* Sugar production from wheat straw biomass by alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, 2016. v. 86, p. 1060–1068.
- CORTIVO, P. R. D. *et al.* Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. **Industrial Crops and Products**, 2018. v. 113, n. January, p. 10–18. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.010>>.

DELBECQ, F. *et al.* Hydrolysis of hemicellulose and derivatives-a review of recent advances in the production of furfural. **Frontiers in Chemistry**, 2018. v. 6, n. MAY.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: Current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, 2009. v. 50, n. 11, p. 2782–2801. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2009.06.035>>.

DIONÍSIO, S. R. *et al.* Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, 2021. v. 304, n. June, p. 121290. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121290>>.

ECONOMIA, Ministério da. Painel de Preços: análise de materiais. Análise de Materiais. 2022. Disponível em: <https://paineldeprecos.planejamento.gov.br/analismateriais>. Acesso em: 27 maio 2022.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002. v. 59, n. 6, p. 618–628.

GARCÍA, A. *et al.* Potential of bio-ethanol in different advanced combustion modes for hybrid passenger vehicles. **Renewable Energy**, 2020. v. 150, p. 58–77.

GUEVARA, A. *et al.* Evaluation of Sustainability of Brazilian Ethanol Production: A model in System Dynamics. **Brazilian Business Review**, 2017. v. 14, n. 4, p. 435–447.

HENDERSON, C. M. *et al.* Ethanol production and maximum cell growth are highly correlated with membrane lipid composition during fermentation as determined by lipidomic analysis of 22 *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013. v. 79, n. 1, p. 91–104.

HIRSCH, E. Metabolização de glicose e xilose por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante após deleção do gene ROD1. 2017. p. 1–55.

HOANG, T.; NGHIEM, N. Recent Developments and Current Status of Commercial Production of Fuel Ethanol. 2021.

HUANG, L. Z. *et al.* Recent Developments and Applications of Hemicellulose From Wheat Straw: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2021. v. 9, n. June, p. 1–14.

IMURA, M. *et al.* Comparison of metabolic profiles of yeasts based on the difference of the Crabtree positive and negative. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020. v. 129, n. 1, p. 52–58. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.07.007>>.

KÖSTER, D. *et al.* Origin of Xylitol in Chewing Gum: A Compound-Specific Isotope Technique for the Differentiation of Corn- and Wood-Based Xylitol by LC-IRMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018. v. 66, n. 8, p. 2015–2020.

MARTINS, M. L. *et al.* The Xylitol Applicability and its Effects in Health Area Worldwide: A Bibliometric Analysis Based on Randomized Controlled Trials. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 2022. v. 22, p. 1–18.

MURRAY, A.; SKENE, K.; HAYNES, K. The Circular Economy: An Interdisciplinary Exploration of the Concept and Application in a Global Context. **Journal of Business Ethics**, 2017. v. 140, n. 3, p. 369–380.

OC, S.; ERASLAN, S.; KIRDAR, B. Dynamic transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to copper. **Scientific Reports**, 2020. v. 10, n. 1, p. 1–13. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75511-w>>.

OECD. **Meeting Policy Challenges for a Sustainable Bioeconomy**. [S.l.]: [s.n.], 2018.

OLIVEIRA, R. A. DE *et al.* Energy supply design for the integrated production of 1G + 2G ethanol from sugarcane. **Renewable Energy Focus**, 2020. v. 35, p. 171–177. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ref.2020.10.005>>.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2001. v. 47, n. 1, p. 7–14.

PACHECO, R.; SILVA, C. Global warming potential of biomass-to-ethanol: Review and sensitivity analysis through a case study. **Energies**, 2019. v. 12, n. 13.

PAVEL, S. Circular Economy: The Beauty of Circularity in Value Chain. **Journal of Economics and Business**, 2018. v. 1, n. 4, p. 584–598.

PAWAR, P. M. A. *et al.* In muro deacetylation of xylan affects lignin properties and improves saccharification of aspen wood. **Biotechnology for Biofuels**, 2017. v. 10, n. 1, p. 1–11.

PRABHU, A. A. *et al.* Enhanced xylitol production using non-detoxified xylose rich pre-hydrolysate from sugarcane bagasse by newly isolated *Pichia fermentans*. **Biotechnology for Biofuels**, 2020. v. 13, n. 1, p. 1–15. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-020-01845-2>>.

RADECKA, D. *et al.* Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS Yeast Research**, 2015. v. 15, n. 6, p. 1–13.

ROMANÍ, A. *et al.* Aqueous solutions of deep eutectic systems as reaction media for the saccharification and fermentation of hardwood xylan into xylitol. **Bioresource Technology**,

2020. v. 311, n. May, p. 123524. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123524>>.

SAATH, K. C. De O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da Demanda Mundial de Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 2018. v. 56, n. 2, p. 195–212.

SILVA, M. S. *et al.* Selection of yeasts from bee products for alcoholic beverage production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020. v. 51, n. 1, p. 323–334.

SILVEIRA, M. H. L.; VANELLI, B. A.; CHANDEL, A. K. **Second Generation Ethanol Production: Potential Biomass Feedstock, Biomass Deconstruction, and Chemical Platforms for Process Valorization. Potential Biomass Feedstock, Biomass Deconstruction, and Chemical Platforms for Process Valorization.** [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

SJULANDER, N.; KIKAS, T. Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. **Energies**, 2020. v. 13, n. 18.

SOUZA NOEL SIMAS BARBOSA, L. DE; HYTÖNEN, E.; VAINIKKA, P. Carbon mass balance in sugarcane biorefineries in Brazil for evaluating carbon capture and utilization opportunities. **Biomass and Bioenergy**, 2017. v. 105, p. 351–363.

SUSMOZAS, A. *et al.* Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. **Processes**, 2020. v. 8, n. 10, p. 1–45.

TADIOTO, V. *et al.* Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2022. v. 38, n. 2, p. 1–14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03221-0>>.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review.** [S.l.]: [s.n.], 2008. V. 9.

TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, 2013. v. 6, n. 1, p. 1–13.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, 2020. v. 299, n. November 2019.

UR-REHMAN, S. *et al.* Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. v. 55, n. 11, p. 1514–1528.

VANMARCKE, G. *et al.* Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, 2021. v. 14, n. 1, p. 1–15. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-021-01935-9>>.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Social consequences of ethanol: Impact of age, stress, and prior history of ethanol exposure. **Physiology and Behavior**, 2015. v. 148, p. 145–150. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.062>>.

WAN, J. *et al.* Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Integrative Agriculture**, 2021. v. 20, n. 3, p. 646–663.

WIERZBICKI, M. P. *et al.* Xylan in the middle: Understanding xylan biosynthesis and its metabolic dependencies toward improving wood fiber for industrial processing. **Frontiers in Plant Science**, 2019. v. 10, n. February, p. 1–29.

ZHOU, X. *et al.* A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, 2017. v. 5, n. 1, p. 52–79.

CAPÍTULO II

ANALYSIS OF THE HOLOCELLULOLYTIC AND FERMENTATIVE POTENTIALS OF
YEASTS ISOLATED FROM THE GUT OF *Spodoptera frugiperda* LARVAE - ARTIGO

PUBLICADO NO PERIÓDICO BIOENERGY RESEARCH -

[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S12155-023-10616-4](https://doi.org/10.1007/S12155-023-10616-4)

Analysis of the holocellulolytic and fermentative potentials of yeasts isolated from the gut of *Spodoptera frugiperda* larvae

Maria L. R. Albarello^{1,2,3}, Anderson Giehl³, Viviani Tadioto^{1,3}, Angela A. dos Santos^{2,3},
Letícia M. Milani³, Jean C. S. Bristot³, Marco A. Tramontin⁴, Helen Treichel^{1,5}, Oderlei
Bernardi⁶, Boris U. Stambuk^{1,2}, Sérgio L. Alves Jr.^{1,3,*}

¹Graduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina,
Florianópolis/SC, Brazil

²Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brazil

³Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó/SC,
Brazil

⁴Laboratory of Agricultural Entomology, Federal University of Fronteira Sul, Campus
Chapecó/SC, Brazil

⁵Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Campus
Erechim/RS, Brazil

⁶Department of Plant Protection, Federal University of Santa Maria, Santa Maria/RS, Brazil

*Corresponding author: Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira
Sul, 20 Campus Chapecó, Rodovia SC 484, Km 2, 89815-899, Bairro Fronteira Sul,
Chapecó/SC, 21 Brazil. e-mail: slalvesjr@uffs.edu.br

ABSTRACT

Despite recent improvements, second-generation (2G) biorefineries still have challenges to overcome, especially regarding cellulose and xylan hydrolysis and xylose fermentation. Hydrolases account for a high percentage of the process total cost, and industrial yeasts may not assimilate xylose properly. In this sense, prospecting microorganisms that can both metabolize this sugar and hydrolyze cellulose and xylan may lead to significant advances in 2G processes. Since the gut microbiota of herbivorous insects has proven to be the major player in their lignocellulose digestion, yeasts were isolated from the gut of *Spodoptera frugiperda* larvae, and their cellulolytic, xylanolytic, and xylose-assimilating capacity were analyzed. From a hundred larvae guts, forty-six yeasts were selected for their growth capacity in xylose-containing media. Fourteen strains were able to hydrolyze cellulose, and three showed xylanolytic activity. Two strains, taxonomically identified as *Papiliotrema laurentii* and *Meyerozyma caribbica*, stood out with the highest cellular biomass yield and productivity when submitted to a high-throughput microscale growth analysis under different culture conditions (varying pH and sugar concentration). While the *P. laurentii* strain displayed the highest xylanolytic activity (205.48 U/mL) and an intermediate cellulolytic capacity (31.25 U/mL), the *M. caribbica* strain showed, besides cellulase activity (37.46 U/mL), high ethanol and xylitol yields ($0.36 \text{ g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ and $0.35 \text{ g}_{\text{xylitol}}/\text{g}_{\text{xylose}}$, respectively) in media with the most common fermentation inhibitors in 2G bioprocesses. Through a Central Composite Rotatable Design, the optimized condition for the simultaneous production of ethanol and xylitol was found to be in a 55-85 g/L range of sugar concentration and between pH values of 6.0 to 8.5. Also, this experimental design analysis allowed the validation of empiric-coded models. These results indicate the high biotechnological potential of prospecting yeasts in *S. frugiperda* guts.

Keywords: *Papiliotrema laurentii*, *Meyerozyma caribbica*, Ethanol, Xylitol, Xylose.

2.1 INTRODUCTION

Lignocellulosic residues employed as feedstocks in second-generation (2G) biorefineries are rich in cellulose and hemicellulose (holocellulose) [1]. Despite the former being an invariable homopolysaccharide composed of glucose molecules joined together by β -1,4 glycosidic bonds, the hemicellulose fraction varies between plant taxons, primarily in the form of xylan in grasses such as corn [2, 3]. This branched polysaccharide is mostly formed by xylose molecules also linked together by β -1,4 glycosidic bonds [4].

Although the literature has proposed numerous strategies to optimize their production stages, 2G bioprocesses still face bottlenecks that reduce the interest of the productive sector. No wonder, 2G ethanol still does not represent 1% of the global amount of this fuel production [5]. In fact, cellulases and xylanases account for a high percentage of the total cost [6], and in the fermentation stage, some sugars are underutilized, reducing the process yield [4]. This is particularly the case for xylose. The fermentation of this pentose requires the subsequent action of three enzymes, which act after the sugar transport into the cell. Initially, xylose reductase (XR) reduces xylose into xylitol, which is then oxidized into xylulose by xylitol dehydrogenase (XDH). In the third reaction, xylulose is phosphorylated by xylulokinase (XK), releasing xylulose-5-phosphate to the pentose phosphate pathway (PPP). However, even though many yeasts harbor these enzymes (or at least their genes), a significant number of species cannot use xylose as energy and carbon sources due to the redox imbalance that usually occurs in the first two reactions. While XR preferentially uses NADPH as reducing power, XDH uses NAD^+ as an electron acceptor, impairing the recycling of these coenzymes [7]. In this way, many yeasts do not ferment xylose into ethanol and end up accumulating xylitol, the first-reaction product. Fortunately, xylitol is also a highly desired product, given its numerous applications, especially in the pharmaceutical, cosmetics, and food industries [8]. Moreover, multi-product biorefineries can simultaneously produce ethanol from glucose and xylitol from xylose [9, 10].

The prospection of microorganisms capable of hydrolyzing the so-referred polysaccharides and metabolizing the monosaccharides obtained after hydrolysis has been presented as a strategy to optimize processes in biorefineries. In this scenario, microorganisms are sought in different environments, considering the presence of plant biomass as part of their ecological niches, including the intestines of herbivorous insects [11]. Taking this into

account, the present work turned its attention to the fall armyworm, the larval stage of the moth *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a native species from the Western Hemisphere [12], which has also invaded Africa, Asia, and Oceania in recent years [13, 14]. In Brazil, *S. frugiperda* is considered the most important pest of maize (*Zea mays* L.) but also causes damage to cotton (*Gossypium hirsutum* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), rice (*Oryza sativa* L.), and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) [15, 16]. Since the fall armyworm is a leaf eater, the presence of cellulolytic, xylanolytic, and xylose-assimilating yeasts in the intestine of these insects was hypothesized. While recent works have reported the presence of bacteria with these profiles in the microbiota of *S. frugiperda* larvae [17–18], literature still lacks in-depth studies on this matter regarding fungi communities, especially yeasts, in the fall armyworm (FAW) gut. Thus, the present study aimed to evaluate FAW-isolated yeasts' hydrolytic and fermentative performances. This is the first study to proceed with such analysis and the first to report *Papiliotrema laurentii* and *Meyerozyma caribbica* as part of FAW's microbiota.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Insect source

A field population of *S. frugiperda* was collected in January 2019 in transgenic maize in Santa Maria, RS, Brazil (29°43'20"S; 53°33'34"W). After collection, 500–700 larvae/generation were reared on an artificial diet based on white beans, wheat germ, and soybean meal, as proposed by Greene et al. [19]. After pupation, pupae were transferred to acrylic boxes until moth eclosion. Then, adults were transferred to PVC cages (22 cm in height × 20 cm in diameter; 50–70 adults/cage) coated with yellow paper and closed with a sheer fabric. Adults were fed a mixture of 10% honey-water solution on cotton, with eggs collected every two days.

