



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS - PPGCTRA



PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE  
XILOSE DO INTESTINO DE BESOUROS (INSECTA:  
COLEOPTERA) DE ÁREAS DE FLORESTA AMAZÔNICA EM  
ITACOATIARA - AM

GISELE DE FÁTIMA LEITE SOUZA

ITACOATIARA- AM

2017

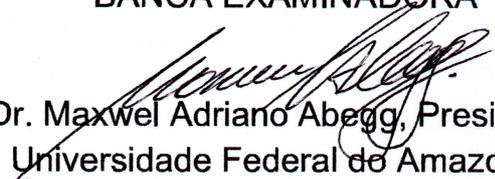
# GISELE DE FÁTIMA LEITE SOUZA

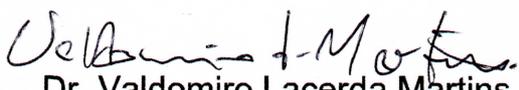
Prospecção de leveduras fermentadoras de xilose do intestino de besouros (Insecta; Coleoptera) de áreas de Floresta Amazônica em Itacoatiara-AM.

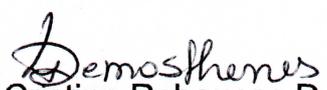
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovada em 06 de julho de 2017.

## BANCA EXAMINADORA

  
Dr. Maxwell Adriano Abegg, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

  
Dr. Valdomiro Lacerda Martins  
Universidade Federal do Amazonas

  
Dra. Liane Cristine Rebouças Demosthenes  
Universidade Federal do Amazonas

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729p Souza, Gisele de Fátima Leite  
Prospecção de leveduras fermentadoras de xilose do intestino de besouros (Insecta: Coleoptera) de áreas de floresta Amazônica em Itacoatiara - AM / Gisele de Fátima Leite Souza. 2017  
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. Maxwell Adriano Abegg  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. bioetanol. 2. xilose. 3. besouros. 4. *Popilius marginatus*. I.  
Abegg, Dr. Maxwell Adriano II. Universidade Federal do Amazonas  
III. Título

Ao meu esposo e filhos pelo  
incentivo e compreensão para  
realização deste trabalho.  
DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Maxwel Adriano Abegg, pela orientação, motivação, amizade e compreensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Projeto Universal 2014) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES por me proporcionar bolsa de estudos durante o desenvolvimento do mestrado.

Ao professor Dr. Érico pela amizade, apoio, por estar disposto a auxiliar com as coletas dos besouros e por ter presidido minha banca de qualificação com suas sugestões para aprimoramento deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos ao Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca (INPA) por sua orientação sobre a coleta dos insetos, identificação e preservação dos espécimes.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan e ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela assistência na identificação molecular.

Ao professor Dr. Luciano Gomes Fietto e ao Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela assistência nos ensaios de fermentação, em especial a Valquíria Júnia Campos por me acompanhar todo o tempo em que estive em Viçosa.

Ao meu querido esposo, companheiro e amigo Leandro, pelo incentivo, apoio e compreensão durante todos estes anos.

Aos meus amores Alice e Raul, por alegrarem meus dias e por compreenderem minhas viagens.

Aos meus pais pelo dom da vida, apoio e por ajudarem com as crianças quando precisei me ausentar.

À minha sogra Delicia, pelo apoio e também por cuidar dos meus filhos nos momentos que precisei viajar.

As meninas, Ândria, Samila, Kibelle e Marianne pela amizade e por estarem sempre comigo no laboratório me ajudando nas coletas, nos ensaios e me fazendo rir (e como eu ria com essas meninas...).

À Luana T. C. N. Valentim por estar dispostas a ajudar nas coletas e nos experimentos durante o início do meu projeto e por sua amizade.

Aos meus amigos Mayka, Rodrigo Bísaro, Margarida e Kleber pela amizade, incentivo e por me acolherem em sua casa nos momentos que precisei, para dar continuidade ao meu mestrado (e olha não foram poucos dias).

À Isabel que também me acolheu quando precisei ficar em Viçosa para realizar os testes de fermentação, me dando apoio e incentivo.

Aos amigos Nádia e Vavá (Vanderlei), pela amizade, apoio e pelo acolhimento em Florianópolis, durante o Congresso de Micologia.

Aos amigos e professores do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET-UFAM) e do programa PPGCTRA pelo apoio, incentivo e por compartilharem comigo seus conhecimentos.

A todos o meu muito obrigado!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

## RESUMO

Os besouros da família Passalidae vivem e se alimentam de madeira em decomposição e seus intestinos são ricamente colonizados por leveduras. O objetivo desta pesquisa foi prospectar leveduras xilolíticas com potencial para a produção de bioetanol de segunda geração. Assim, 83 exemplares de besouros pertencentes às famílias Passalidae e Scarabaeidae foram coletados na floresta amazônica em Itacoatiara - AM, Brasil. As diferenças morfológicas dos besouros foram identificadas e 25 espécimes escolhidos foram dissecados. Foram isoladas leveduras de galerias habitadas por besouros e do intestino dos insetos. Os isolados foram previamente selecionados através de testes de tolerância a temperatura, etanol e capacidade de assimilação de xilose. Na sequência, esses isolados foram submetidos a um painel de condições relacionadas à produção de etanol. A produção de etanol atingiu  $24,70 \text{ g.L}^{-1}$  e a produção de xilitol atingiu  $21,66 \text{ g.L}^{-1}$ . Um dos isolados com perfil promissor foi identificado como *Spathaspora roraimanensis* e seis como *Spathaspora passalidarum*. Três isolados mostraram-se mais promissores e, curiosamente, todos estes foram isolados do intestino da espécie *Popilius marginatus* (Percheron, 1835). No teste em placas, no entanto, os isolados obtidos de galerias mostraram uma maior capacidade de assimilação de xilose. Conforme relatado neste campo de estudo, nenhum isolado tolerou todas as condições testadas. Isolados selvagens com este perfil podem ser usados para testar produção de etanol em grande escala, engenharia genética ou técnicas evolutivas.

**Palavras chave:** bioetanol, xilose, besouros, *Popilius marginatus*.

## ABSTRACT

Beetles of the Passalidae family live and feed on decaying wood and their guts are richly colonized by yeasts. The goal of this research was to prospect xylolytic yeasts with potential for the production of second-generation bioethanol. Therefore, 83 specimens of beetles belonging to the Passalidae and the Scarabaeidae families were collected in the Amazonian rainforest in Itacoatiara - AM, Brazil. Morphological differences of the beetles were identified and 25 chosen specimens were dissected. Yeasts from galleries inhabited by beetles and from insect guts were isolated. Isolates were previously selected through tolerance tests for temperature, ethanol and xylose assimilation capacity. Subsequently, these isolates were then submitted to a panel of conditions related to ethanol production. The ethanol production reached 24.70 g.L<sup>-1</sup> and the xylitol production reached 21.66 g.L<sup>-1</sup>. One of the isolates with a promising profile was identified as *Spathaspora roraimanensis* and six as *Spathaspora passalidarum*. Three isolates showed to be more promising and, curiously, all came from the gut of the species *Popilius marginatus* (Percheron, 1835). In plate testing, however, the isolates obtained from galleries showed a greater capacity to assimilate xylose. As reported in this field of study, no isolate tolerated all conditions tested. Wild isolates with this profile may be used for testing larger-scale ethanol production, genetic engineering, or evolutionary techniques.

**Key words:** beetles, bioethanol, *Popilius marginatus*, xylose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias metabólicas da xilose: A via fúngica utiliza a xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), enquanto que a via bacteriana utiliza xilose isomerase (XI). Ambos os caminhos produzem D-xilulose que é convertida em D-xilulose-5P por xiluloquinase endógena (XK). D-xilulose-5P entra então na via Pentose Fosfato (PPP), sendo metabolizado para formar etanol sob condições apropriadas. As setas indicam a direção das reações químicas.....	22
Figura 2 – Composição da biomassa; demonstrando os compostos inibitórios comuns em materiais pré-tratados com lignocelulose, indicando fontes de formação .....	25
Figura 3 – Ponto de coleta Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010 - Itacoatiara - AM .....	28
Figura 4 – Ponto de coleta Ramal da comunidade Sol Nascente - Itacoatiara – AM	29
Figura 5 – Coleta de besouros em madeira em decomposição .....	30
Figura 6 – Besouro com élitros e asas internas suspensas para a remoção do intestino grosso .....	31
Figura 7 – Remoção do intestino grosso .....	32
Figura 8 – Termociclador com as programações de temperatura e números de ciclos .....	35
Figura 9 – G14-2.2 - <i>Spathaspora passalidarum</i> após 70h de fermentação .....	36
Figura 10 – Diferença entre a dimensão das colônias (considerando a média de duas medidas perpendiculares do maior diâmetro) de leveduras isoladas do conteúdo intestinal de besouros em comparação com leveduras isoladas de galerias habitadas (teste ** t; p <0,001), quando cultivadas em ágar à base de nitrogênio com 1% de D-xilose como única fonte de carbono .....	41
Figura 11 – Resultado do teste de tolerância frente ao etanol 15% (16 isolados selecionados – A e B) .....	42