2.2.2 Yeast isolation and identification

After the eggs were hatched, the larvae were reared under optimal environmental conditions, with an approximate temperature of 26 °C and relative humidity of approximately

65% [20]. The larvae were fed non-Bt corn leaves (without the expression of *Bacillus thuringiensis* toxins). When they reached the 5th or 6th instar (at the end of the larval phase), they were subjected to the dissection process, according to Cadete et al. [21]. The larvae were submerged in 70% ethanol for 1–2 minutes. Subsequently, this material was washed with saline solution at a concentration of 0.85% to avoid contamination by external microorganisms when removing the caterpillars' intestines. After asepsis, an incision was made on the back of the larvae for the effective removal of the intestines, which were inoculated in Erlenmeyer flasks with 25 mL minimal YNB medium (6.7 g/L of yeast nitrogen base, pH 5.0) containing 10 g/L of xylose and 0.2 g/L of chloramphenicol (10 intestines per flask). Flasks were incubated at 28 °C on a shaker at 145 rpm until growth was detected by turbidity. Subsequently, one loopful of each tube was streaked on plates containing the same media described above with the addition of 20 g/L of agar. Plates were incubated at 25 °C; yeast morphotypes were purified by repeated streaking on the same media and preserved at -80 °C for later characterization. The strains were assigned as "CHAP" plus a number, following the collection numbering of this research group.

For taxonomic identification, the variable domains D1/D2 of the large subunit (LSU) rRNA gene (amplified by primers pair LR0R, 5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3', and LR3, 5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3') were sequenced [22]. PCR was performed directly from the colony grown on the YNB medium, picked with a sterilized toothpick. The amplified DNA was concentrated, cleaned, and sequenced in an automatic capillary DNA sequencer 3500 xL (Applied Biosystems, Foster City, USA) using Big Dye 3.1 reagent. The consensus obtained from the forward and reverse sequences were edited and aligned using the program BioEdit. After that, they were compared with those included in the NCBI GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The LSU genes of the strains CHAP-158 and CHAP-204 were deposited in NCBI under the numbers OQ236602 and OQ236566, respectively. The forty-eight most similar sequences, only from type material, with query cover $\geq 95\%$, were used for assembling phylogenetic trees. Sequences' alignment, distance matrix analysis, and phylogenetic tree assembling (through neighbor-joining method with one hundred bootstrap replication) were carried out with the software Mega 11 [23].

2.2.3 Culture conditions and enzyme activity analyses

For the cellulolytic and xylanolytic activity analyses, the forty-six yeasts were cultivated in rich YP medium (1% yeast extract, 2% peptone), pH 5.0, containing, respectively, 1% carboxymethylcellulose (CMC) or 1% xylan in Erlenmeyer flasks with 1/5 of their volume filled with culture medium. After 96 h of incubation at 30 °C under agitation at 145 rpm, 1 mL of the medium of each culture was centrifuged (5 min at 5000 g), and the collected supernatants were used for enzymatic activity determination.

Assays were performed following a protocol adapted from Kim et al. [24]. Briefly, 10 μ L of supernatant collected from each culture (as described above) were transferred to 96-well microplates with 15 μ L of 0.15 M Succinate-Tris Buffer containing 10 g/L of CMC or xylan (pH 5.0), aiming to allow the enzymes in the collected supernatant to hydrolyze the polysaccharides into glucose or xylose. The reaction occurred with the plate sealed (with AccuClear Sealing Film — E&K Scientific) for a one-hour period in ultrathermostated water baths at a temperature of 50 °C. As negative controls, 10 μ L of sterile (not inoculated) culture medium (with CMC or xylan) was used.

After incubation, the reducing sugars (glucose and xylose) concentration in each well was determined as described by dos Lucaroni et al. [25]. To this end, a calibration curve was prepared by adding increasing concentrations of glucose or xylose (0 to 2 g/L) to new wells. Then, 25 μ L of DNS (1% 3,5-dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium double tartrate in 0.4 M NaOH) was added to all wells (containing the samples, the negative control, and the standard curve). The plate was again sealed and, this time, incubated for 5 min at 100 °C for the reaction with DNS. Subsequently, 330 μ L of distilled water was added to each well, and the absorbance measurements were immediately performed in a microplate reader under a wavelength of 490 nm. Based on the amount of glucose or xylose in the wells, cellulase and xylanase activity (respectively) were expressed as U/mL, where one unit (U) corresponds to 1 nmol of sugar released per min at 50 °C.

Each strain's hydrolase activity determination was carried out in triplicate. The results of the enzymatic activity were submitted to analysis of variance (ANOVA) with p-value < 0.05, in order to verify if the sample groups differed significantly from the control group (culture medium), and Tukey's test with acceptance of 95% (p<0.05), to verify whether

the sample groups differed significantly from each other. These statistical analyses were carried out in the software GraphPad Prism. Data are presented as means \pm standard.

2.2.4 Screening xylose-assimilating yeasts

After 48 h of pre-growth in YP medium with 2% glucose, the forty-six isolated yeast strains were inoculated in Erlenmeyer flasks with YNB minimal media containing 2% glucose or xylose (100 μ L of inoculum in 10 mL of medium) to screen their cell growth and sugar consumption capacities. The flasks were incubated at 30 °C for 24 h with constant agitation at 145 rpm. After that, a 1-mL aliquot was collected to measure cell biomass through optical density at 600 nm (OD_{600nm}). The remainder of the aliquot was centrifuged at 5000 g for 3 minutes, and its supernatant was used to quantify the remaining reducing sugar amount through the microplate DNS method [25] as described above.

2.2.5 Microscale cellular growth

After the screening described above, the fourteen best-performed strains were selected for an experimental design. Their cells were pregrown for 48 h at 30 °C in cotton-plugged Erlenmeyer flasks with 1/5 of their volume filled with rich YP medium, pH 5, containing 2% glucose in a shaker at 145 rpm before being inoculated in 96-well microplates (1 μ L inoculum in 100 μ L of medium per well). Microscale cellular growth analysis took place in a Tecan GENios microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) at 30 °C and 160 linear agitations (1 mm of amplitude) per min. All wells in the plate were tightly sealed with AccuClear Sealing Film, and growth in each well was monitored by measuring the optical density (OD_{600nm}) every 15 min. Cells were cultured in rich YP medium with variable concentrations of a sugar mixture (1:1, glucose:xylose) and pH, according to the Central Composite Rotatable Design (CCRD) matrix assembled and analyzed using the Protimiza Experimental Design software [26], as summarized in Table 2.1.

The cell biomass yield was determined by the quotient between the highest cell concentration produced and the sugar concentration available in the medium before the inoculum. The productivity of cell biomass was calculated by the quotient between the cell

concentration produced and the elapsed time (every 15 min). The highest value was assumed as the maximum productivity.

Table 2.1 Central Composite Rotatable Design (CCRD) matrix with two independent variables (sugar concentration and pH) for the microscale cellular growth and batch fermentation assays. Numbers between parentheses represent the coded values. Assays 9 to 11 represent the center-point triplicate of the CCRD.

Assay	Microscale growth			Batch fermentation		
	Total (g/L)*	sugar	pH	Total (g/L)*	sugar	pH
1	30.0 (-1)		3.0 (-1)	30.0 (-1)		4.0 (-1)
2	90.0 (+1)		3.0 (-1)	90.0 (+1)		4.0 (-1)
3	30.0 (-1)		8.0 (+1)	30.0 (-1)		10.0 (+1)
4	90.0 (+1)		8.0 (+1)	90.0 (+1)		10.0 (+1)
5	17.57 (-1.41)		5.5 (0)	17.57 (-1.41)		7.0 (0)
6	102.43 (+1.41)		5.5 (0)	102.43 (+1.41)		7.0 (0)
7	60.0 (0)		1.96 (-1.41)	60.0 (0)		2.76 (-1.41)
8	60.0 (0)		9.04 (+1.41)	60.0 (0)		11.24 (+1.41)
9	60.0 (0)		5.5 (0)	60.0 (0)		7.0 (0)
10	60.0 (0)		5.5 (0)	60.0 (0)		7.0 (0)
11	60.0 (0)		5.5 (0)	60.0 (0)		7.0 (0)

* The total sugar amount represents the sum of both glucose and xylose, added at the same concentration (1:1, glucose:xylose).

2.2.6 Batch fermentation

After microscale growth, the two best-performed yeasts (with the highest cellular biomass yield and productivity) were submitted to batch cultures in Erlenmeyer flasks aiming to evaluate their kinetics of sugar consumption and ethanol or xylitol production. To this end, their cells were pregrown during 48 h as described above and then inoculated (500 μ L) in 50 mL of YP medium with 3.0 g/L of acetic acid, 0.8 g/L of formic acid, 0.2 g/L of furfural, and 0.1 g/L of hydroxymethylfurfural. According to the CCRD matrix summarized in Table 1, the media were prepared with variable concentrations of sugar (1:1, glucose:xylose) and pH.

The assays were carried out at 30 °C with shaking (145 rpm) in cotton-plugged Erlenmeyer flasks (as described above) for 48 h. Culture samples were harvested regularly,

centrifuged (5000 g, 3 min), and their supernatants were used to quantify sugars, ethanol, and xylitol through HPLC (see below). Ethanol and xylitol yields and the percentual of sugar consumption were determined as the CCRD responses. Ethanol yield was calculated through the quotient between the maximum ethanol produced and the glucose available in the media. Xylitol yield was determined by the quotient between the maximum xylitol produced and the available xylose.

2.2.7 Analytical methods

The determination of glucose, xylose, xylitol, and ethanol was carried out according to Tadioto et al. [27]. Initially, the samples of the supernatants were filtered through 0.45- μ m filters before transfer to chromatographic vials. The concentrations of the compounds were determined using HPLC (LCMS-2020, Shimadzu), with a refractive index detector (RID-10, Shimadzu) and a column for organic acids (Aminex HPX-87H, Bio-Rad). The mobile phase used 5 mM sulfuric acid at 50 °C with a flow rate of 0.6 ml/min. Calibration curves were established for all samples using seven concentrations ranging from 0.25 to 20 g/L for carbohydrates and 0.125 to 10 g/L for xylitol and ethanol.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1 Yeast isolation and enzymatic analysis

The larval stage of *S. frugiperda*, also known as fall armyworm (FAW), is an agricultural pest, mainly of corn crops [13]. Due to its leaves' diet, one can presume that this caterpillar would have an intestinal microbiota able to provide it with cellulases and xylanases to hydrolyze the polysaccharides of the lignocellulosic biomass that serves the insect as food [11]. Given this scenario, it was decided to prospect, in the intestine of these caterpillars, yeasts with biotechnological potential for 2G biorefineries, which employ lignocellulosic residues as raw material. Although previous studies have already characterized bacteria isolated from *S. frugiperda* larvae [17, 18], until the present work, the literature lacked in-depth studies with yeasts from the microbiota of these invertebrates.

From ten Erlenmeyer flasks with ten larval guts in each, 46 yeast strains were isolated. Regarding the total of larvae dissected, the number of yeasts isolated may be considered low; however, it is worth noting that previous reports have shown that the bacterial biodiversity in FAW guts may be orders of magnitude higher than fungal. According to Yuning et al. [28], the number of bacterial species can range from 13 to 43 times higher than fungal ones. In another authors' study, this number was up to 390 times higher [18]. In both reports, the diversity of bacterial and fungal species was shown to be dependent on the plant species the larvae were fed in. Furthermore, within the kingdom Fungi, the mold genera *Penicillium* and *Aspergillus* may account for >80% of fungal species in FAW guts [18, 28], leaving little room for yeasts.

The hydrolytic capacities of the 46 isolated strains were analyzed against cellulose and xylan. Sterile media were used as negative controls. Since even the assays with sterile media showed some quantities of reducing sugar, all the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) with p -value < 0.05, in order to verify if the sample groups differed significantly from the culture medium. Thus, considering ANOVA, 14 strains displayed cellulase activity (Fig. 2.1). Among them, the strains CHAP-185, CHAP-187, CHAP-192, and CHAP-201 stood out, showing the highest cellulase activities compared to the other isolates (in this case, significant differences were analyzed through Tukey's test with acceptance of 95%). On the other hand, regarding xylanase activity, only three out of the 46 strains were able to hydrolyze xylan. Interestingly, the strain CHAP-158 showed a four-time higher activity than the other two xylanase-positive yeasts, CHAP-157 and CHAP-159 (Fig. 2.1).

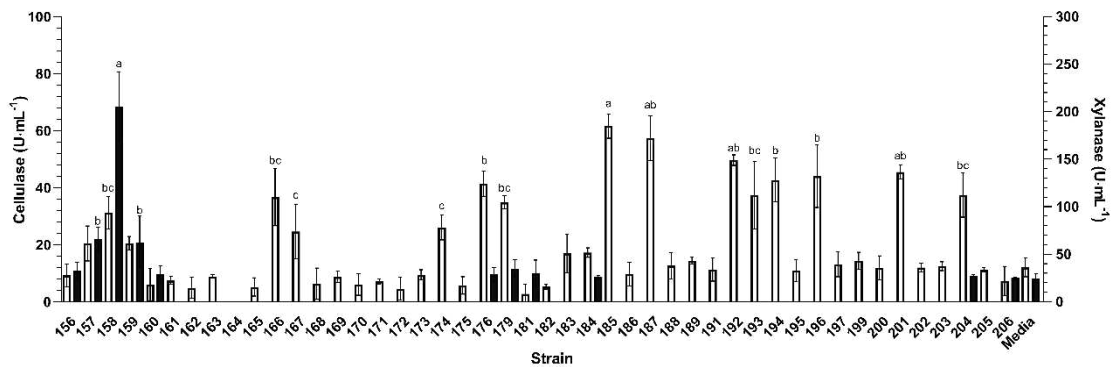


Fig. 2.1 Cellulase (white bars) and xylanase (black bars) activity by the forty-six strains. The data were submitted to ANOVA (p -value < 0.05) to compare the sample groups to the control.