Figura 12 – Categorização do crescimento observado nas placas.....	42
Figura 13 - Resultado representativo do teste de tolerância frente ao peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); A – P19-1.1 demonstrando o halo de inibição; B – P22-2.19 não houve inibição; C – P8-2.12 demonstrando o halo de inibição .....	43
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 0,5% da amplificação da região rDNA utilizando os ITS1 e ITS4 dos dezesseis isolados .....	45
Figura 15 – Cinética de fermentação em 4% de xilose em 30°C por; (A) P16-1.1 pico de produção de etanol - 18,04 g.L <sup>-1</sup> ; (B) G13-2.1 pico de produção de etanol - 18,85 g.L <sup>-1</sup> ; (C) G13-3.8 pico de produção de etanol - 18,40 g.L <sup>-1</sup> ; (D) G14-1.8 pico de produção de etanol - 18,68 g.L <sup>-1</sup> ; (E) G14-2.2 pico de produção de etanol - 17,85 g.L <sup>-1</sup> e (F) G18-3.7 pico de produção de etanol - 17,92 g.L <sup>-1</sup> .....	49
Figura 16 - Curvas de crescimento dos produtores de etanol obtidas com base na medição da D.O 600nm (Densidade óptica) da suspensão celular ao longo do tempo. A – Suplementação com 4% de xilose; B – Suplementação com 10% de xilose.....	51
Figura 17 - Curvas de crescimento dos produtores de xilitol obtidas com base na medição da D.O 600nm (Densidade óptica) da suspensão celular ao longo do tempo; A – Suplementação com 4% de xilose; B – Suplementação com 10% de xilose.....	52
Figura 18 – Curvas de crescimento dos isolados que não foram capazes de produzir etanol/xilitol obtidas com base na medição da D.O 600nm (Densidade óptica) da suspensão celular ao longo do tempo; A – Suplementação com 4% de xilose; B – Suplementação com 10% de xilose .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das espécies de besouros coletados .....	40
Tabela 2 - Resultados dos testes de tolerância com dezesseis isolados pré-selecionados frente a etanol 15% .....	46
Tabela 3 – Identificação molecular dos isolados de leveduras por sequenciamento do rDNA .....	47
Tabela 4 – Parâmetros fermentativos: Comparação entre fermentação em meio com xilose 4% e cofermentação em meio com xilose 4% e glicose 2% .....	50

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Associação entre leveduras e besouros .....	18
2.2. Metabolismo da xilose por leveduras .....	20
2.3. Leveduras e bioetanol.....	22
2.4. Xilitol.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
Objetivo geral: .....	27
Objetivos específicos:.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1. Coleta de besouros e deposição de espécimes em coleção de artrópodes .....	28
4.2. Isolamento de leveduras do trato intestinal de besouros .....	30
4.3. Determinação da habilidade dos isolados de leveduras obtidos de assimilarem xilose .....	32
4.4. Testes de tolerância .....	32
4.5. Identificação molecular dos isolados selecionados.....	33
4.6. Ensaio de fermentação e cofermentação em pequena escala.....	35
4.7. Parâmetros fermentativos .....	36
4.8. Ensaio de fermentação em microplaca.....	38
5. RESULTADOS.....	40

5.1. Habilidade dos isolados de leveduras em assimilar xilose .....	40
5.2. Identificação molecular dos isolados selecionados .....	44
5.3. Ensaios de fermentação em pequena escala .....	48
6. DISCUSSÃO .....	54
7. CONCLUSÃO .....	61
REFERÊNCIAS .....	62
ANEXOS .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis provenientes de recursos renováveis estão se tornando cada vez mais importantes em tempos de crescente preocupação ambiental. No caso específico da produção de bioetanol, tem-se buscado utilizar biomassa vegetal como matéria-prima (BRAT *et al*, 2009).

Usualmente a produção de bioetanol é um processo biológico no qual açúcares como a glicose, frutose e sacarose são convertidos em energia celular por fermentação microbiana e assim produzem etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos (TAO *et al*, 2011). Quando a produção ocorre a partir de açúcares facilmente acessíveis é referida como produção de primeira geração (1G), enquanto que, no caso de serem utilizados materiais lignocelulósicos, como resíduos agrícolas, materiais florestais e cultivos dedicados é denominada produção de segunda geração (2G) (JOELSSON *et al*, 2016). A produção de etanol 2G está sendo pesquisada pela indústria de biocombustíveis como um meio de aumentar a produção de etanol sem necessidade de expandir a área plantada (MAGIOLI *et al*, 2014).

*Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo preferido para a produção do etanol devido à sua capacidade de crescer em açúcares simples tais como dissacarídeos. No entanto, cepas selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de fermentar D-xilose, que é um dos principais constituintes de polissacarídeos da biomassa lignocelulósica e o segundo açúcar mais abundante na parede celular de plantas, sendo a biomassa lignocelulósica de interesse como substrato para produção de etanol, xilitol e outros produtos microbianos (CARVALHO *et al*, 2002; DORAN-PETERSON *et al*, 2008; HAHN-HÄGERDAL *et al*, 2006; JUNYAPATE *et al*, 2014).

Embora a hidrólise da biomassa vegetal seja importante para a produção de etanol 2G e produza misturas de açúcar ricas em glicose e xilose, os inibidores de fermentação são gerados pelo pré-tratamento químico. Esse processo é necessário para quebrar a hemicelulose e expor a celulose ao ataque enzimático. O ácido acético, o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF) são considerados componentes chave entre muitos inibidores que se formam durante o pré-tratamento. Segundo Slininger *et al* (2016), a fim de fazer avançar a indústria do etanol 2G, são necessárias pesquisas e procedimentos para permitir a evolução de cepas de leveduras capazes de sobreviver e funcionar eficientemente utilizando tanto a hexose como os açúcares de pentose na presença de tais compostos inibitórios. Assim, uma cepa industrial com elevado potencial metabólico para a fermentação de xilose e com boa tolerância a inibidores seria potencialmente útil para a produção industrial de bioetanol (LI, H. *et al*, 2015).

Diferentes abordagens em engenharia genética têm sido utilizadas para permitir a fermentação de D-xilose por cepas selvagens de *S. cerevisiae*, mas as taxas de crescimento e produtividade são significativamente menores neste açúcar em comparação com a glicose e, portanto, o processo não é industrialmente competitivo (BRAT *et al*, 2009; HAHN-HÄGERDAL *et al*, 2007). Com isso, há uma forte pressão para melhorar a viabilidade econômica da produção de etanol 2G, motivando assim pesquisadores a explorar alternativas além da espécie *Saccharomyces* convencional (RADECKA, 2015). Recentemente Slininger *et al* (2016) utilizaram uma cepa selvagem de *Pichia stipitis* (NRRL Y-7124) com promissora capacidade de fermentação de pentoses e relataram bons resultados empregando técnicas de evolução para a obtenção de variantes mais robustas.

Segundo Sena *et al* (2016), a descrição de novas espécies de leveduras e/ou informações de cepas de leveduras capazes de converter D-xilose em etanol e/ou xilitol são passos importantes no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas destes microrganismos. A espécie *Spathaspora passalidarum*, por exemplo, tem se revelado capaz de fermentar xilose com eficiência para a produção de etanol (HOU, 2012; LONG *et al*, 2012; NGUYEN *et al*, 2006).

A baixa eficiência na produção de bioetanol a partir de xilose é uma limitação, no entanto, a D-xilose pode ser convertida no poliol xilitol ( $C_5H_{12}O_5$ ), que é um produto químico importante e com valor mais elevado do que o etanol. O xilitol é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica como edulcorante (GUO *et al*, 2013; LI, Z. *et al*, 2013; SENA *et al*, 2016; ZHANG *et al*, 2016).

Leveduras fermentadoras de xilose são comumente encontradas no trato digestivo e/ou tubos de alimentação de muitos insetos xilófagos, sugerindo uma associação com a digestão da madeira (SUH *et al*, 2003, 2006). Neste contexto, a hipótese de que a biodiversidade quase inexplorada da floresta Amazônica perto de Itacoatiara - AM, no Brasil, poderia nos fornecer isolados de leveduras provenientes do trato intestinal de besouros e de suas galerias em troncos de árvores em decomposição com o potencial para a produção de etanol 2G.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Associação entre leveduras e besouros

Leveduras podem ser definidas como fungos cujo crescimento vegetativo resulte predominantemente de brotamento ou fissão e que não formem seus estados sexuais dentro ou sobre um corpo de frutificação (KURTZMAN & FELL, 1998). A maioria das leveduras pertencentes ao subfilo Saccharomycotina são de interesse industrial (STAJICH *et al*, 2009).

Segundo Urubschurov & Janczyk (2011), insetos inevitavelmente entram em contato com leveduras amplamente distribuídas em diversos habitats como solo, plantas, água doce e marinha, sendo confirmada pelo fato de que leveduras têm sido encontradas na superfície corporal e nas entranhas de insetos como: besouros, abelhas, moscas, cupins, mosquitos, entre outros, e suas larvas.

Leveduras isoladas do intestino de insetos têm levado à descoberta de um grande número de novas espécies (BERKOV *et al*, 2007; CALDERON & BERKOV, 2012; GRUNWALD *et al*, 2010; HOUSEKNECHT *et al*, 2011; RIVERA *et al*, 2009; SUH *et al*, 2003, 2006; SUH & BLACKWELL, 2005, 2006; URBINA *et al*, 2013).