Lowercase letters denotes a statistically significant difference. Different letters represent statistically significant differences between sample groups according to Tukey's test with acceptance of 95% ($p < 0.05$). Data are presented as means of three independent experiments \pm standard deviations. One unit (U) corresponds to 1 nmol of sugar released per min at 50 °C

Kim et al. [24] carried out a similar cellulase and xylanase activity assay and found only one yeast (*Cryptococcus saitoi*) — among 116 wild bacterial and fungal isolated strains — with cellulolytic and xylanolytic activity. This yeast displayed ~ 180 and ~ 200 U/mL activities for cellulase and xylanase, respectively. While the xylanolytic activity those authors found for *C. saitoi* was similar to the one seen for CHAP-158 (the highest activity found in the present work), the *C. saitoi* cellulolytic activity corresponds to almost three times the highest herein observed (for CHAP-185). On the other hand, when Vyas and Chhabra [29] were prospecting cellulolytic yeasts in soil rich in cellulosic waste, the best performance they found among 139 colonies was for *Cystobasidium oligophagum*, which showed a carboxymethylcellulase activity of 72 U/mL, which is quite similar to that found for CHAP-185 (61.6 U/mL, see Fig. 1). Morais et al. [30] found xylanase activity in 13% of their isolates, which corresponds to 44 strains. Among them, only three showed a slightly higher xylanase activity (210–260 U/mL) than that observed for CHAP-158 (205.5 U/mL). Similarly, Sena et al. [31] found seven new xylanolytic species of the genus *Sugiyamaella* (isolated from sugarcane bagasse), and the highest activity they observed was 140 U/mL for *Sugiyamaella valiantae*.

Although it has been suggested that cellulolytic yeasts are less common in nature than xylanolytic ones [32], the prevalence of cellulolytic yeasts in FAW guts showed to be higher, despite yeasts having been selected for their ability to assimilate xylose (product of xylan hydrolysis). This is due to their association, in natural environments, with xylanolytic microorganisms, which agrees with the observation of many more yeasts displaying xylose-assimilating capacity than xylanase activity [33]. Moreover, considering the guts of these larvae as a lignocellulosic-rich environment, the present data are corroborated by Cadete and coworkers [33]. Among the 21 yeast species those authors pointed out as widely associated with lignocellulosic material, 15 have shown cellulolytic activity, while xylanases have been observed in 13. Thus, the results herein presented indicate that yeasts aimed for 2G

biorefinery purposes can be found in FAW guts, although the prevalence of yeasts showed to be quite low compared to other microorganisms in this environment.

2.3.2 Xylose-assimilating yeasts

As expected, all the strains were able to grow in and consume glucose (data not shown). Indeed, most yeast species show glucose-positive phenotypes [9, 34], and in the present study, cells were cultured in glucose just as a control. In contrast, their phenotypes on xylose-containing media were quite variable, although the yeasts were initially selected from the intestines in minimal media containing xylose as the only carbon source. The fourteen highest-growing strains consumed over 88% of the available xylose in minimal YNB medium with 2% of this pentose within a 24-h incubation period (Fig. 2.2).

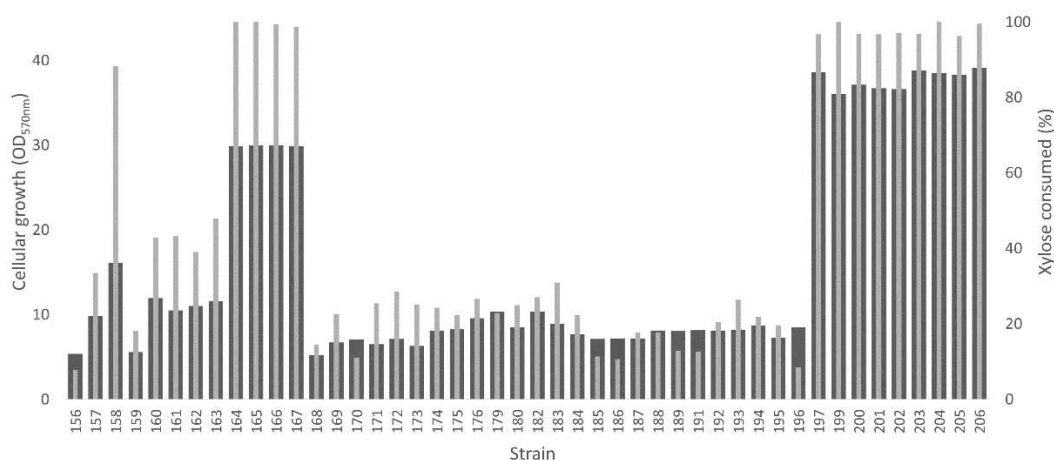


Fig. 2.2 Screening xylose-assimilating yeasts in the forty-six armyworm-isolated yeasts. Maximum cellular growth (thick dark gray bars, background) and percentual of xylose consumption (thin light gray bars, foreground) after 24 h incubation in YNB media with 2% xylose were determined as described in Materials and Methods.

2.3.3 CCRD in microscale culture

The fourteen best-performed yeasts in the xylose-assimilating screening assay (above) were submitted to microscale cultures according to the Central Composite Rotatable Design (CCRD) summarized in Table 1. Each strain was assayed in nine different culture

conditions (being the CCRD's central point carried out in triplicate). After 30-h incubation, cellular biomass yield and maximum productivity were calculated (Table 2.2) — see also the 126 growth curves in Fig. 2.3.

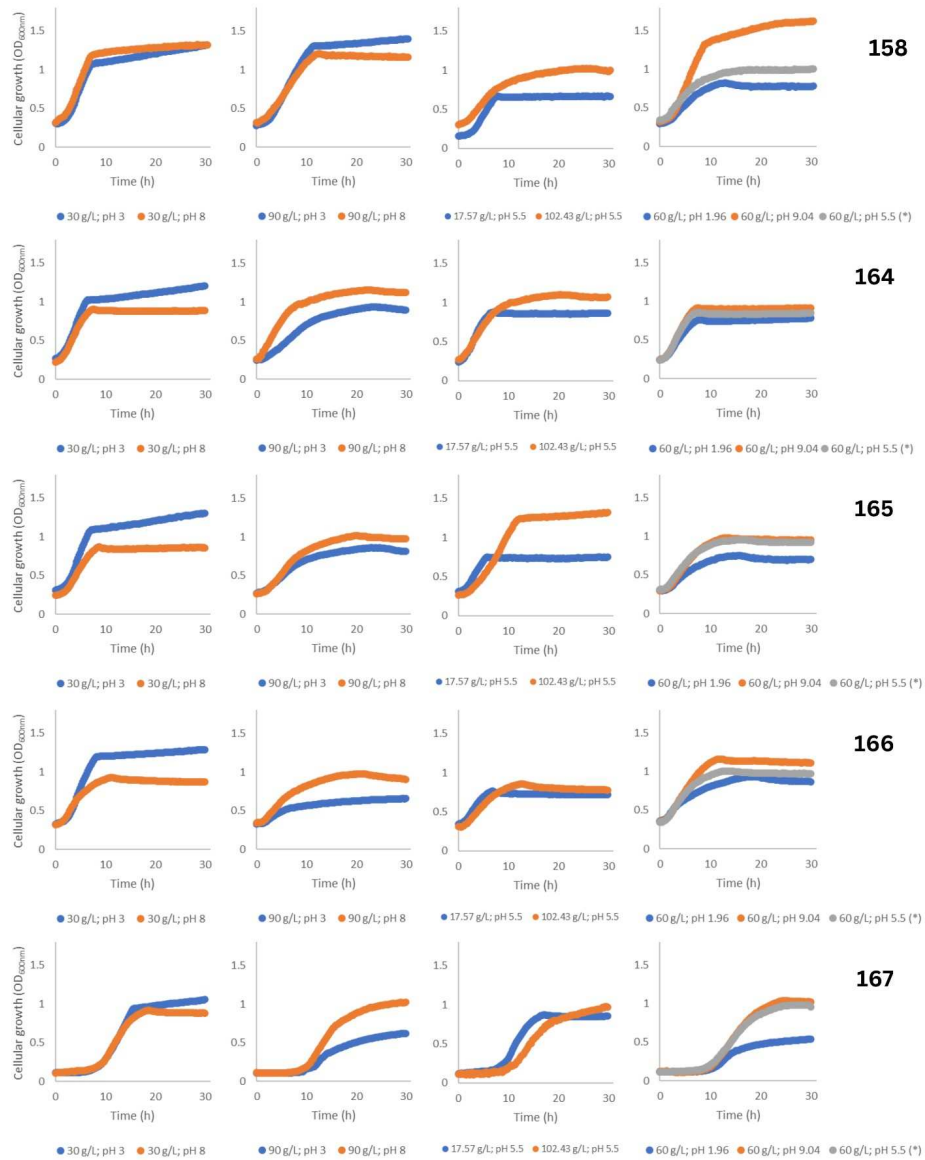


Fig. 2.3 Cellular growth curves by the fourteen strains subjected to the CCRD in microscale culture summarized in Table 2.1. In each plot, symbols stand for the combination of different sugar concentrations and pH values ([sugar]; pH). Center-point triplicates are represented by their means in gray circles (*). The numbers of each strain are listed on the right

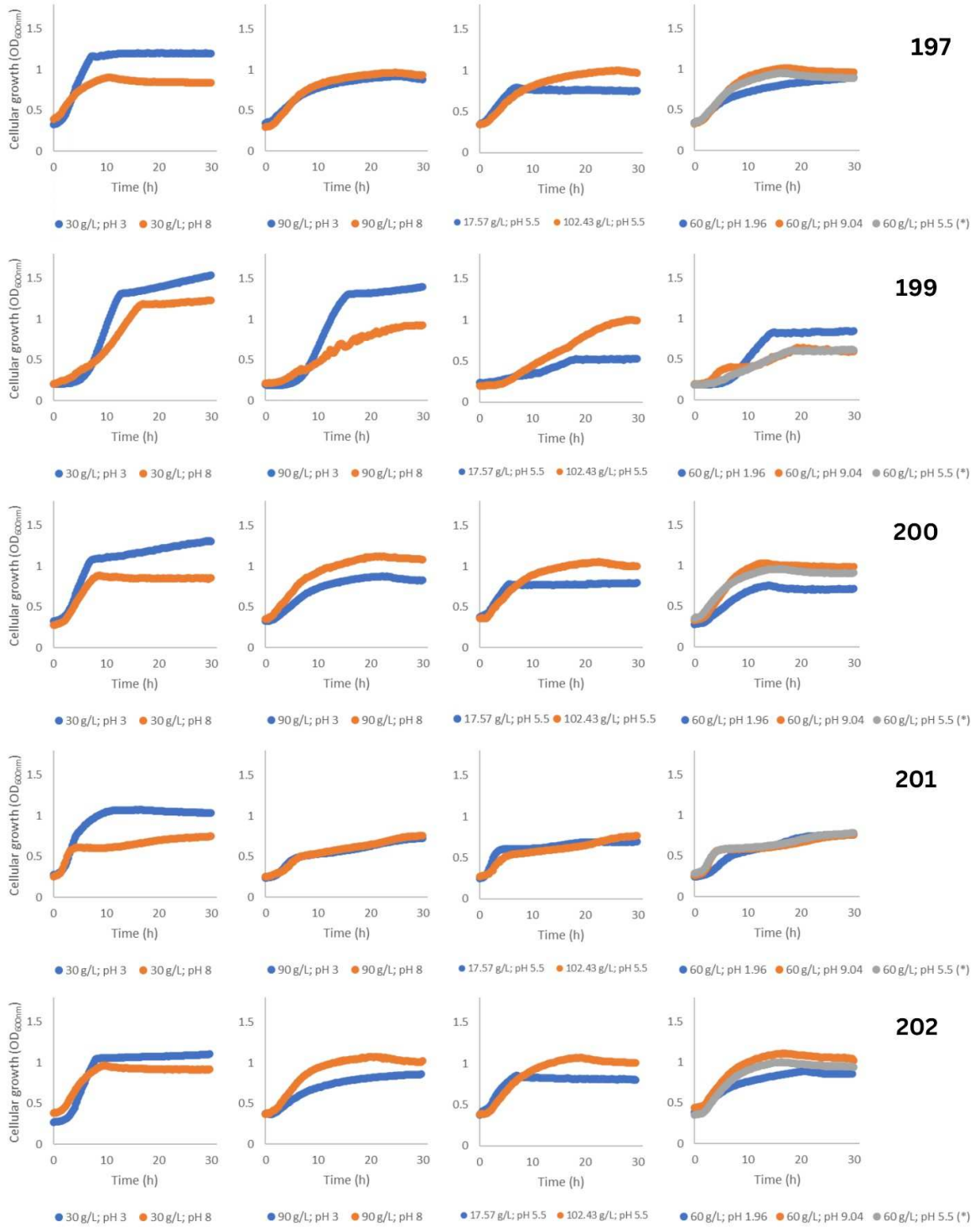


Fig. 2.3 (Continued)

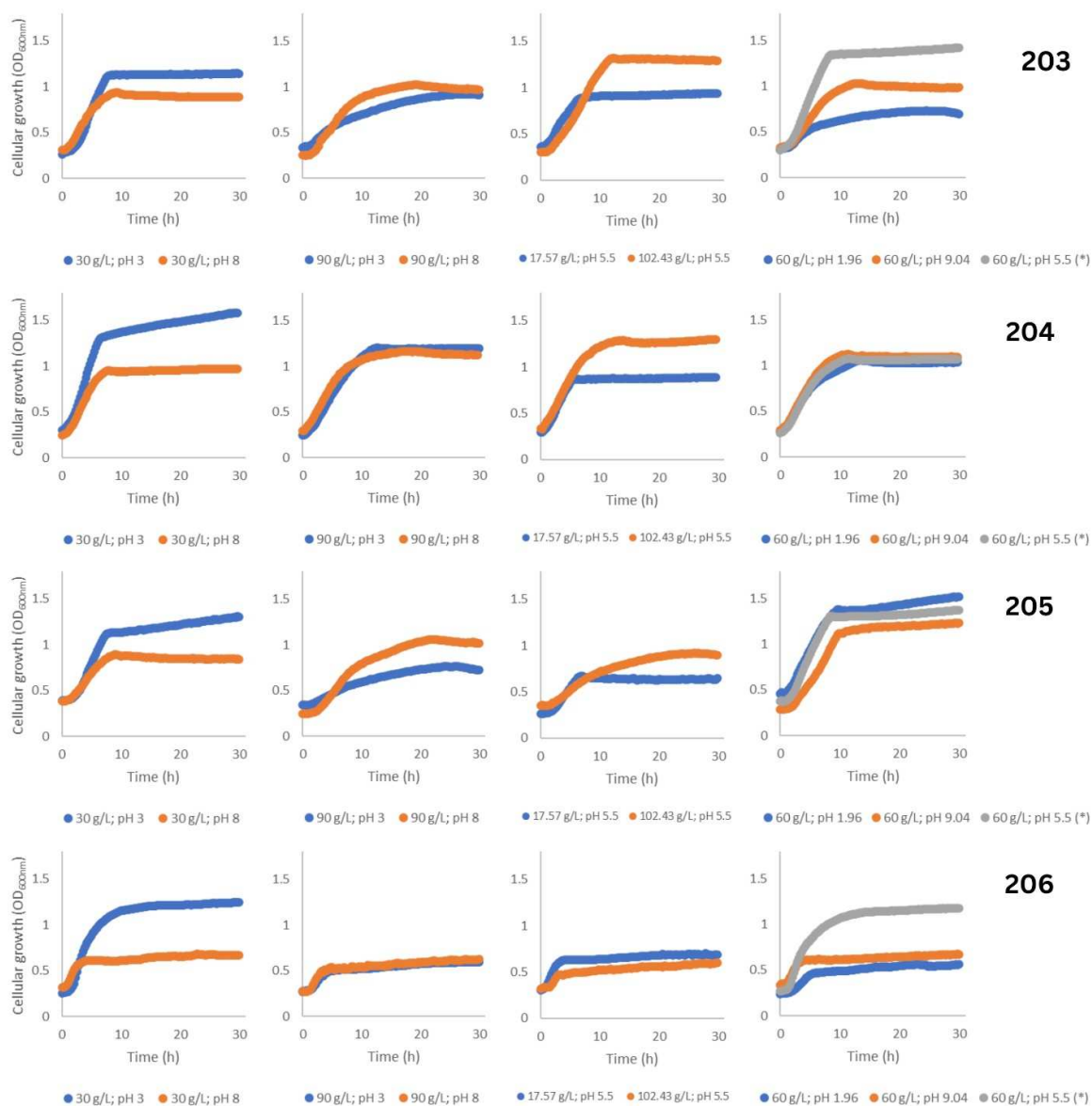


Fig. 2.3 (Continued)

After the CCRD in microscale cultures, it was decided to further analyze the two best-performed strains among the fourteen analyzed. In this sense, in each analyzed condition (run), a top-two ranking was established, and the strains CHAP-158 and CHAP-204 were the ones that ranked most frequently. The strain CHAP-158 displayed the highest or the second-highest biomass yield in four out of the nine runs, while for CHAP-204, the first or second place occurred twice. On the other hand, for the response "cell biomass productivity", the former strain showed the highest or the second-highest values in three runs, while for CHAP-

204, the first or second place happened in eight out of the nine assays (Table 2.1). Thus, considering both responses (yield and productivity), CHAP-158 ranked seven times in the top two, while CHAP-204, ten times. No other strain among the fourteen analyzed showed the same performance as these two.

In this sense, CCRD data of both strains were further analyzed statistically with the software Protimiza [26]. The Pareto charts generated for the response "cell biomass yield" of the two strains show significant negative effects for the variable "sugar concentration" (Fig. 2.3); that is, lower concentrations of sugar tend to promote a higher yield of cell biomass, indicating an eventually harmful effect of high-sugar concentrations or insufficient time for the total consumption of carbohydrates (in situations with higher glucose and xylose titers in the medium). In contrast, the variable "pH" showed no significant influence on cell growth. Furthermore, this variable displayed different trends for the two strains: while, for CHAP-158, the calculated t was positive (suggesting a cells' preference for alkaline environments), for CHAP-204, the calculated t was negative (indicating a preference for lower pH values). In the analysis of the response "cell biomass productivity", no variable exerted a significant effect, although the trends followed the same pattern observed for biomass yield (data not shown).

Table 2.2 Cellular biomass yield and productivity by the fourteen strains subjected to the CCRD in microscale culture. Center-point triplicates (assays 9–11) are represented by their means \pm standard deviations.

Assays (runs)	Strains													
	158*	164	165	166	167	197	199	200	201	202	203	204*	205	206
	<i>Maximum biomass yield (mg/g)</i>													
1	10.1	9.4	10.0	9.6	9.4	8.8	13.3	9.8	8.0	8.4	8.8	12.8	9.2	9.9
2	3.7	2.3	2.0	1.1	1.7	1.9	4.0	1.8	1.6	1.6	2.0	3.2	1.4	1.1
3	10.1	6.8	6.3	6.1	8.1	5.1	10.2	6.1	4.9	5.8	6.3	7.3	5.1	3.7
4	3.0	3.0	2.5	2.1	3.0	2.2	2.4	2.6	1.7	2.4	2.6	2.9	2.7	1.2
5	8.5	10.6	7.4	7.1	12.6	7.5	4.9	7.0	7.4	7.9	9.7	10.0	6.9	6.6
6	2.1	2.4	3.1	1.6	2.5	1.9	2.3	2.0	1.4	2.0	3.0	2.8	1.7	0.8
7	2.7	2.7	2.3	2.9	2.1	2.8	3.3	2.4	2.6	2.5	2.2	3.9	5.3	1.7
8	6.6	3.4	3.5	4.0	4.6	3.4	2.3	3.6	2.5	3.4	3.6	4.2	4.8	1.7
9-11	3.5 \pm 0.1	3.1 \pm 0.0	3.3 \pm 0.1	4.4 \pm 0.9	4.4 \pm 0.1	3.1 \pm 0.0	2.2 \pm 0.1	3.1 \pm 0.0	2.5 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2	5.6 \pm 0.9	4.1 \pm 0.1	5.0 \pm 0.4	4.6 \pm 0.2
	<i>Maximum biomass productivity (mg/L h)</i>													
1	31.7	35.6	33.1	31.8	15.8	34.9	25.8	30.9	33.3	28.8	33.2	46.9	28.9	39.0
2	27.5	13.9	14.1	9.6	6.0	15.6	21.4	12.9	13.5	10.7	14.3	27.2	8.3	16.2
3	35.9	30.0	23.0	22.5	13.6	22.5	17.6	22.6	30.2	21.5	26.3	31.4	19.1	29.7
4	23.2	29.6	18.2	17.4	11.7	18.6	10.2	20.7	11.1	19.3	21.0	30.4	17.0	20.7
5	19.9	31.7	23.6	21.5	13.6	21.2	4.7	22.0	30.3	28.1	24.6	32.2	18.7	31.0
6	18.8	26.6	24.5	17.4	10.8	16.3	9.3	17.8	15.2	17.7	26.2	33.4	11.5	15.0
7	15.9	22.8	13.4	18.3	5.6	15.5	13.3	12.7	11.5	14.7	13.9	58.5	31.3	12.8
8	34.3	30.2	20.8	25.1	11.9	19.6	10.6	21.6	22.8	19.5	21.6	30.9	25.6	25.9
9-11	20.7 \pm 2.0	29.6 \pm 0.2	21.3 \pm 0.6	23.1 \pm 0.4	11.8 \pm 0.9	19.0 \pm 0.3	7.1 \pm 0.1	20.1 \pm 1.0	20.6 \pm 1.2	19.3 \pm 1.4	38.4 \pm 4.6	30.6 \pm 0.4	34.3 \pm 2.7	36.5 \pm 0.1

*For strains CHAP-158 and CHAP-204, each data in bold-italic stands for the highest or the second-highest value in each run among the fourteen strains analyzed.

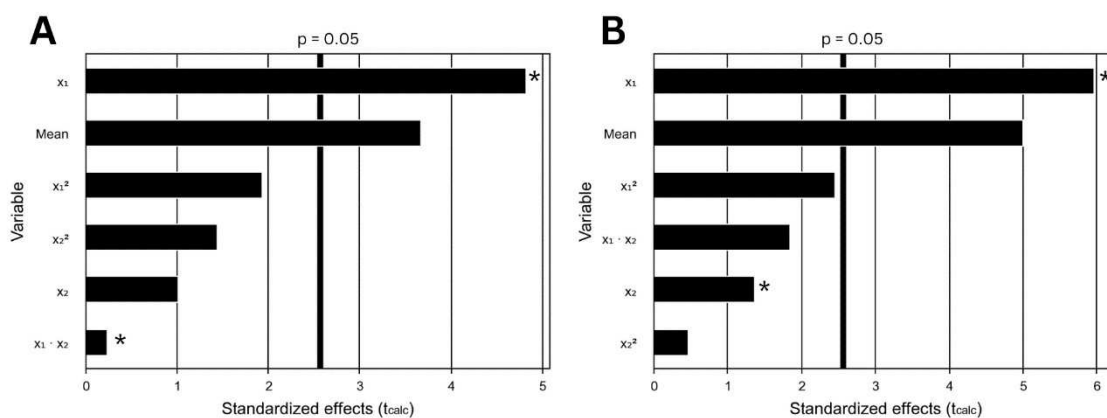


Fig. 2.4 Pareto charts of standardized effects (calculated t) of the studied variables (x_1 , sugar concentration; x_2 , pH) for cellular-biomass yield by strains CHAP-158 (A) and CHAP-204 (B), considering a significance level of 5%. (*) stands for negative calculated t values

Considering CHAP-158 and CHAP-204 as the best-performed strains for 2G biorefinery purposes, their variable domains D1/D2 of large subunit (LSU) rRNA gene were sequenced (accession numbers OQ236602 and OQ236566, respectively), aiming their taxonomic identification. The BLAST analysis showed that strain CHAP-158 shares a 99.85% identity with *Papiliotrema laurentii* CBS139 (type strain, accession number KY108739.1), and CHAP-204 holds a 100% identity with *Meyerozyma caribbica* CBS9966 (type strain, accession number MH545919.1) — distances matrices and phylogenetic trees of both strains against their 48 more closely related species are shown in Fig. 2.5.

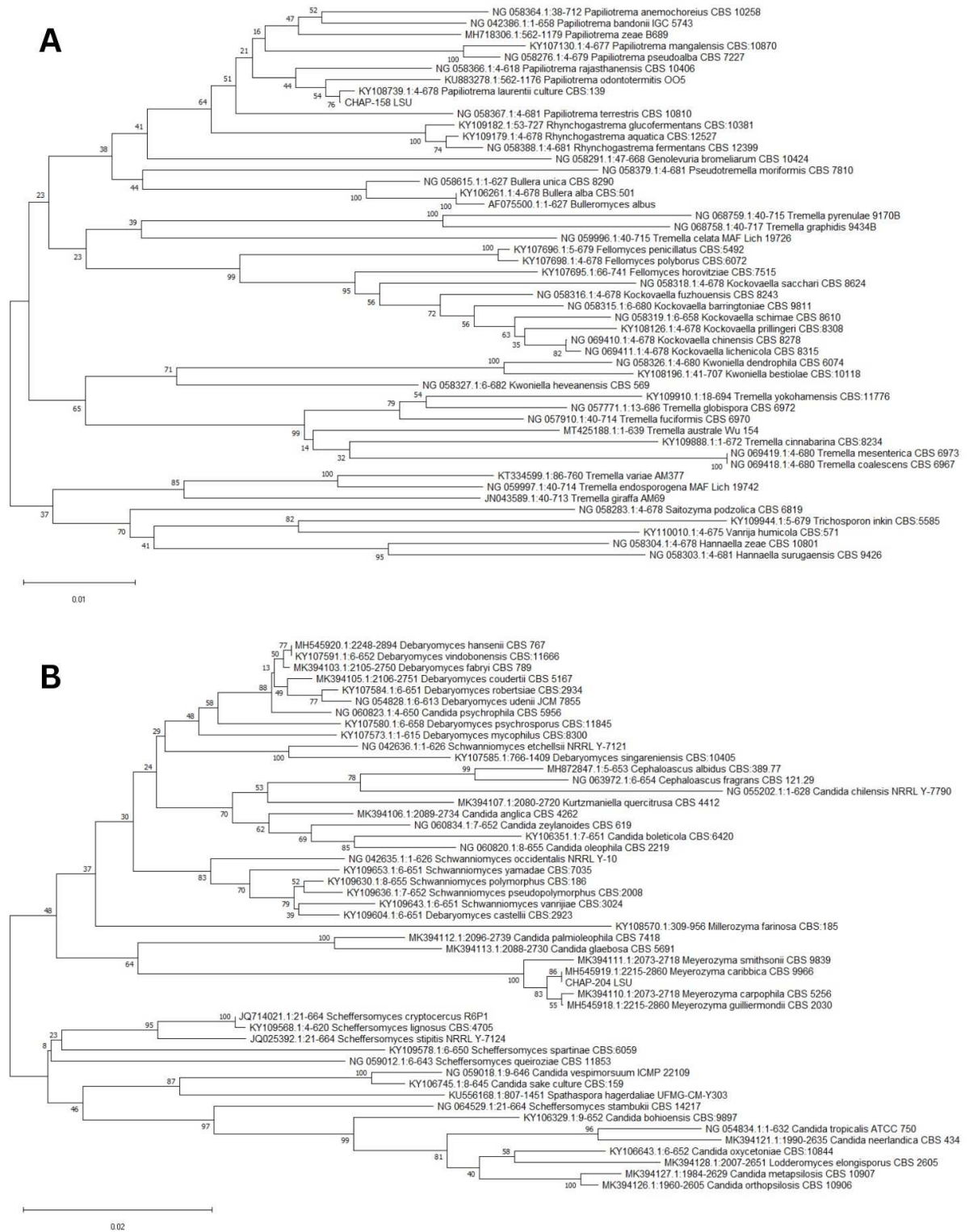


Fig. 2.5 Phylogenetic tree assembled from the variable domains D1/D2 of large subunit (LSU) rRNA gene from CHAP-158 (A) and CHAP-204 (B) and forty-eight closely-related type strains. Each terminal node presents the NCBI accession number, the species name, and

the type strain code. Sequences were retrieved from nucleotide BLAST. The numbers next to internal nodes represent bootstrap values (in 100 replicates). The scale below the tree stands for genetic distance