Os besouros pertencem à ordem Coleoptera (Insecta, Artropoda, Metazoa), é uma das mais diversas dentro da classe Insecta, sendo composta por pelo menos 400.000 espécies descritas (LELEJ & STOROZHENKO, 2010). Os besouros passalídeos (Passalidae, Coleoptera) alimentam-se principalmente de madeira em decomposição e passam a maior parte de suas vidas dentro de troncos de árvores em decomposição (BOUCHER, 2005; REYES-CASTILLO, 1970). A família de besouros é composta por aproximadamente 960 espécies, e na mais recente reclassificação taxonômica da família, além de sua distribuição, características

morfológicas externas e biologia, a macro-morfologia do intestino é outro caráter proposto para distinguir as cinco subfamílias em Passalidae (FONSECA *et al*, 2011).

Segundo Boekhout (2005), quando o grupo de Meredith Blackwell resolveu investigar a diversidade de leveduras no intestino de besouros e outros insetos e encontraram um *hotspot* de diversidade de leveduras. Assim, conseguiram adicionar à lista de leveduras descritas ao longo dos últimos anos, em torno de 200 novas espécies, identificadas de uma variedade de besouros coletados no sudeste dos Estados Unidos e no Panamá. Este grupo está interessado na possibilidade de que leveduras isoladas do intestino de insetos possam produzir aminoácidos essenciais, vitaminas, enzimas para detoxificação, degradação e fermentação de fontes alimentares e mesmo da produção essencial de feromônios (BERKOV *et al*, 2007; NGUYEN *et al*, 2007).

As leveduras estão presentes em toda a maioria das fases da vida do besouro, sendo frequentemente isolados diretamente dos besouros, mas também podem ser encontradas em seu ambiente de galeria (DAVIS, 2015). Urbina *et al* (2013) amostraram as leveduras no intestino de besouros passalides na Guatemala obtendo 771 leveduras de 16 espécies. As leveduras obtidas apresentaram em sua vasta maioria capacidade de assimilar xilose, incluindo espécies não descritas dos clados *Phanomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella* e *Sugiyamaella*.

Cadete *et al* (2012a) isolaram 224 leveduras de amostras de madeira em decomposição de duas localidades na floresta Amazônica em Roraima nos municípios de Mucajaí e São João da Baliza, encontrando 33 espécies de leveduras (das quais sete não tinham sido previamente caracterizadas). Morais *et al* (2013), isolaram 321 leveduras, destas foram obtidas possíveis 15 novas espécies, sendo

que duas espécies (*Sugiyamaella* sp. e *Sugiyamaella xylanicola*) tiveram capacidade de fermentar a D-xilose em etanol. Em um levantamento da diversidade de leveduras realizado entre 2009-2011 na Bulgária em duas localidades, cinco linhagens de uma nova espécie de levedura ascomiceta (novo gênero *Nematodospora*) foram isoladas a partir do intestino do besouro *Valgus hemipterus* (Cetoniinae) (GOULIAMOVA *et al*, 2015). Estas informações parecem demonstrar a importância de amostrar leveduras de fontes das mais diversas, reafirmando que o intestino de besouros e seu ambiente de galeria são um *hotspot* de novas espécies.

## 2.2. Metabolismo da xilose por leveduras

Para a conversão de açúcares de pentose em etanol, encontram-se disponíveis muitas pesquisas que auxiliam no processo em escala laboratorial, mas há indisponibilidade de microrganismos robustos que suportem os inibidores de fermentação para produzir etanol com altos rendimentos e produtividades (CHANDEL *et al*, 2011). A conversão de xilose em etanol por levedura é um gargalo importante na produção de biocombustíveis lignocelulósicos. Assim, a fermentação eficiente e rápida de xilose é necessária para uma produção econômica de biocombustíveis (HAHN-HAGERDAL *et al*, 2007; KIM *et al*, 2013; SATO *et al*, 2016).

A xilose (açúcar de pentose) é um importante componente da hemicelulose. Na natureza, a xilose pode ser utilizada por várias espécies de leveduras e bactérias que são encontradas associadas direta ou indiretamente com a lignocelulose (KRICKA *et al*, 2014).

Foram identificadas duas vias principais de utilização de xilose (Figura 1). Nos fungos e leveduras fermentadoras de xilose, a utilização de xilose envolve a ação de duas oxidoredutases; xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), cada uma

exigindo os cofatores NADPH e NAD<sup>+</sup>, respectivamente, nas reações diretas. As bactérias utilizam uma via alternativa que requer apenas uma enzima a xilose isomerase (XI) para converter xilose diretamente em 5-xilulose. Em ambas as vias, a 5-xilulose é fosforilada pela xiluloquinase (XK) para 5P-xilulose, que pode entrar na via pentose fosfato (PPP), gerando assim intermediários da via glicolítica (KRICKA *et al*, 2014; MOYSÉS *et al*, 2016). Portanto, várias espécies de leveduras utilizam xilose, como *Spathaspora passalidarum*, que estão indiretamente associadas à lignocelulose, através de sua relação simbiótica com besouros de madeira como *Odontotaenius disjunctus* (HOU, 2012) ou baratas de madeira, como *Cryptocercus* sp. (URBINA *et al*, 2013). Embora tenha sido alcançado algum sucesso usando espécies fermentadoras naturais de xilose, sua relevância industrial ainda não foi demonstrada (KRICKA *et al*, 2014).

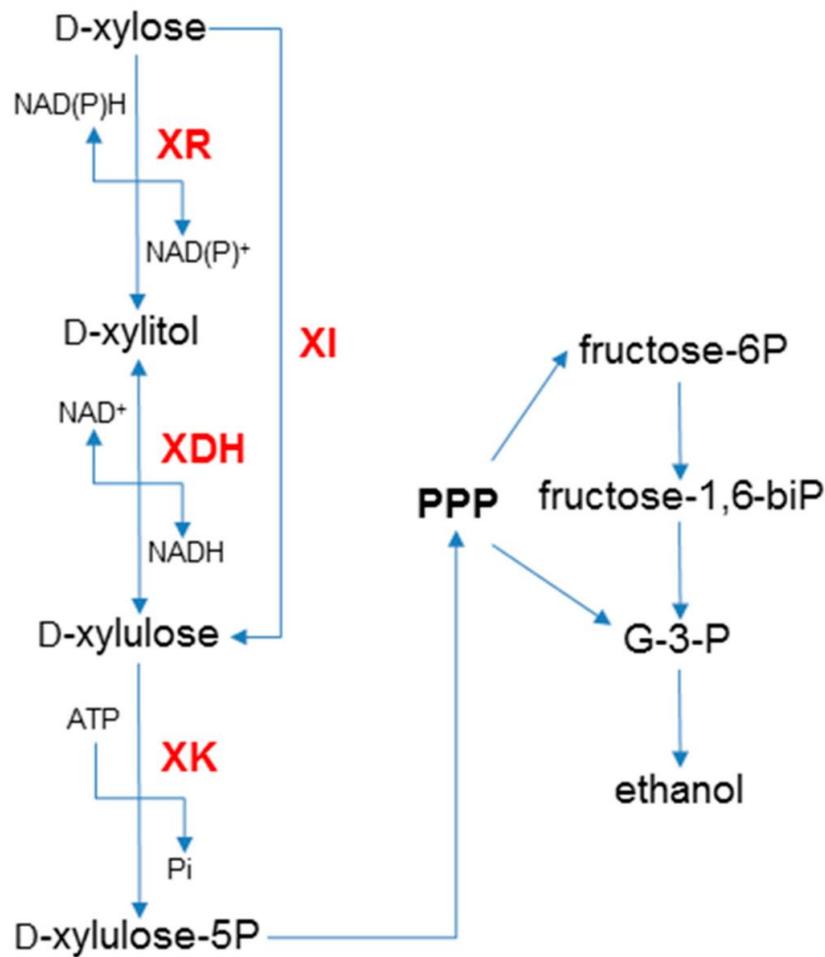


Figura 1 – Vias metabólicas da xilose: A via fúngica utiliza a xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), enquanto que a via bacteriana utiliza xilose isomerase (XI). Ambos os caminhos produzem D-xilulose que é convertida em D-xilulose-5P por xiluloquinase endógena (XK). D-xilulose-5P entra então na via Pentose Fosfato (PPP), sendo metabolizado para formar etanol sob condições apropriadas. As setas indicam a direção das reações químicas

FONTE – MOYSÉS *et al*, 2016

### 2.3. Leveduras e bioetanol

As leveduras são os microrganismos mais adequados para a produção de etanol. Sendo muito utilizado em pesquisas de bioetanol desde o início das biorefinarias. Por serem capazes de crescer em uma variedade de açúcares com alta tolerância ao substrato e etanol (CHANDEL *et al*, 2011). Portanto, cepas microbianas eficientes fermentadoras de xilose são essenciais para o

desenvolvimento de processos de bioconversão economicamente viáveis usando as biomassas renováveis (KWAK & JIN, 2017).