Although both yeasts species have already been reported in insects' intestines [35, 36], this is the first time they are being reported as part of FAW's gut microbiota. It is worth noting that the acidophilic trait of *M. caribbica* [37] might explain why the pH calculated t value for CHAP-204 has been negative. Also, while *P. laurentii* is widely recognized for its cellulolytic and xylanolytic activities (reviewed by Cadete et al. [33]), only recently have a few studies reported cellulase in *M. caribbica* [35, 38].

2.3.4 CCRD in batch fermentation

In the next step, *P. laurentii* CHAP-158 and *M. caribbica* CHAP-204 went through another CCRD; however, this time in batch fermentation, so sugar consumption and fermentation product yields could be analyzed under the influence of the main fermentation inhibitors found in 2G biorefinery vats — compounds usually generated during pretreatment and hydrolysis. Thus, after inoculation, their kinetics of sugar consumption and ethanol or xylitol production was followed through 48-h experiments in YP media with 3.0 g/L of acetic acid, 0.8 g/L of formic acid, 0.2 g/L of furfural, 0.1 g/L of hydroxymethylfurfural, the major inhibitors in lignocellulosic hydrolysates [39, 40]. The concentrations of these compounds were thus chosen from the average of previously reported values [3, 35, 41-43].

Once the batch fermentation would allow evaluation of different responses (such as ethanol and xylitol yield), the same variables (sugar concentration and pH) were tested (see Table 1). In this case, though, the pH range was extended considering previous reports showing that higher pH values decrease the inhibitory effects of carboxylic acids, such as acetic and formic acids [27, 43], which were added to the batch fermentation media tested. Moreover, in the microscale-growth CCRD analyses presented above, the "mean" showed a significant effect (Fig. 2.4), suggesting intermediate pH and sugar concentration values as better conditions for these yeasts.

The kinetics of glucose and xylose consumption, as well as ethanol and xylitol production, for both strains in each fermentation condition, are shown in Figures 2.6 and 2.7.

Differently from the microscale-growth assays, the lowest pH values strongly jeopardized both strains in the batch fermentations, which showed no or negligible glucose and xylose consumption at pH of 2.76 and 4.0. At the opposite extreme of pH (11.24), the yeasts also faced difficulty metabolizing both carbohydrates, and at pH 10.0, only glucose was consumed.

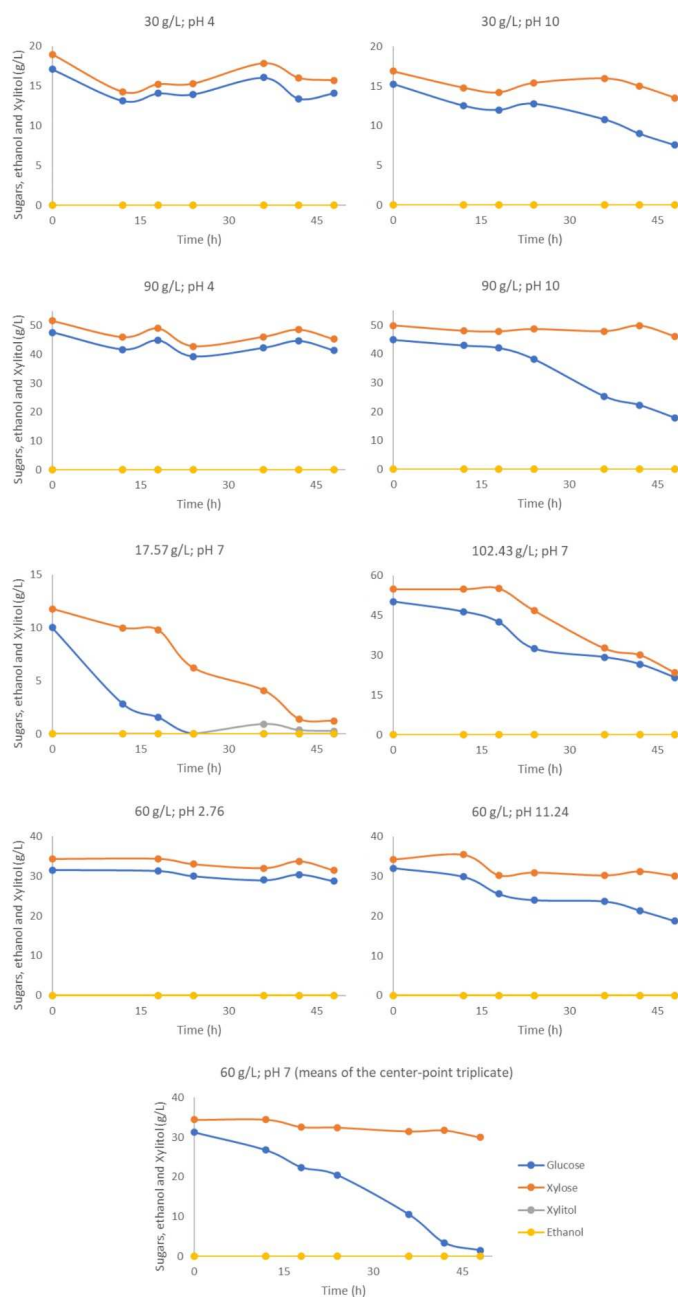


Fig. 2.6 Sugar consumption, ethanol production, and xylitol accumulation curves by *P. laurentii* CHAP-158 subjected to the CCRD in batch fermentation summarized in Table 2.1.

In each plot, symbols stand for the combination of different sugar concentrations and pH values ([sugar]; pH). Center-point triplicates are represented by their means

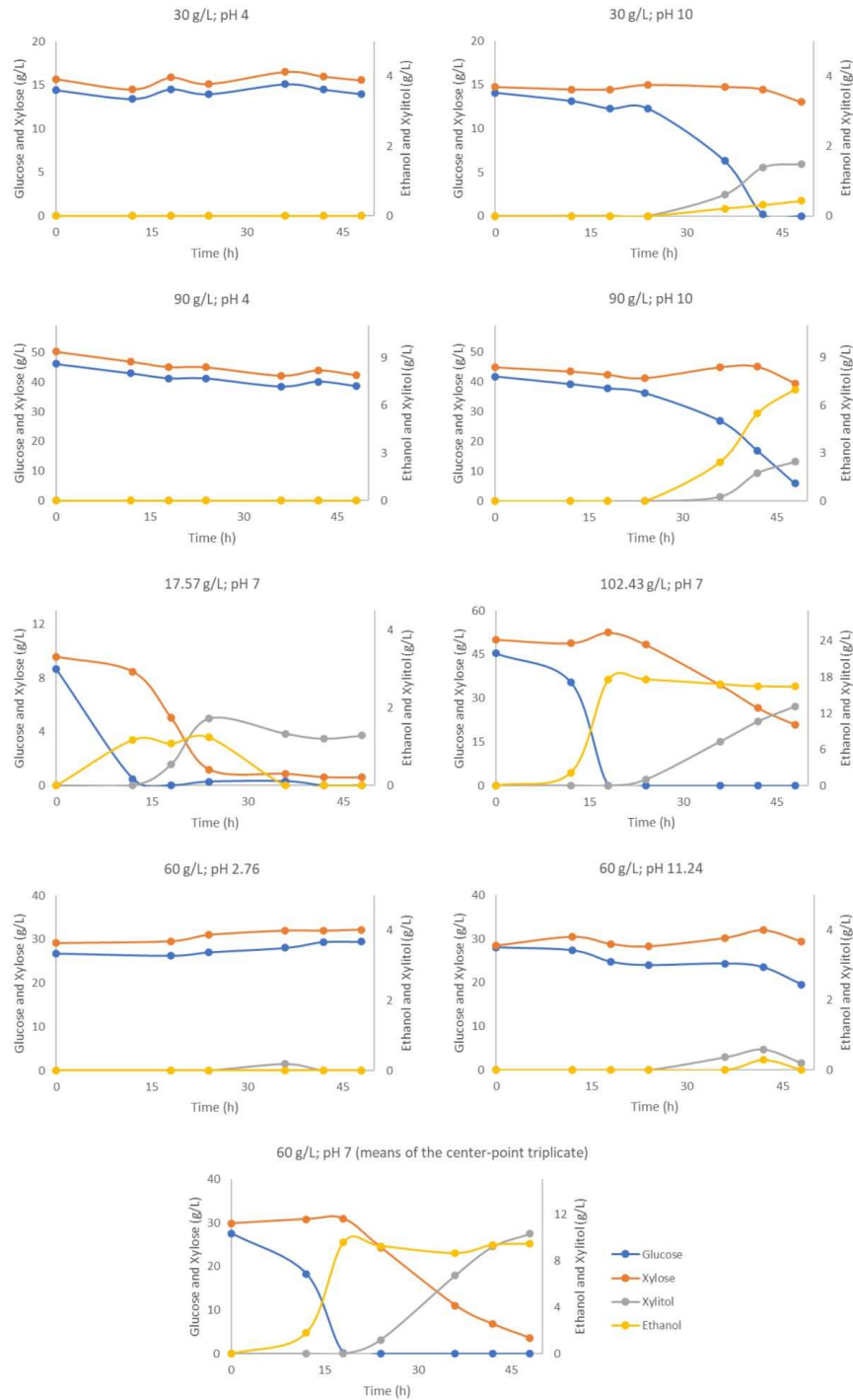


Fig. 2.7 Sugar consumption, ethanol production, and xylitol accumulation curves by *M. caribbica* CHAP-204 subjected to the CCRD in batch fermentation summarized in Table 2.1.

In each plot, symbols stand for the combination of different sugar concentrations and pH values ([sugar]; pH). Center-point triplicates are represented by their means

In almost every assay, the strain *M. caribbica* CHAP-204 performed better than the *P. laurentii* CHAP-158, showing higher ethanol and xylitol production (Fig. 2.7). In fact, *M. caribbica* is known for its capacity to efficiently ferment glucose into ethanol and accumulate xylitol from the xylose available in the medium [9, 37, 44]. In this sense, CHAP-204 was further analyzed statistically considering ethanol and xylitol yield as CCRD's responses. Once again, the "mean" has shown to be significant (data not shown), and, indeed, the response surfaces indicate better yeast performances around the intermediate pH and sugar concentration values (Fig. 2.8). The linear regression of experimental versus predicted values showed high correlation coefficient ($R^2 = 0.914$, for ethanol yield; $R^2 = 0.923$, for xylitol yield), suggesting a satisfying correlation between them. Besides, the calculated F ($F_{\text{regression/residuals}}$) for ethanol (10.6) and xylitol (12.0) yields were at least twice the tabulated F (5.05), thus validating the following empiric coded model for both responses (Eq. 1 and 2, respectively) through ANOVA with p-value < 0.05:

$$Y_{\text{ethanol}} = 358.95 + 61.61 x_1 - 69.28 x_1^2 + 26.63 x_2 - 197.94 x_2^2 + 34.10 x_1 x_2 \quad (1)$$

$$Y_{\text{xylitol}} = 345.36 + 8.44 x_1 - 81.19 x_1^2 + 23.13 x_2 - 186.75 x_2^2 + 11.60 x_1 x_2 \quad (2)$$

where Y stands for yield, x_1 , for sugar concentration, and x_2 , for pH.

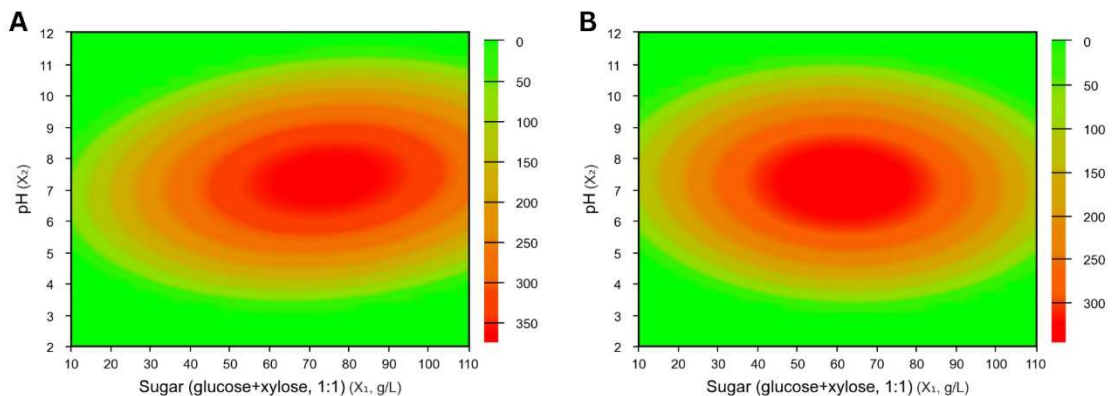


Fig. 2.8 Response surfaces of the studied variables (x_1 , sugar concentration; x_2 , pH) for ethanol (A) and xylitol (B) yields by the strain *M. caribbica* CHAP-204.

Although in the microscale-growth assays the strains were able to grow at low pH, in the batch fermentations (when yeasts were faced with inhibitors), acidic pH values became quite harmful to the cells, even for glucose consumption, corroborating data by Tadioto et al. [27], who showed that acetic acid negatively affected glucose but not xylose consumption by *M. caribbica*. In fact, previous studies have already demonstrated that, under low pH values, weak acids, such as acetic and formic acids, are in their undissociated (thus, liposoluble) form, easily diffusing through the plasma membrane lipid bilayer and reaching the cell cytoplasm. In the cytosol, pH values higher than the external environment promote the dissociation of these acids to their ionic form, releasing protons that decrease cytoplasmic pH and consequently damage the cell [27, 39].

The optimal pH and sugar concentration values obtained were somehow expected because the literature has pointed out that most yeasts do not tolerate extreme environments and may have their metabolism impaired under osmotic stress [45, 46]. However, most studies published so far have focused on traditional industrial yeast species (genetically engineered or not) or analyzed other wild yeasts under different culture conditions and combinations of variables. Besides, some of these studies found optimal values that diverge from those herein presented. Cunha-Pereira et al. [47], for example, assumed a 5.0 optimum pH value for *Meyerozyma guilliermondii* (formerly *Candida guilliermondii*, a very closely related species to *M. caribbica* — see Fig. 2.5 and Tadioto et al. [9]) to produce ethanol and xylitol, although those authors have not combined the pH parameter with variable sugar concentrations. However, in their hydrolysates, Cunha-Pereira et al. [47] had a similar concentration of sugars and found equivalent ethanol yields but lower xylitol. In contrast, another *M. guilliermondii* strain was tested by Silva and Roberto [48] and showed higher xylitol yields under an optimum xylose concentration of 82 g/L, which is in agreement with the values herein presented (Fig. 2.8). Those authors, though, analyzed their yeast in culture medium with no glucose and did not consider pH as a tested variable.

Therefore, this is the first time a caterpillar-isolated yeast — or even a *M. caribbica* strain — has been subjected to the conditions herein analyzed. Also, no other study has evaluated the combined effects of sugar concentration and pH under the main fermentation inhibitors with wild yeasts and gotten optimized values. Besides, more than restricted optimal points, our results show a range of sugar concentration (~55–85 g/L) and pH values (~6.0–

8.5), which, combined, provides both the highest ethanol (>350 mg ethanol/g glucose) and xylitol (>300 mg xylitol/g xylose) yields (Fig. 2.8). This makes more flexible an eventual employment of this yeast in bioprocesses (regarding both variables' adjustment).

Furthermore, it should be noted that the concomitant presence of all the inhibitors represents a very hostile condition for yeast cells. Indeed, previous works have already demonstrated the tolerance of yeasts to higher concentrations of these inhibitors, but in isolation, not all combined in such titer levels [3, 25, 27, 41-43]. Thus, taking together, the data found in the present study show the high biotechnological potential of at least two of the 46 strains isolated from armyworms' guts, namely the strains CHAP-158 and CHAP-204, representatives of the species *P. laurentii* and *M. caribbica*, respectively. In this regard, future works could evaluate both yeasts combined in Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) processes, considering (i) the high xylanolytic capacity of CHAP-158, (ii) the cellulase activity of both, and (iii) the ability of CHAP-204 to convert glucose into ethanol and xylose into xylitol under inhibitory conditions. Besides, previous reports have already shown an improvement in yeast performances whenever they are in co-cultures [10, 49, 50], which could lead to higher yields of both biorefinery products.

2.4 CONCLUSION

This is the first study to evaluate the cellulolytic, xylanolytic, and xylose-assimilating capacities of fall armyworm-isolated yeasts. Fourteen of the forty-six isolated strains were able to hydrolyze carboxymethylcellulose, and three displayed xylanase activity. When the fermentative capacities of the two best-performed yeasts (*P. laurentii* CHAP-158 and *M. caribbica* CHAP-204) were analyzed through CCRD, ethanol and xylitol production were optimized. Considering their hydrolytic and fermentative performances, both yeasts could be concomitantly employed in SSF processes. Taking together, the results highlight the importance of studying microbial biodiversity and prospecting yeasts in leaf-eater insects.

REFERENCES

1. Scapini T, Klanovicz N, Camargo A, et al (2023) Future of Biorefineries from a Circular Economy Perspective. In: Nyström W (ed) **The Future of Biorefineries**, 1st ed. Nova Science, New York, pp
2. van Dyk JS, Pletschke BI (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnol Adv** 30:1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
3. Bohn LR, Dresch AP, Cavali M, et al (2021) Alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover for bioethanol production. **Research, Society and Development** 10:e149101118914. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.18914>
4. Alves Jr SL, Scapini T, Warken A, et al (2022) Engineered Saccharomyces or Prospected non-Saccharomyces: Is There Only One Good Choice for Biorefineries? In: Alves Jr. S, Treichel H, Basso T, Stambuk BU (eds) **Yeasts: From Nature to Bioprocesses**. Pp 243–283
5. Jansen MLAA, Bracher JM, Papapetridis I, et al (2017) Saccharomyces cerevisiae strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS Yeast Res** 17:44. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>
6. Olson DG, McBride JE, Joe Shaw A, Lynd LR (2012) Recent progress in consolidated bioprocessing. **Curr Opin Biotechnol** 23:396–405. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.11.026>
7. Patiño MA, Ortiz JP, Velásquez M, Stambuk BU (2019) d-Xylose consumption by nonrecombinant Saccharomyces cerevisiae: A review. **Yeast** 36:yea.3429. <https://doi.org/10.1002/yea.3429>
8. Antunes FAF, Thomé LC, Santos JC, et al (2021) Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. **Renew Energy** 163:1343–1355. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.020>

9. Tadioto V, Milani LM, Barrilli ÉT, et al (2022) Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World J Microbiol Biotechnol** 38:35. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03221-0>
10. Vargas ACG, Dresch AP, Schmidt AR, et al (2023) Batch Fermentation of Lignocellulosic Elephant Grass Biomass for 2G Ethanol and Xylitol Production. **Bioenergy Res.** <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10559-2>
11. Alves SL, Müller C, Bonatto C, et al (2019) Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology** 15:336-349. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>
12. Pogue MG (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée:(Lepidoptera: Noctuidae). **American Entomological Society Philadelphia**
13. Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, et al (2016) First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. **PLoS One** 11:e0165632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>
14. Wang L, Chen K, Zhong G, et al (2019) Progress for occurrence and management and the strategy of the fall army worm *Spodoptera frugiperda* (Smith). **Journal of Environmental Entomology** 41:479–487
15. Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, et al (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology** 26:286–300
16. Oliveira CE da S, Silva CS, Zoz T, et al (2019) Feeding preference of *Spodoptera frugiperda* on different sorghum genotypes. **Arq Inst Biol (Sao Paulo)** 86:1-6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000992018>
17. Li D-D, Li J-Y, Hu Z-Q, et al (2022) Fall Armyworm Gut Bacterial Diversity Associated with Different Developmental Stages, Environmental Habitats, and Diets. **Insects** 13:762. <https://doi.org/10.3390/insects13090762>

18. Rozadilla G, Cabrera NA, Virla EG, et al (2020) Gut microbiota of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae as revealed by metatranscriptomic analysis. **Journal of Applied Entomology** 144:351–363. <https://doi.org/10.1111/jen.12742>
19. Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **J Econ Entomol** 69:487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
20. Barretto DA, Avchar R, Carvalho C, et al (2018) *Blastobotrys bombycis* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast isolated from the gut of the silkworm larva *Bombyx mori*. **Int J Syst Evol Microbiol** 68:2638–2643. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002890>
21. Cadete RM, Melo-Cheab MA, Dussán KJ, et al (2017) Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. **J Appl Microbiol** 123:1203–1213. <https://doi.org/10.1111/jam.13559>
22. Barrilli ÉT, Tadioto V, Milani LM, et al (2020) Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. **Arch Microbiol** 202:1729–1739. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01884-1>
23. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Mol Biol Evol** 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
24. Kim JJ, Kwon Y-K, Kim JH, et al (2014) Effective Microwell Plate-Based Screening Method for Microbes Producing Cellulase and Xylanase and Its Application. **J Microbiol Biotechnol** 24:1559–1565. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05052>
25. Lucaroni AC, Dresch AP, Fogolari O et al (2022) Effects of Temperature and pH on Salt-Stressed Yeast Cultures in Non-Detoxified Coconut Hydrolysate. **Industrial Biotechnology** 18:205–213. <https://doi.org/10.1089/ind.2021.0029>
26. Rodrigues MA, Iemma AF (2014) Experimental design and process optimization, first edn. **CRC Press**, 1st ed. CRC Press

27. Tadioto V, Deoti JR, Müller C, et al (2022) Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. **Bioprocess Biosyst Eng.** <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02812-x>
28. Yuning L, Luyang L, Xueming C, et al (2022) The bacterial and fungal communities of the larval midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) varied by feeding on two cruciferous vegetables. **Sci Rep** 12:13063. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17278-w>
29. Vyas S, Chhabra M (2017) Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. **Bioresour Technol** 223:250–258. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.039>
30. Morais CG, Sena LMF, Lopes MR, et al (2020) Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. **Fungal Biol** 124:639–647. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.005>
31. Sena LMF, Morais CG, Lopes MR, et al (2017) d-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **International Journal of General and Molecular Microbiology** 110:53–67. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0775-5>
32. Šuchová K, Fehér C, Ravn JL, et al (2022) Cellulose- and xylan-degrading yeasts: Enzymes, applications and biotechnological potential. **Biotechnol Adv** 59:107981. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107981>
33. Cadete RM, Lopes MR, Rosa CA (2017) Yeasts Associated with Decomposing Plant Material and Rotting Wood. In: *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. **Springer International Publishing**, Cham, pp 265–292
34. Santos RO, Cadete RM, Badotti F, et al (2011) *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:635–642. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9536-z>
35. Ali SS, Al-Tohamy R, Koutra E, et al (2021) Coupling azo dye degradation and biodiesel production by manganese-dependent peroxidase producing oleaginous yeasts isolated from wood-feeding termite gut symbionts. **Biotechnol Biofuels** 14:61. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01906-0>

36. Tiwari S, Avchar R, Arora R, et al (2020) Xylanolytic and Ethanologenic Potential of Gut Associated Yeasts from Different Species of Termites from India. **Mycobiology** 48:501–511. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1830742>
37. Arumugam N, Boobalan T, Saravanan S, et al (2020) In silico and in vitro comparison of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent xylose reductase rossmaan fold in Debaryomycetaceae yeast family. **Biocatal Agric Biotechnol** 24:101508. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101508>
38. Rattanapatpokin T, Tachaapikoon C, Waeonukul R, et al (2020) Newly isolated malic acid fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* AY 33-1 for bioconversion of glucose and cassava pulp. **SEATUC journal of science and engineering** 1:62–70. https://doi.org/10.34436/SJSE.1.1_62
39. Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresour Technol** 74:17–24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
40. Davies SM, Linforth RS, Wilkinson SJ, et al (2011) Rapid analysis of formic acid, acetic acid, and furfural in pretreated wheat straw hydrolysates and ethanol in a bioethanol fermentation using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Biotechnol Biofuels** 4:28. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-28>
41. Artifon W, Bonatto C, Bordin ER, et al (2018) Bioethanol Production From Hydrolyzed Lignocellulosic After Detoxification Via Adsorption With Activated Carbon and Dried Air Stripping. **Front Bioeng Biotechnol** 6:. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00107>
42. Vedovatto F, Bonatto C, Bazoti SF, et al (2021) Production of biofuels from soybean straw and hull hydrolysates obtained by subcritical water hydrolysis. **Bioresour Technol** 328:124837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124837>
43. Bonatto C, Venturin B, Mayer DA, et al (2020) Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **Renew Energy** 145:2445–2450. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.010>
44. Trichez D, Steindorff AS, Soares CEVF, et al (2019) Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma*

- caribbica JA9 reveal insights into xylitol production. **FEMS Yeast Res** 19:. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz034>
45. Della-Bianca BE, Gombert AK (2013) Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0030-2>
 46. Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU et al (2013) What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl Microbiol Biotechnol* 97:979–991. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4631-x>
 47. Cunha-Pereira F da, Hickert LR, Rech R et al (2017) Fermentation of hexoses and pentoses from hydrolyzed soybean hull into ethanol and xylitol by *Candida guilliermondii* BL 13. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 34:927–936. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170344s20160005>
 48. Silva CJSM, Roberto IC (2001) Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. *Process Biochemistry* 36:1119–1124. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00153-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00153-4)
 49. Lopes ACA, Costa R, Andrade RP et al (2020) Impact of *Saccharomyces cerevisiae* single inoculum and mixed inoculum with *Meyerozyma caribbica* on the quality of mead. *European Food Research and Technology* 246:2175–2185. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03563-3>
 50. Qadir F, Shariq M, Ahmed A, Sohail M (2018) Evaluation of a yeast co-culture for cellulase and xylanase production under solid state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. *Ind Crops Prod* 123:407–415. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.021>

CAPÍTULO III - ANÁLISE DAS LEVEDURAS EM CONSÓRCIO

3.1 INTRODUÇÃO

Leveduras em consórcio são duas ou mais cepas ou espécies de leveduras trabalhando juntas em um sistema. A combinação de leveduras permite aproveitar suas características específicas. Isso resulta em benefícios sinérgicos, como maior eficiência metabólica, capacidade de degradar uma ampla gama de substratos, melhor tolerância a estresses ambientais e produção de produtos finais desejados (ELTARAHONY *et al.*, 2021).