Os biocombustíveis, como o bioetanol, representam uma das potenciais fontes renováveis de energia que podem substituir combustíveis fósseis como a gasolina que são particularmente utilizados no setor de transporte (TYE *et al*, 2016). O bioetanol, é um biocombustível líquido renovável e ambientalmente amigável, pode ser produzido a partir de várias matérias-primas de biomassa diferentes, como: culturas de açúcar ou amido (como cana-de-açúcar, beterraba, milho e trigo) e de biomassa lignocelulósica (JOHN *et al*, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol ficando atrás dos Estados Unidos, que produz principalmente milho-etanol, e os dois países são responsáveis por quase 90% da produção mundial de bioetanol (MARIN *et al*, 2016). Atualmente a pesquisa e o desenvolvimento, têm sido focados na utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol sem causar uma disputa entre o fornecimento de alimentos e combustível (TYE *et al*, 2016).

O termo "lignocelulósico" vem da celulose que está ligada à lignina na parede celular da planta, e a "biomassa" é mais frequentemente referida para plantas e não para animais. Assim, a combinação de "biomassa lignocelulósica" denota recursos madeireiros e não-madeireiros, que incluem culturas não alimentares e dos resíduos que sobraram de outras culturas (TYE *et al*, 2016).

A fermentação direta de matérias-primas ou de biomassa contendo açúcar é o método menos complexo para a produção de bioetanol. Embora o custo da preparação de bioetanol a partir de açúcares seja baixo, o custo das matérias-primas é consideravelmente elevado (JOHN *et al*, 2011). A produção industrial de etanol a partir de substratos celulósicos necessita de altas quantidades de enzimas, para

produzir açúcares fermentáveis (CASA-VILLEGAS *et al*, 2016). A xilose é o segundo componente de açúcar mais abundante da lignocelulose, o aumento da produção de etanol pela xilose é um tópico interessante para a investigação (YU *et al*, 2017).

O processo de bioetanol lignocelulósico impede que ele seja prevalente no mercado, devido à necessidade de um processo de produção econômico, pois o bioetanol produzido a partir de lignocelulose necessita de pelo menos três etapas: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação (HOU & YAO, 2012). Com isso, durante o processo de pré-tratamento estão presentes no hidrolisado lignocelulósico inibidores, tais como: ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico); derivados de furano (furfural e 5-hidroximetil furfural); e compostos fenólicos (vanilina, siringaldeído, ácido *p*-coumarico, ácido ferúlico, 4-hidroxibenzaldeído) que podem inibir o crescimento microbiano e causar a redução do rendimento e produtividade do etanol (Figura 2) (FILLAT *et al*, 2017; GAO *et al*, 2017).

O pré-tratamento aumenta a acessibilidade da lignocelulose às enzimas hidrolíticas, removendo ou modificando polímeros de lignina e hemicelulose e alterando a estrutura de celulose. A hidrólise ou sacarificação enzimática quebra os carboidratos em açúcares fermentáveis pela ação combinada de diferentes atividades enzimáticas. Finalmente, através de processos de fermentação, os microrganismos convertem açúcares em álcoois, ácidos orgânicos, alcenos, lipídios ou outros produtos químicos (FILLAT *et al*, 2017).

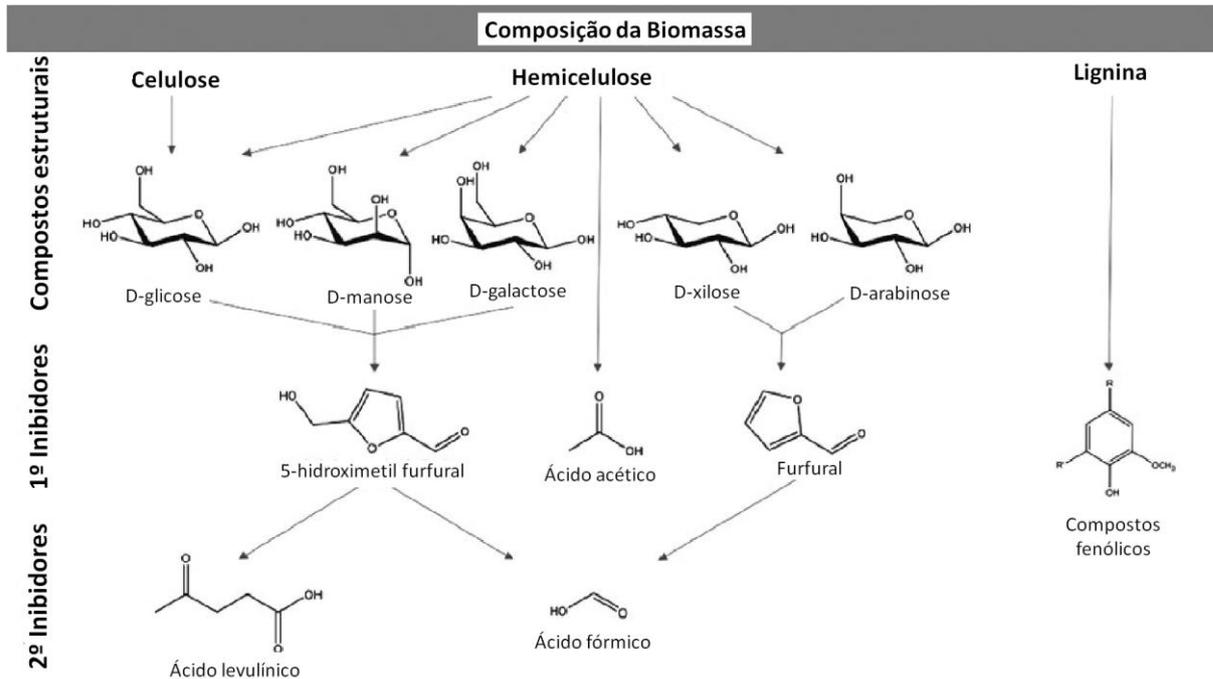


Figura 2 – Composição da biomassa; demonstrando os compostos inibitórios comuns em materiais pré-tratados com lignocelulose, indicando fontes de formação

FONTE – Adaptado de SANTOS *et al*, 2016

## 2.4. Xilitol

O xilitol é um álcool de açúcar de cinco carbonos, economicamente importante no mercado mundial de alimentos e saúde (PAL *et al*, 2016). Sendo utilizado como substituto do açúcar em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Embora o xilitol seja obtido por hidrogenação da D-xilose usando catalisadores químicos sob alta temperatura e pressão, a produção biotecnológica do xilitol oferece uma melhor alternativa no processo de produção do xilitol e do custo geral do processo (CORTEZ *et al*, 2016; RAO *et al*, 2016).

O consumo global de xilitol em 2013 foi de aproximadamente 160 mil toneladas, o que equivale a um valor de mercado de US\$ 670 milhões e poderão atingir 242 mil toneladas equivalentes a US\$ 1 bilhão em 2020 (RAO *et al*, 2016). A bioconversão de xilose para xilitol pode ser uma alternativa econômica, quando realizada por bactérias, fungos filamentosos, leveduras ou através de suas enzimas

purificadas, pois todas são capazes de reduzir a D-xilose ao xilitol como ocorre no primeiro passo no metabolismo de D-xilose (CADETE *et al*, 2016b; GUAMÁN-BURNEO *et al*, 2015)

Um dos maiores desafios na produção de xilitol por processos de biotecnologia é a disponibilidade de cepas capazes de produzir altos rendimentos deste poliol em um contexto industrial (CADETE *et al*, 2012b). Com isso, leveduras do gênero *Candida* podem converter xilose em xilitol (WANNAWILAI *et al*, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral:**

Prospectar cepas xilolíticas e avaliar preliminarmente seu potencial para a produção de bioetanol a partir do trato intestinal de besouros da família Passalidae e de seu habitat (galerias) em troncos de árvores, em áreas da floresta Amazônica em Itacoatiara-AM.

#### **Objetivos específicos:**

- Determinar o índice de crescimento das leveduras de interesse biotecnológico;
- Determinar a habilidade de utilização de xilose pelas leveduras isoladas;
- Testar cepas selecionadas, em escala laboratorial, para a produção de bioetanol.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta de besouros e deposição de espécimes em coleção de artrópodes

Besouros adultos (Passalidae) foram coletados em seus habitats naturais, devido a sua associação com madeira em decomposição. A coleta foi realizada em dois pontos na floresta Amazônica: no **C**ampus II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464') e no ramal da comunidade Sol Nascente (S03°01.045' W058°28.830'), ambos no município de Itacoatiara – AM (Figura 3 e 4).

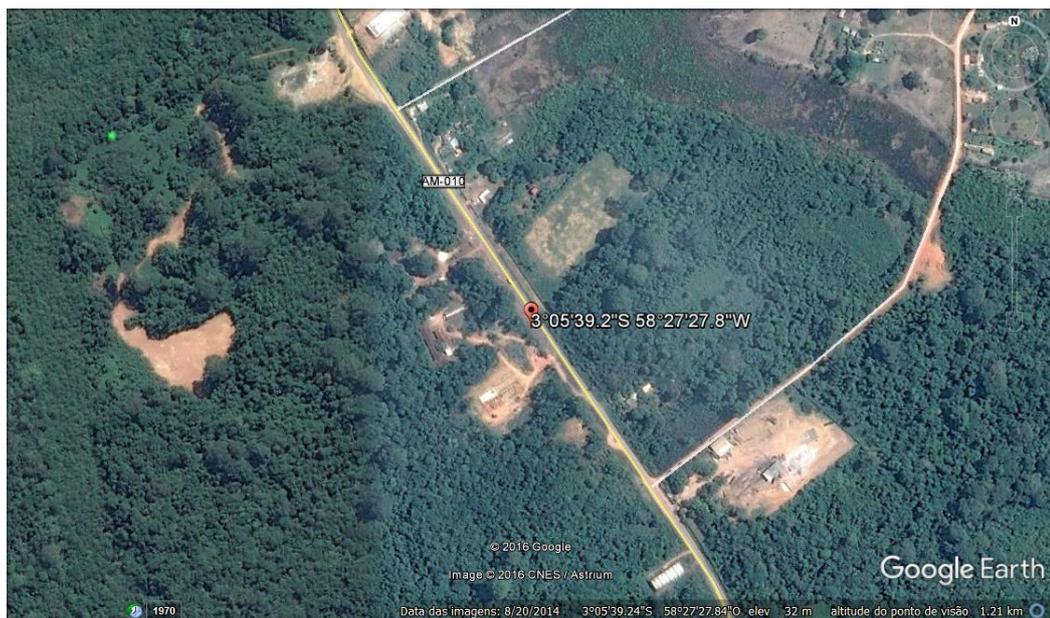


Figura 3 – Ponto de coleta Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010 - Itacoatiara - AM



Figura 4 – Ponto de coleta Ramal da comunidade Sol Nascente - Itacoatiara – AM

Os besouros foram coletados individualmente com o auxílio de pinças estéreis (Figura 5), em placas de Petri estéreis e trazidos o mais rapidamente possível ao laboratório de micologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Os insetos foram transportados vivos com fragmentos de cascas. A amostragem dos insetos é necessariamente destrutiva, de forma que espécimes testemunha foram coletados ao mesmo tempo em que os besouros que foram dissecados (SUH & BLACKWELL, 2004). Os exemplares de besouros foram identificados pelo entomologista Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca e espécimes testemunha foram depositados na coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).



Figura 5 – Coleta de besouros em madeira em decomposição

#### **4.2. Isolamento de leveduras do trato intestinal de besouros**

Os besouros foram mantidos em placas de Petri estéreis por 3 dias, sem alimentação, antes da eutanásia (em solução de KCl 0,56%) e da dissecação. Segundo Suh & Blackwell (2004), manter os espécimes sem alimento auxilia na eliminação de alguns organismos contaminantes que possam ser eventualmente isolados do intestino. Em seguida, os insetos foram submetidos à desinfecção superficial por submersão em etanol 70% (5 min), água sanitária (5 min) e água estéril (10 min) antes da remoção do intestino. Uma alíquota de água estéril (100  $\mu$ L) foi semeada em ágar extrato de levedura-malte-YM acidificado (composição/L: peptona 5g, extrato de levedura 3g, extrato de malte 3g, dextrose 10g, ágar 15g, água destilada 1000 mL, suplementado com cloranfenicol 0,1g; pH ajustado a 3,5 com ácido clorídrico), como controle negativo (SUH & BLACKWELL, 2004).

Os intestinos foram removidos assepticamente com auxílio de estereomicroscópio em cabine de segurança biológica (Figuras 6 e 7). Após a dissecação, o intestino grosso dos insetos foi cortado em três partes com bisturi

estéril e esmagados com auxílio de uma pinça em microtubos de 2 mL estéreis contendo 100  $\mu$ L de solução salina 0,9% e este macerado foi espalhado em ágar YM acidificado (modificado de RAVELLA *et al*, 2011). As culturas foram incubadas a 30°C por 5 dias. Depois disso, colônias individuais com morfologia leveduriforme foram retiradas e purificadas por ao menos 2 repiques sucessivos em ágar YM. De cada tipo morfológico foi calculada a raiz quadrada do total de colônias para obter o número de colônias a serem isoladas para posterior identificação. O armazenamento foi realizado em água destilada estéril (autoclavada 3 vezes) em temperatura ambiente e glicerol -20°C.



Figura 6 – Besouro com élitros e asas internas suspensas para a remoção do intestino grosso

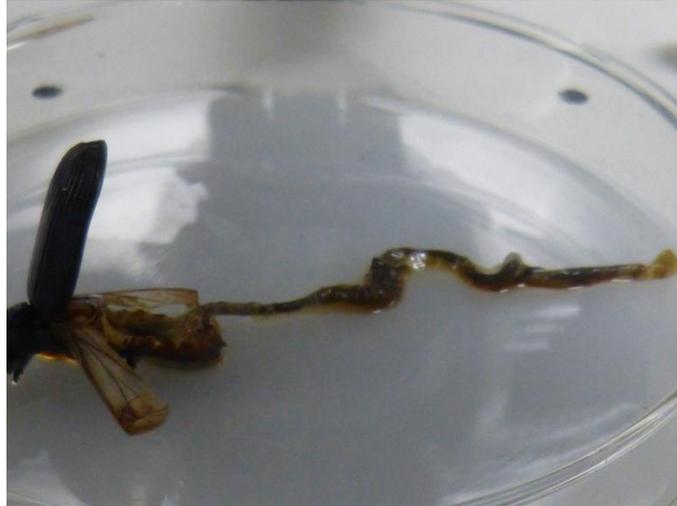


Figura 7 – Remoção do intestino grosso

### **4.3. Determinação da habilidade dos isolados de leveduras obtidos de assimilarem xilose**

Para determinar a habilidade de utilização da pentose xilose, os isolados foram semeados em meio base nitrogenada para leveduras (YNB) suplementada com 1% de D-xilose por picada em pontos e incubação a 30°C por 72 horas. Como controle positivo, as mesmas cepas foram inoculadas em YNB suplementado com 1% de glicose (TANAHASHI *et al*, 2010). Após o crescimento, com o auxílio de um paquímetro avaliamos a taxa de crescimento através de medição do diâmetro das colônias considerando um eixo horizontal e um vertical perpendicular, sendo então obtida a média aritmética das medições para cada isolado conforme Golinski *et al* (2008).

### **4.4. Testes de tolerância**

Os testes de tolerância demonstraram o desempenho do crescimento dos isolados de leveduras sob algumas condições típicas de estresse em fermentações para a produção de etanol 2G. As condições testadas foram respectivamente:

glicose (35 e 50%), estresses hiper-osmótico (suplementado com cloreto de potássio 10 e 16%), ácido acético (0,5 e 1%), temperaturas 42°C e 50°C, vanilina (6 e 8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), furfural (0,25; 0,5; 1,0 e 1,2g/L) e estresse oxidativo. Também foram testadas concentrações de celobiose 1% e arabinose 1% (ALI & KHAN 2014; LI, H. *et al*, 2015). Para tal, as cepas foram previamente cultivadas durante a noite em meio ágar YEPD (composição/L: extrato de levedura 10g, peptona 20g, dextrose 20g, e ágar 20g, água destilada 1000 mL) e lavadas duas vezes com água estéril. A densidade óptica foi ajustada ( $\text{OD}_{600}=1,0$ ) e realizada a diluição da suspensão ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e para o estresse oxidativo e temperatura (42 e 50°C) a densidade óptica foi ajustada em  $\text{OD}_{600}=2,0$ . Aplicou-se 4  $\mu\text{L}$  de cada suspensão diluída no meio sólido apropriado. À exceção do teste frente ao ácido acético, onde as placas permaneceram incubadas por 4 semanas a 30°C e frente à furfural, com incubação por 10 dias, os demais testes foram realizados com 48h de incubação a 30°C.

Para determinar a resistência ao estresse oxidativo as células foram misturadas com 20 mL de ágar YEPD (resfriado a aproximadamente 50°C) e imediatamente vertido em placa. Em seguida, colocou-se no centro de cada placa um papel de filtro estéril (0,5 mm de diâmetro) com 6  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30%, seguido de incubação por 2 dias a 30°C. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento (em mm) foram registrados com auxílio de paquímetro (LI, H. *et al*, 2015).

#### **4.5. Identificação molecular dos isolados selecionados**

O método molecular para a identificação das leveduras foi baseado na amplificação e análise de sequência do espaçador interno transcrito do rDNA (ITS) (CAGGIA *et al*, 2001). O processo de extração do rDNA foi realizado no

Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob supervisão da Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan. Antes da extração, as leveduras foram cultivadas em meio YEPD e incubadas por 24h a 30°C. Para a extração do DNA genômico, com o auxílio de uma ponteira de pipeta, uma colônia isolada foi ressuspensa em 1 mL de água estéril em microtubo que foi centrifugado por 1min a 10.000-12.000 rpm, sendo o sobrenadante removido. Foi então adicionado 100µL de InstaGene™ Matrix (sob agitação contínua) no *pellet* e incubado a 56°C por 30 min. A suspensão foi vigorosamente homogeneizada em *vortex* por 10 seg e os tubos incubados em banho-maria (100°C) por 8 min. Com nova agitação em *vortex* por 10 seg e centrifugado a 10.000-12.000 rpm por 3 min. Foi utilizado 2,5 µL do resultado do sobrenadante por 50 µL da reação PCR (Reação em cadeia da polimerase – em inglês *Polymerase Chain Reaction*). A amostra de DNA foi armazenada a -20°C, conforme da Silva *et al* (2012).