Na indústria de fermentação de alimentos e bebidas, é comum encontrar consórcios de leveduras. Em processos como a produção de cerveja, vinho e pão, diferentes espécies de leveduras são utilizadas em conjunto para aproveitar suas características distintas. Por exemplo, algumas leveduras são mais eficientes na conversão de açúcares em álcool, enquanto outras contribuem com aromas e sabores desejáveis (DARVISHI *et al.*, 2022).

As leveduras em consórcio também são exploradas em processos de biorremediação, nos quais são usadas para degradar compostos orgânicos presentes em resíduos industriais ou poluentes ambientais. Ao combinar diferentes espécies de leveduras, é possível obter uma maior diversidade de enzimas e vias metabólicas envolvidas na degradação dos poluentes, aumentando a eficiência global do processo (BORDET *et al.*, 2020). Essas vantagens tornam o consórcio de leveduras uma abordagem promissora em várias aplicações industriais e ambientais (AGARBATI *et al.*, 2022).

A tolerância a condições adversas, a estabilidade operacional e a maior eficiência na utilização de recursos são outras vantagens proporcionadas pelo uso de leveduras em consórcio, tornando os processos de biorrefinaria mais eficientes, sustentáveis e resilientes (CRISTOBAL-SARRAMIAN; ATZMULLER, 2018).

A presente pesquisa justifica-se com base na hipótese de que a coexistência de diferentes cepas microbianas em consórcio possa resultar em desempenhos superiores em comparação com suas atuações individuais. Especificamente, postula-se que uma cepa desempenhe um papel central na sacarificação de polissacarídeos, enquanto outra cepa seja responsável pelo metabolismo dos monossacarídeos. Nesse contexto, o objetivo deste capítulo é investigar empiricamente essa hipótese, por meio da realização de experimentos com as cepas isoladamente e em consórcio, buscando avaliar e comparar os respectivos desempenhos.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Preparação do inóculo

Para o pré-inóculo foi usado o meio YPD com 1% extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose em pH 7,0. O pré-cultivo se deu a 30 °C e 200 rpm por 72 h em frascos Erlenmeyer com 20% do seu volume ocupado por 50 mL de meio líquido.

3.2.2 Preparação dos meios com CMC e xilana

Utilizou-se YPDX em pH 7,0, com 1% extrato de levedura, 2% peptona, 0,5% glicose e 0,5% xilose. A partir do YPDX, foram constituídos três meios com xilana e/ou carboximetilcelulose (CMC):

- YPDX + 1% CMC (M1)
- YPDX + 1% Xilana (M2)
- YPDX + 0,5% CMC + 0,5 % Xilana (M3)

3.2.3 Fermentação das cepas CHAP-158 e CHAP-204

Com cada um dos meios acima (M1, M2 e M3) foram realizados quatro experimentos com as cepas CHAP-158 e CHAP-204. Em cada experimento foram analisados separadamente crescimento celular, consumo de açúcar, produção de etanol e xilitol. No experimento 1, realizou-se a fermentação com 500 µL de inóculo de cada cepa em consórcio. No experimento 2, realizou-se o mesmo consórcio porém com adição de inibidores (3,0 g/L de ácido acético, 0,8 g/L ácido fórmico, 0,2 g/L furfural e 0,1 g/L hidróximetilfurfural), esses valores foram pensados a partir da média encontrada em trabalhos anteriores. Já nos experimentos 3 e 4 adicionou-se 1 mL de cada cepa em Erlenmeyers separadamente para fermentação, com o intuito de analisar seus crescimentos celulares de forma independente. Todos os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com 20% do seu volume ocupado por 50 mL de meio líquido a 30 °C e 200 rpm por 96 horas. Em todos os

experimentos, realizaram-se leituras de densidade óptica em espectrofotômetro diariamente às 7h30, 13h30 e 19h30. Nestes mesmos horários, retiraram-se amostras para análise em HPLC.

3.2.4 Análise dos compostos produzidos por HPLC

Analisou-se cada meio de cada experimento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC (LCMS-2020, Shimadzu), com detector de índice de refração (RID-10, Shimadzu) e coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H, Bio-Rad). A fase móvel utilizou ácido sulfúrico 5 mM a 50 °C com uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min. Curvas de calibração foram estabelecidas para todas as amostras usando sete concentrações variando de 0,25 a 20 g/L para carboidratos e 0,125 a 10 g/L para xilitol e etanol.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 3.1 tem-se as curvas de crescimento celular para os três meios (M1, M2 e M3), onde: a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204. As curvas de crescimento das cepas nos meios que continham os inibidores não estão representadas porque não houve crescimento, o que pode ser devido ao estresse causado pelos inibidores somado à viscosidade dos meios contendo os polissacarídeos. A presença de polissacarídeos no meio aumenta sua viscosidade, o que pode gerar dificuldade para o metabolismo celular, especialmente por inibição de proteínas transportadoras na membrana plasmática das células (SAMPEDRO et al., 2002; SAMPEDRO, URIBE, 2004).

O crescimento celular mais significativo foi observado no M2, que continha 1% de xilana, seguido pelo M3, que continha 0,5% de xilana e 0,5% de CMC. Esses resultados podem indicar a capacidade dessas cepas em utilizar a xilana como substrato (TANINO et al., 2010). Além disso, fica evidente que as cepas não teriam apresentado crescimento e não teriam produzido etanol e xilitol (Figura 3.3) na mesma medida apenas com as concentrações iniciais de glicose e xilose (Figura 3.2) (GOLIAS et al., 2000; NAJAFPOUR; YOUNESI; KU ISMAIL, 2004). No consórcio, observou-se um maior crescimento celular na presença de xilana, porém esse aumento não foi observado quando as cepas foram cultivadas isoladamente. Portanto, o que se observa no consórcio é que a CHAP-158 realiza a hidrólise da xilana e a CHAP-204 utiliza a xilose resultante dessa quebra, pois conforme apresentado

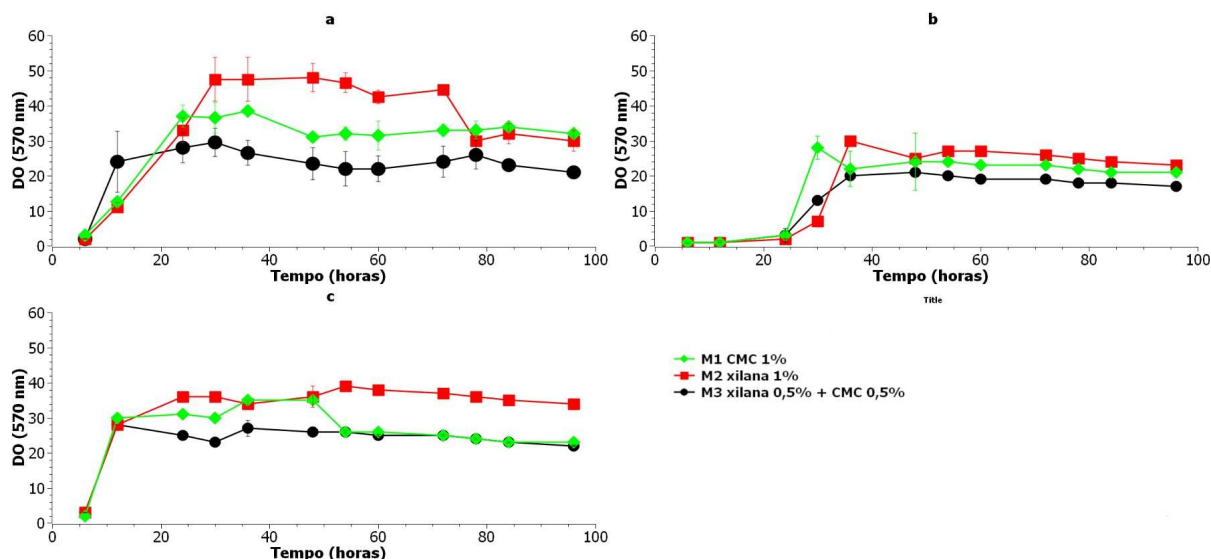
no Capítulo II, não foi observada atividade xilanolítica na CHAP-204, como pode ser visto na Figura 2.1, onde não houve diferença significativa em relação ao controle negativo.

O crescimento menor nos meios contendo CMC já era esperado, tendo em vista que no Capítulo II fora visto que a atividade celulolítica das CHAP-158 e CHAP-204 foi muito menor que a atividade xilanolítica. Assim, neste contexto, os resultados sugerem que o CMC não foi hidrolisado nas condições experimentais aqui citadas.

A sacarificação pode ter sido negativamente influenciada pelas condições experimentais, que apesar de terem sido ideais para a fermentação, podem não ter sido ideais para o bom desempenho das enzimas hidrolíticas das CHAP-158 e CHAP-204. Hama et al., (2014) testaram temperaturas de sacarificação enzimática de 35° e 50 °C e obtiveram maior rendimento na temperatura mais elevada, sendo que neste trabalho a fermentação (utilizando *Saccharomyces cerevisiae* a 35 °C) ocorreu somente após a hidrólise dos polissacarídeos. Como a viscosidade do meio diminui de forma exponencial com o aumento da temperatura, é possível que as cepas destes experimentos demonstrassem maior sacarificação em temperaturas mais altas. Ainda, uma maior agitação poderia aumentar o contato entre os polissacarídeos e as hidrolases e isso poderia facilitar a sacarificação.

A alta densidade celular atingida nos três meios, tanto no experimento com as cepas em consórcio quanto nos experimentos com as cepas separadas, pode ter restringido um crescimento adicional a partir dos polissacarídeos (FROHMAN; MIRA DE ORDUÑA, 2013; MINEBOIS; PÉREZ-TORRADO; QUEROL, 2020; SANTOS *et al.*, 2015). Talvez, se os experimentos fossem realizados novamente sem a presença de monossacarídeos, as cepas fossem forçadas a utilizar mais dos polissacarídeos para seu desenvolvimento.

Figura 3.1 – Crescimento das cepas. a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204

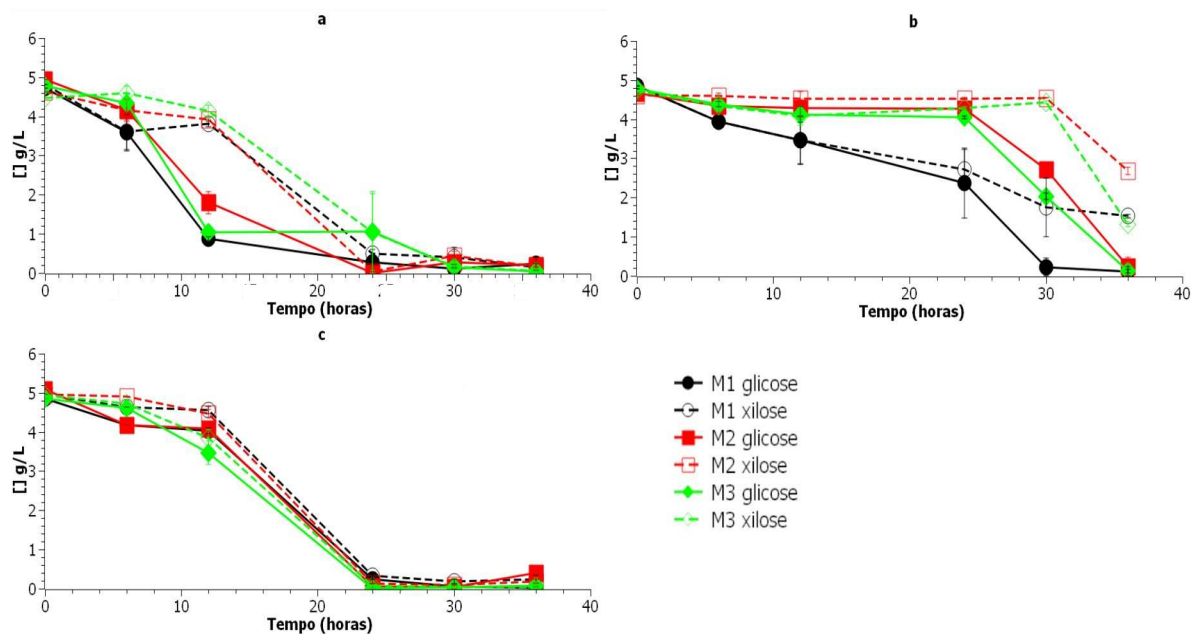


A Figura 3.2 mostra o consumo dos açúcares (glicose e xilose) ao longo do tempo, onde: a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204. O consumo de glicose pelas cepas em consórcio (Figura 3.2 a) em todos os meios foi mais rápido que o consumo da xilose, entretanto, a partir de 30 horas, ambos açúcares estavam completamente consumidos.

O consumo de xilose pela CHAP-158 teve início quando a quantidade de glicose presente no meio já estava em torno da metade da concentração inicial e ao final do experimento a concentração de xilose nos meios M1 e M3 ficou em torno de 1,5 g/L e no M2 em torno de 3 g/L (Figura 3.2 b).