Os iniciadores usados para amplificar a região rDNA ITS foram ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de acordo com Kusari *et al* (2012). A reação de amplificação foi executada em 50µL (volume final) contendo 1 µL de cada iniciador, 25 µL TopTaq® Master Mix Kit (Qiagen), 21 µL de água miliQ e 2 µL DNA genômico (amostra) em termociclador. As condições do PCR foram: desnaturação inicial a 94°C durante 3 min; 35 ciclos a 94°C durante 30 seg, 53°C durante 30 seg e 72°C durante 1 min; extensão final a 72°C durante 10 min; depois mantida a 4°C (Figura 8). Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,5%. As regiões ITS foram sequenciadas pela Macrogen (Rockville, USA) e comparadas com as sequências reportadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (modificado CARVALHO *et al*, 2013).



Figura 8 – Termociclador com as programações de temperatura e números de ciclos

#### 4.6. Ensaios de fermentação e cofermentação em pequena escala

Os ensaios de fermentação foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob supervisão do prof. Dr. Luciano Gomes Fietto. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 125 mL em meio de cultivo contendo extrato de levedura ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ); peptona ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) e glicose e/ou xilose e incubados em shaker sob agitação a 120 rpm por 70h a  $28^\circ\text{C}$ . As cepas foram previamente cultivadas em meio YP com 2% de xilose, e incubados em shaker sob agitação de 120 rpm a  $28^\circ\text{C}$ . A partir do pré-inóculo, diluições foram realizadas utilizando espectrofotômetro de modo que a densidade óptica  $(\text{OD})_{600\text{nm}}$  inicial de todas as cepas fosse = 1.

Cada isolado foi inoculado em meio líquido de fermentação (4% xilose), obtendo um volume final de 50 mL. Os erlenmeyers foram incubados em agitador horizontal à 28°C por 70 horas e 120 rpm. Nos intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 horas (Figura 9). Aliquotas de 200 µL foram retiradas para avaliar a OD<sub>600nm</sub>, a viabilidade celular por meio de diluição seriada.

Uma alíquota de 800 µL foi centrifugada à 10.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi filtrado por membrana de 0,2 µm e posteriormente congelados para análise dos níveis de xilose, xilitol e etanol através de cromatografia líquida de alta performance (em inglês *high-performance liquid chromatography* – HPLC). Para os ensaios de cofermentação foi adicionada glicose (2%).

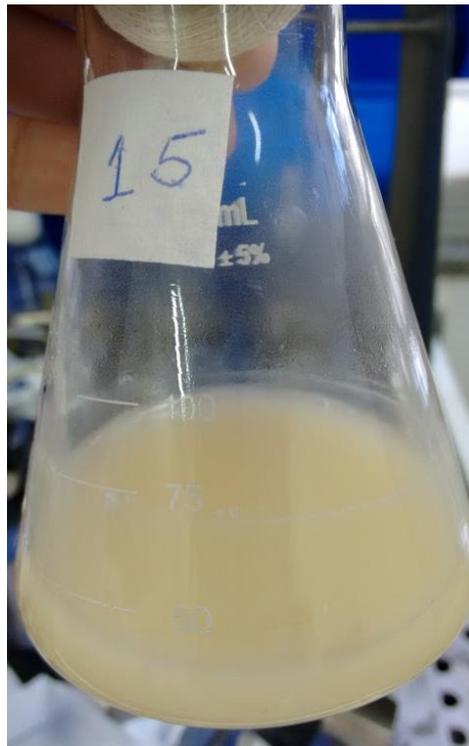


Figura 9 – G14-2.2 - *Spathaspora passalidarum* após 70h de fermentação

#### 4.7. Parâmetros fermentativos

Para a realização dos cálculos dos parâmetros fermentativos, foram utilizados os cromatogramas gerados após os ensaios de fermentação e cofermentação.

#### 4.7.1. Rendimento em etanol

O fator de rendimento da fermentação alcoólica foi calculado dividindo-se a diferença da massa final e inicial de etanol (g) pela massa inicial e final de açúcar (g) (CAMPOS, 2015, p.14) (Equação 1).

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Massa final} - \text{massa inicial de etanol}}{\text{Massa inicial} - \text{massa final de açúcar}} \quad (1)$$

#### 4.7.2. Eficiência de fermentação ( $\eta\%$ )

A eficiência de fermentação foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac, sendo calculada a razão entre o valor de  $Y_{P/S}$  encontrado ( $Y_{P/S}$  real) nos experimentos e o valor de  $Y_{P/S}$  teórico, multiplicado por 100 (CAMPOS, 2011, p.60) (Equação 2).

Onde:

$Y_{P/S}$  teórico = 0,511g etanol/ g xilose

$$\eta\% = \frac{Y_{\frac{P}{S}}^{(real)}}{Y_{\frac{P}{S}}^{(teórico)}} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.7.3. Produtividade

A produtividade em etanol [ $Q_p$  (g/L.h<sup>-1</sup>)] foi calculado dividindo-se a diferença da massa final e inicial de etanol pelo tempo em que houve a maior produção de massa de etanol (CAMPOS, 2015, p.14) (Equação 3).

$$Q_p = \frac{\text{Massa final} - \text{massa inicial de etanol}}{\text{Tempo}} \quad (3)$$

#### 4.7.4. Fator de rendimento em xilitol

O fator de rendimento em xilitol foi calculado pela relação entre a quantidade de xilitol produzido pela quantidade de xilose (SHARROUH, 2009, p.86) (Equação 4).

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Massa final} - \text{massa inicial de xilitol}}{\text{Massa inicial} - \text{massa final de açúcar}} = g/g \quad (4)$$

#### 4.7.5. Produtividade em xilitol

A produtividade em xilitol [ $Q_P$  (g/L.h<sup>-1</sup>)] foi determinada pela razão entre a quantidade de xilitol produzida pelo tempo em que houve a maior produção de massa de xilitol (SHARROUH, 2009, p.86) (Equação 5).

$$Q_p = \frac{\text{Massa final} - \text{massa inicial de xilitol}}{\text{Tempo}} \quad (5)$$

#### 4.7.6. Eficiência de conversão de xilose em xilitol ( $\eta\%$ )

A eficiência de conversão de xilose em xilitol foi calculada pela razão entre o fator de rendimento observado ( $Y_{P/S}$ ) pelo teórico determinado por Barbosa *et al* (1988 *apud* SHARROUH, 2009, p.86) (Equação 6).

Onde:

$Y_{P/S}$  teórico = 0,917g xilitol /g xilose.

$$\eta\% = \frac{Y_{\frac{P}{S}}^{(real)}}{Y_{\frac{P}{S}}^{(teórico)}} \times 100 \quad (6)$$

#### 4.7.7. Percentual de consumo de xilose ( $Y\%$ )

O percentual de consumo de xilose foi calculado pela relação entre a quantidade de xilose consumida pela quantidade inicial de xilose (SHARROUH, 2009, p.86) (Equação 7).

$$Y = \frac{\text{Massa inicial} - \text{massa final de xilose}}{\text{Massa inicial}} \times 100 \quad (7)$$

### 4.8. Ensaio de fermentação em microplaca

Os ensaios de fermentação em microplacas (390  $\mu$ L) de 96 poços foram realizados utilizando meio de cultivo conforme o descrito anteriormente nos ensaios de fermentação em pequena escala e incubados em leitor de microplacas por 60 horas a 30°C. Utilizou-se as cepas previamente cultivadas em meio YP com 2% de xilose, sob agitação a 120 rpm a 28°C (utilizadas para ensaio de fermentação). A

partir do pré-inóculo, diluições foram realizadas de modo que a densidade óptica  $(OD)_{600nm}$  inicial de todas as cepas fosse = 0,1. Cada isolado foi inoculado em meio líquido de fermentação (4% e 10% de xilose), obtendo um volume final de 300  $\mu$ L. O experimento foi realizado em triplicata.

O leitor de microplacas (leitor de Elisa) foi ajustado para realizar leituras a cada 30 minutos de incubação, sendo programada agitação prévia à leitura. A absorbância foi ajustada para 600nm. Ao término das 60 horas os resultados foram transcritos para a Microsoft Excel e para plotagem dos gráficos.

## 5. RESULTADOS

No presente trabalho foram coletados um total de 83 espécimes de besouros em dois pontos na floresta Amazônica. Após treinamento no laboratório de Entomologia (INPA) e considerando diferenças morfológicas tais como: coloração preta, formato da cabeça, aparelho bucal tipo mastigador; e pelo fato de que os insetos da família Passalidae encontrarem-se invariavelmente em galerias de troncos de madeira em decomposição. Vinte e quatro espécimes de besouros foram dissecados e identificados como pertencentes à família Passalidae e 1 à família Scarabaeidae (Tabela 1). A partir do conteúdo intestinal destes insetos e de suabes rotacionados no interior das galerias de troncos habitados pelos mesmos, foram obtidos, respectivamente, 380 e 412 isolados sugestivos de leveduras, totalizando 792 isolados. Os isolados obtidos foram então submetidos a testes de triagem para a verificação de seu potencial para a produção de etanol 2G.

Família	Gênero	Espécie	Número de espécimes
Passalidae	Passalus	<i>Passalus latifrons</i> (Percheron, 1841)	11
Passalidae	Passalus	<i>Passalus interruptus</i> (Lin, 1758)	4
Passalidae	Veturius	<i>Veturius platyrhinus</i> (Westwood, 1845)	1
Passalidae	Popilius	<i>Popilius marginatus</i> (Percheron, 1835)	5
Passalidae	Passalus	<i>Passalus punctiger</i> (Lep & Serv. 1825)	1
Passalidae	Passalus	<i>Passalus convexus</i> (Dalman, 1817)	1
Passalidae	Veturius	<i>Veturius transversus</i> (Dalman, 1837)	1
Scarabaeidae	Cetoniinae sp	Espécie não identificada	1

Tabela 1 – Identificação das espécies de besouros coletados

### 5.1. Habilidade dos isolados de leveduras em assimilar xilose

Os 792 isolados obtidos foram inicialmente submetidos a teste de verificação de capacidade de assimilação de xilose. Somente doze isolados, todos provenientes de conteúdo intestinal dos insetos, não apresentaram crescimento no meio contendo xilose como única fonte de carbono. Considerando o tamanho das colônias, os

isolados obtidos a partir de galerias apresentaram maior capacidade xilolítica em comparação aos isolados obtidos dos intestinos dos besouros (teste  $t$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 10).

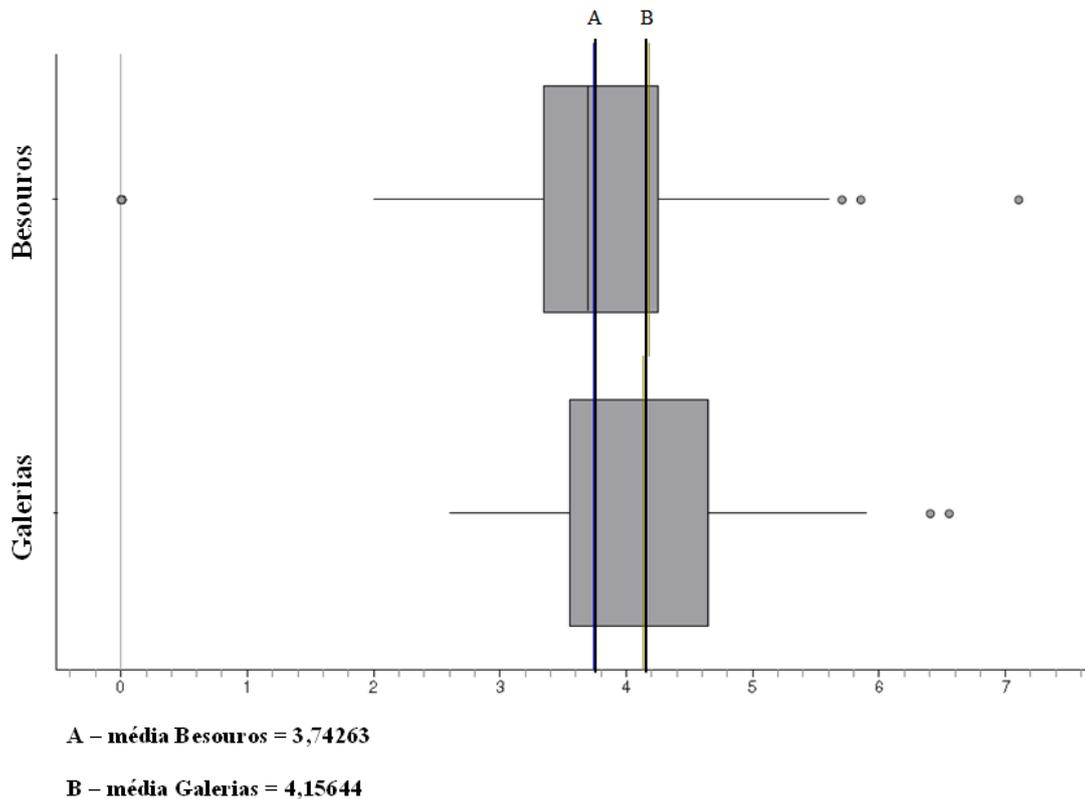


Figura 10 – Diferença entre a dimensão das colônias (considerando a média de duas medidas perpendiculares do maior diâmetro) de leveduras isoladas do conteúdo intestinal de besouros em comparação com leveduras isoladas de galerias habitadas (teste \*\*  $t$ ;  $p < 0,001$ ), quando cultivadas em ágar à base de nitrogênio com 1% de D-xilose como única fonte de carbono

As 780 cepas que assimilaram xilose foram submetidas a teste de tolerância à temperatura de 42°C por 48h. Nesta condição, 73 isolados manifestaram crescimento. Estes 73 isolados foram então testados frente à etanol 15% (Figura 11 A e B). Dezesesseis cepas manifestaram crescimento após 48h de incubação a 30°C.

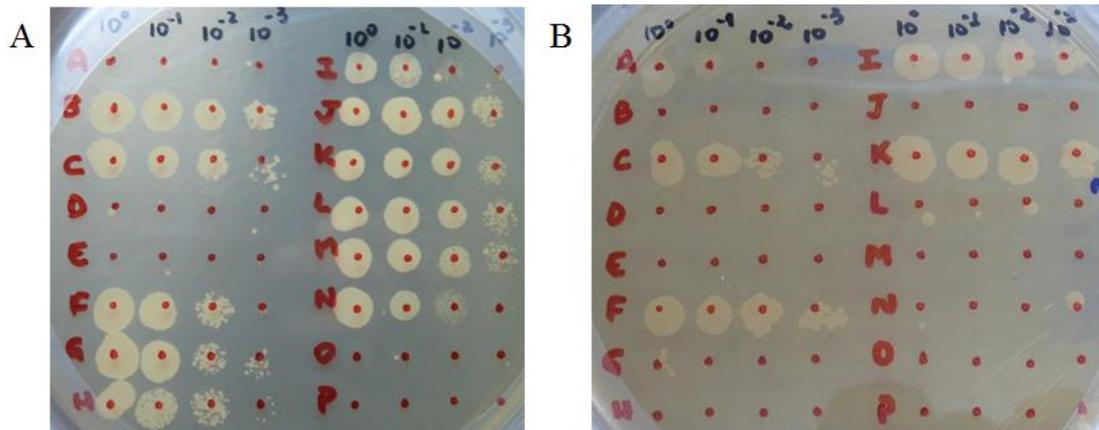


Figura 11 – Resultado do teste de tolerância frente ao etanol 15% (16 isolados selecionados – A e B)

As 16 cepas selecionadas foram posteriormente submetidas a testes de tolerância para avaliar o desempenho do crescimento sob condições típicas de estresse em fermentações de produção de etanol. O crescimento na placa contendo 1% de ácido acético não foi observado. O isolado G7-1.4 mostrou crescimento na placa contendo ácido acético a 0,5% após 22 dias de incubação. Observamos crescimento nas placas com suplementação de furfural  $0,25\text{g.L}^{-1}$ . Os isolados foram categorizados de acordo com o crescimento observado nas placas como: ausência de crescimento (-), crescimento leve (+), crescimento moderado (++) e crescimento intenso (+++) (Figura 12 e Tabela 2).

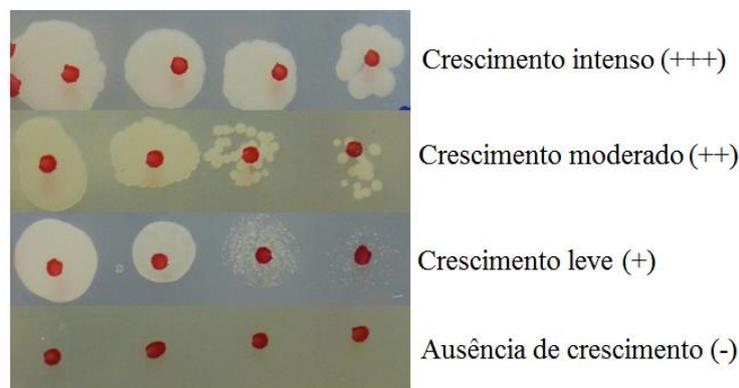


Figura 12 – Categorização do crescimento observado nas placas

O grau de resistência ao estresse oxidativo foi demonstrado pelo diâmetro do halo de inibição (mm). O experimento foi realizado em triplicata e expresso como a média do diâmetro do halo. Quatro isolados (P22-1.2, P22-1.3, P22-2.19 e P22-2.20) não foram inibidos pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na condição testada (Figura 13 A, B, C, D, E e F). Nas condições aqui utilizadas, dos 16 isolados pré-selecionados e testados frente à este painel, três: P16-1.1; P21-1.7 e P21-2.1, apresentaram-se com tolerância superior (Tabela 2).