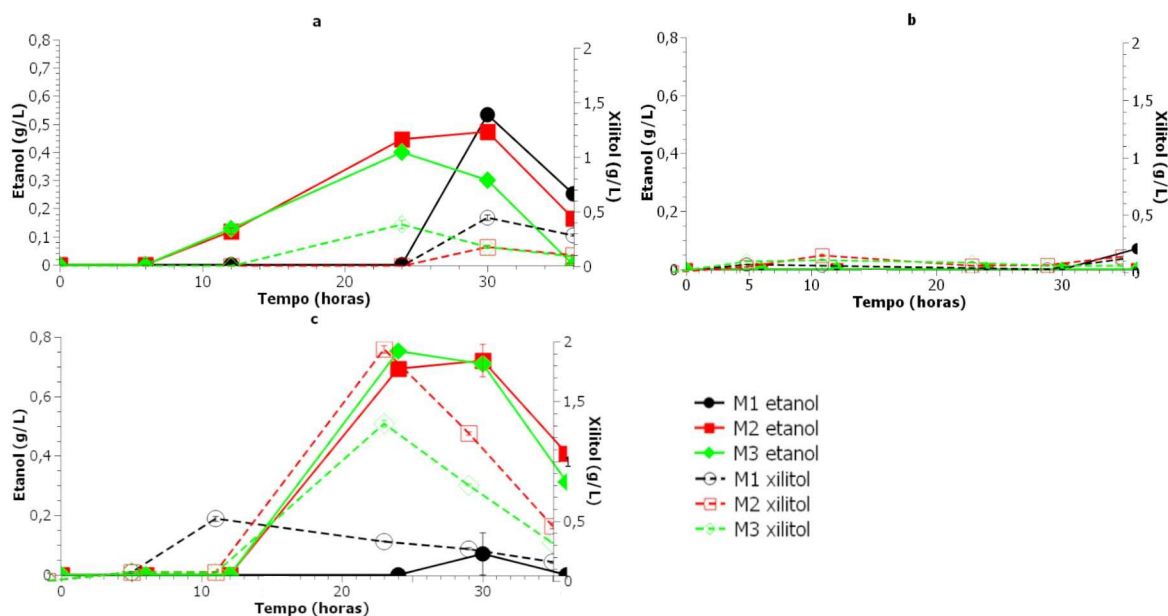
Na Figura 3.2c, que representa o consumo de xilose e glicose pela CHAP-204, é possível observar que não houve diferença nem entre os açúcares e nem entre os meios, ou seja, a *Meyerozyma caribbica* (CHAP-204) é capaz de consumir simultaneamente os dois tipos de açúcares. Comparado aos resultados obtidos pela CHAP-158, a CHAP-204 consumiu os açúcares mais rapidamente, o que pode sugerir que os resultados obtidos pelas cepas em consórcio foram majoritariamente causados por esta cepa. Estes resultados corroboram outros artigos que estudaram a *Meyerozyma caribbica* (NAGARAJAN et al., 2021; SAPUTRA et al., 2020; SUKPIPAT et al., 2017; TADIOTO et al., 2022).

Figura 3.2 – Consumo de glicose e xilose pelas cepas, onde: a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204



Comparando a produção simultânea de etanol e xilitol pelas cepas separadamente (Figura 3.3b e Figura 3.3c) nota-se que a CHAP-204 foi mais eficiente que a CHAP-158. A CHAP-204 produziu mais xilitol do que etanol, contudo tanto a produção de xilitol quanto de etanol foram maiores nos meios contendo xilana.

Figura 3.3 – Produção de etanol e xilitol pelas cepas, onde: a) CHAP-158 e CHAP-204 em consórcio, b) CHAP-158, c) CHAP-204



3.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados destacam o crescimento significativo em meios com xilana, principalmente no consórcio de cepas. Enquanto a CHAP-158 hidrolisou a xilana, a CHAP-204 utilizou os produtos resultantes. A viscosidade do meio e as condições experimentais limitam as atividades enzimáticas. A CHAP-204 demonstra um consumo mais eficiente de açúcares, sugerindo um papel central no consórcio. A alta densidade celular restringe o crescimento adicional, sugerindo a necessidade de otimização. Como perspectiva, seria interessante analisar o consórcio em meios contendo apenas os monossacarídeos glicose e xilose e avaliar outros compostos produzidos, além de etanol e xilitol.

REFERÊNCIAS

- AGARBATI, A. *et al.* Exploitation of Yeasts with Probiotic Traits for Kefir Production: Effectiveness of the Microbial Consortium. **Fermentation**, 2022. v. 8, n. 1.
- ALVES, S. L. *et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology**, 2019. v. 15, n. 6, p. 336–349.
- BORDET, F. *et al.* Yeast-yeast interactions: Mechanisms, methodologies and impact on composition. **Microorganisms**, 2020. v. 8, n. 4, p. 1–33.
- CRISTOBAL-SARRAMIAN, A.; ATZMÜLLER, D.. Yeast as a production platform in biorefineries: conversion of agricultural residues into value-added products. *Agronomy Research*, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 377-388, 2018. **Agronomy Research**. <http://dx.doi.org/10.15159/AR.18.066>.
- DARVISHI, F. *et al.* Applications of synthetic yeast consortia for the production of native and non-native chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2022. v. 0, n. 0, p. 1–16. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2118569>>.
- ELTARAHONY, M. *et al.* Statistical modeling of methylene blue degradation by yeast-bacteria consortium; optimization via agro-industrial waste, immobilization and application in real effluents. **Microbial Cell Factories**, 2021. v. 20, n. 1, p. 1–26. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01730-z>>.
- FROHMAN, C. A.; MIRA DE ORDUÑA, R. Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* during traditional batch and fed-batch alcoholic fermentations at constant sugar concentrations. **Food Research International**, 2013. v. 53, n. 1, p. 551–555. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.020>>.
- GOLIAS, H. *et al.* Characteristics of cellulase preparations affecting the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. **Biotechnology Letters**, 2000. v. 22, n. 7, p. 617–621.
- HAMA, S. *et al.* Saccharification behavior of cellulose acetate during enzymatic processing for microbial ethanol production. **Bioresource Technology**, 2014. v. 157, p. 1–5. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.002>>.
- MINEBOIS, R.; PÉREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A. A time course metabolism comparison among *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* species in wine fermentation. **Food Microbiology**, 2020. v. 90, n. March, p. 103484. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103484>>.

NAGARAJAN, A. *et al.* Particle size influence on the composition of sugars in corncob hemicellulose hydrolysate for xylose fermentation by *Meyerozyma caribbica*. **Bioresource Technology**, 2021. v. 340, n. June, p. 125677. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125677>>.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; KU ISMAIL, K. S. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, 2004. v. 92, n. 3, p. 251–260.

SANTOS, L. D. *et al.* Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, 2015. v. 50, n. 11, p. 1725–1729. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.020>>.

SAPUTRA, H. *et al.* Efficiency of Xylitol Production from *Meyerozyma caribbica* Y67 with Cell Initiation and Volume Fermentation. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 2020. v. 439, n. 1.

SUKPIPAT, W. *et al.* Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2017. v. 123, n. 1, p. 20–27. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.011>>.

TADIOTO, V. *et al.* Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2022. v. 38, n. 2, p. 1–14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03221-0>>.

TANINO, T. *et al.* Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010. v. 88, n. 5, p. 1215–1221.

CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo explorar o potencial biotecnológico das leveduras encontradas no intestino de larvas de *Spodoptera frugiperda* para a produção simultânea de etanol e xilitol.

Isolaram-se 46 cepas de leveduras e duas destas, CHAP-158 (*Papiliotrema laurentii*) e CHAP-204 (*Meyerozyma caribbica*), mostraram-se capazes de hidrolisar celulose e xilana, além de assimilar xilose. *P. laurentii* apresentou alta atividade xilanólítica e capacidade celulolítica intermediária, enquanto *M. caribbica* apresentou alta produtividade de etanol e xilitol em meios que simulam as condições encontradas em biorrefinarias de segunda geração.

Utilizou-se um método de crescimento em microescala em Delineamento Composto Central Rotacional e os resultados indicaram potencial biotecnológico dessas leveduras para o desenvolvimento de processos mais eficientes em biorrefinarias 2G, que possam aproveitar tanto a celulose quanto a xilana e a xilose.

Avaliou-se o potencial das leveduras *P. laurentii* e *M. caribbica* para sacarificação de polissacarídeos e produção simultânea de etanol e xilitol na presença de CMC e xilana. Os resultados são relevantes para a pesquisa em biotecnologia e produção de biocombustíveis e xilitol, pois essas cepas de leveduras podem ser utilizadas em processos de fermentação para produção de etanol e xilitol, aumentando a eficiência na utilização desses resíduos e contribuindo para a sustentabilidade do setor agroindustrial.

Em resumo, os resultados sugerem que leveduras de interesse biotecnológico podem ser prospectadas no intestino de *S. frugiperda* para a produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse industrial, como o xilitol. É importante continuar a pesquisa com outras linhagens e condições de cultivo para expandir o conhecimento e buscar novas oportunidades na produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse industrial.

APÊNDICE A – Resumo publicado no XIV Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada e VI Encontro Latinoamericano de Microbiologia Aplicada

Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada / VI Encontro Latinoamericano de Microbiologia Aplicada Memorias del XIV Simposio Brasileño de Microbiología Aplicada / VI Encuentro Latinoamericano de Microbiología Aplicada

PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ASSIMILADORAS DE XILOSE E GLICOSE NA MICROBIOTA DO INTESTINO DE LAGARTAS *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Maria Luíza Rodrigues Albarello^{1,2}, Letícia Milani³, Viviani Tadioto³, Anderson Giehl³, Angela Alves dos Santos², Boris Ugarte Stambuk^{1,2}, Sérgio Luiz Alves Jr^{1,3}

(lurphete@gmail.com)

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

² Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

³ Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó/SC.

Embora o etanol se apresente como alternativa aos combustíveis fósseis, com o potencial de reduzir a emissão de gases do efeito estufa e o aquecimento global, a produção do biocombustível pode competir por espaços agrícolas com a produção de alimentos. Em contrapartida, tem-se hoje a possibilidade da produção de etanol de segunda geração (etanol 2G), produzido a partir de resíduos lignocelulósicos, que contêm glicose e xilose como principais componentes. No entanto, apesar de as leveduras brasileiras de usinas sucroalcooleiras fermentarem facilmente a glicose, a xilose não é metabolizada pelas células microbianas. Por essa razão, no presente trabalho, foram isoladas 46 linhagens de leveduras do intestino de lagartas herbívoras da espécie *Spodoptera frugiperda*, uma praga agrícola. Inicialmente, os isolados foram testados, em aerobiose plena, quanto a capacidade de consumo de glicose e xilose. Dentre essas 46 leveduras, 14 foram capazes de consumir mais de 90% desses açúcares em meio sintético mínimo, a 30°C, no intervalo de 48 h. Subsequentemente, essas linhagens de melhor desempenho foram submetidas a cultivos em microescala (100 µL) e microaerobiose, por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR), para avaliar os efeitos do estresse osmótico (sob diferentes concentrações de glicose e xilose) e do pH do meio na velocidade específica de crescimento e na produtividade de biomassa celular. Quatro leveduras se destacaram, dentre as demais, quanto às respostas analisadas. As células apresentaram dificuldade em metabolizar as fontes de carbono somente nos extremos de pH e concentração de açúcares. As análises das superfícies de resposta dessas cepas demonstram a sua preferência por valores médios de pH (~6,0) e açúcares (~50 g/L). Nessas condições os monossacarídeos testados foram consumidos em sua totalidade (> 95%) durante 30 h de cultivo. Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico da prospecção de leveduras no intestino de lagartas *S. frugiperda*, especialmente considerando o contexto de biorrefinarias de segunda geração, que utilizam resíduos lignocelulósicos como matéria-prima.

Palavras-chave: resíduos lignocelulósicos, leveduras selvagens, crescimento celular, etanol 2G.

Agência de fomento: CAPES

APÊNDICE B – Artigo submetido para publicação no periódico Energy Nexus

Energy Nexus Ethanol and electricity: fueling or fooling the future? --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	NEXUS-D-23-00074
Full Title:	Ethanol and electricity: fueling or fooling the future?
Article Type:	VSI:Impacts of Bioenergy
Keywords:	biomass; 2G biorefinery; carbon dioxide; electric car; fossil fuel; greenhouse gas.
Corresponding Author:	Sergio Luiz Alves Jr, Ph.D. Universidade Federal da Fronteira Sul Chapecó, SC BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal da Fronteira Sul
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Anderson Giehl
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Anderson Giehl Natalia Klanovicz Aline Frumi Camargo Maria Luiza Rodrigues Albarello Helen Treichel Sergio Luiz Alves Jr, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The vast majority of countries arguably agree that the planet is reaching a point of no return. Proof of that is the 2030 Agenda and the Paris Agreement, ratified by almost every nation worldwide. However, despite signing both great commitments, the states have made too little to meet the sustainability plans. Among the targets, renewable energy sources stand out to mitigate greenhouse gas emissions, but still, petrol wells continue to be drilled, and vehicle assemblers keep investing in new technologies for running their cars with fossil fuels. At the same time, government policies seem to be betting all their chips on electric engines, as if electricity were the best substitute for oil. This critical review analyses the pros and cons of such alternative fuel, also taking into account another potential substitute for gasoline: bioethanol. In the following pages, we address the challenges and avenues of both alternatives and demonstrate that diversification of the global energy matrix and the biomass feedstocks should be our guiding principles.
Suggested Reviewers:	Sarita Cândida Rabelo, Ph.D. São Paulo State University sarita.rabelo@unesp.br Jaciane Lutz Ienczak Federal University of Santa Catarina jaciane.ienczak@ufsc.br
Additional Information:	
Question	Response
To complete your submission you must select a statement which best reflects the	No data was used for the research described in the article.