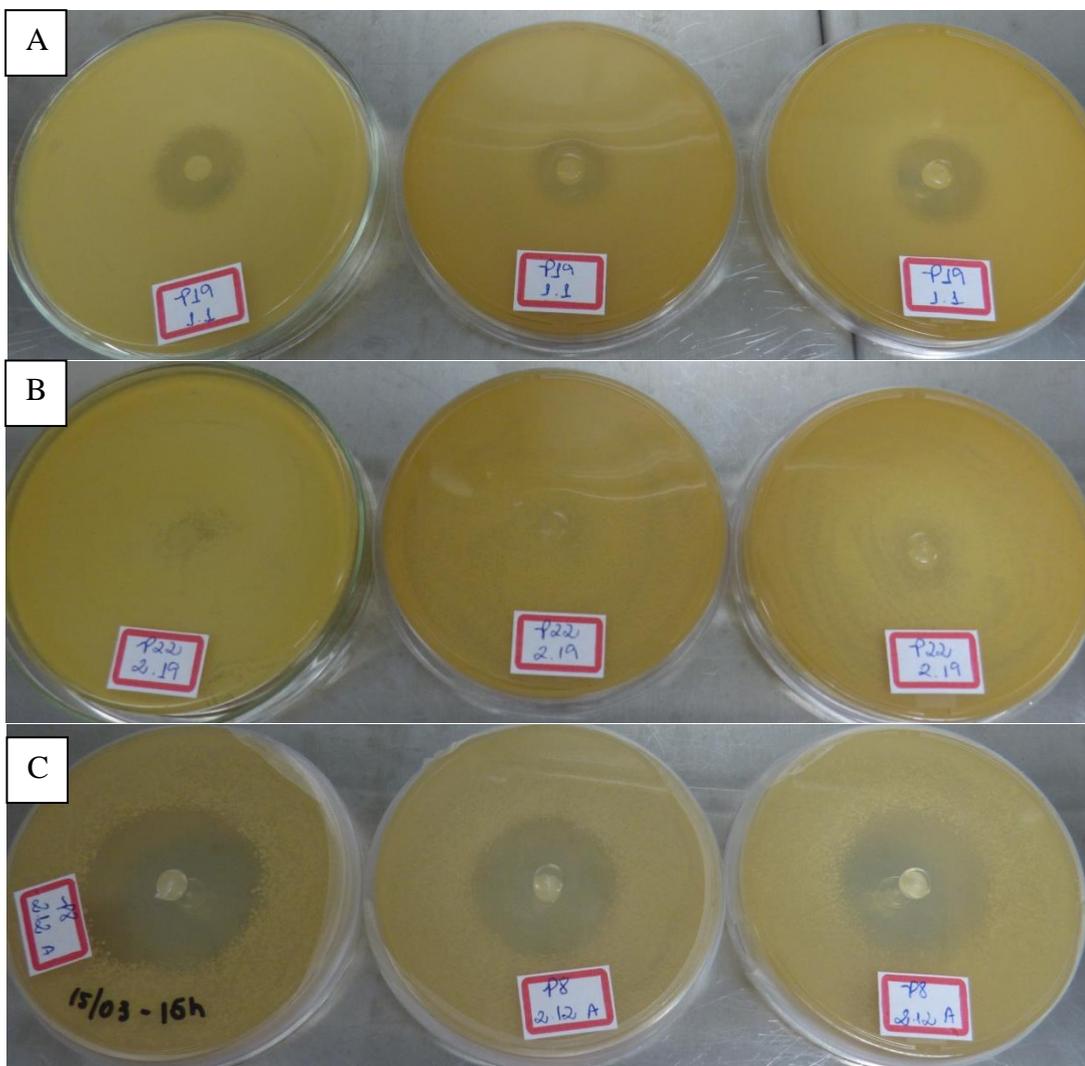


Figura 13 - Resultado representativo do teste de tolerância frente ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); A – P19-1.1 demonstrando o halo de inibição; B – P22-2.19 não houve inibição; C – P8-2.12 demonstrando o halo de inibição

## 5.2. Identificação molecular dos isolados selecionados

Considerando os resultados obtidos nos testes de capacidade de assimilação de xilose, tolerância à temperatura de 42°C e tolerância a 15% de etanol, 16 isolados foram submetidos à identificação molecular (Figura 14). O isolado P8-2.12 apresentou elevada homologia (98%) com *Spathaspora roraimanensis* XMD23.2 (JN099269.1); os isolados P16-1.1, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 e G18-3.7 apresentaram elevada homologia (99%) com *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345 (NR\_111397.1). Foi possível obter a identificação dos gêneros através do sequenciamento dos isolados P19-1.1, P21-1.7, P21-2.1, P22-3.18 (*Candida* sp.) e P22-1.2, P22-1.3, P22-2.19, P22-2.20 (*Schwanniomyces* sp.). O isolado G7-1.4 apresentou boa sequência, mas baixa similaridade (96%) com *Candida jeffriesii*, podendo tratar-se de uma nova espécie (Tabela 3).

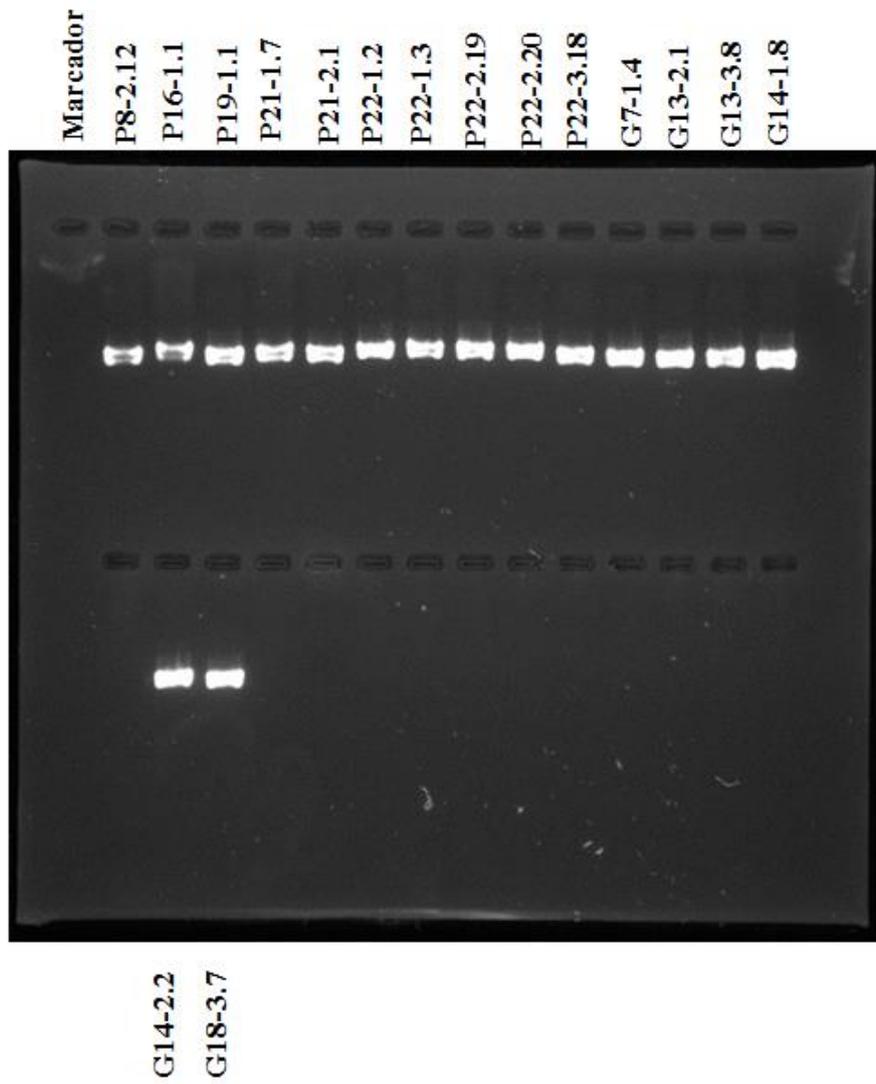


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 0,5% da amplificação da região rDNA utilizando os ITS1 e ITS4 dos dezesseis isolados

Isolados	Glicose 35%	Glicose 50%	Celobiose 1%	KCl 16%	KCl 10%	Ácido acético 1%	Ácido acético 0,5%	42°C (OD <sub>600</sub> 1,0)	50°C (OD <sub>600</sub> 1,0)	42°C (OD <sub>600</sub> 2,0)	50°C (OD <sub>600</sub> 2,0)	Arabinose 1%	Vanilina 6µmol/L <sup>-1</sup>	Vanilina 8µmol/L <sup>-1</sup>	Furfural 1,2g/L <sup>-1</sup>	Furfural 1,0g/L <sup>-1</sup>	Furfural 0,5g/L <sup>-1</sup>	Furfural 0,25g/L <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mm)
P8-2.12	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	37,34
P16-1.1	++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	+	-	+	+++	++	-	-	-	++	17
P19-1.1	++	+++	+	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	++	21,67
P21-1.7	++	+++	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+++	+++	-	-	-	++	24,34
P21-2.1	++	+++	+++	-	+	-	-	-	-	++	-	+	+++	+++	-	-	-	++	21
P22-1.2	+++	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	0
P22-1.3	+++	+++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	0
P22-2.19	+++	++	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+++	++	-	-	-	-	0
P22-2.20	+++	+++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	0
P22-3.18	++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+++	23,67
G7-1.4	++	++	+++	-	+	-	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	+	22,67
G13-2.1	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	28,67
G13-3.8	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	28,67
G14-1.8	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	27
G14-2.2	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	29,67
G18-3.7	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	29,67

Tabela 2 - Resultados dos testes de tolerância com dezesseis isolados pré-selecionados frente a etanol 15%

Legenda: (-) = ausência de crescimento, (+) = crescimento leve, (++) = crescimento moderado, (+++) = crescimento intenso. OD = densidade óptica. mm = milímetros (para mais informações ver Materiais e Métodos), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

Código do Isolado	Organismo	Origem	Identificação (%)	Genbank número de identificação/número acesso	rDNA <sup>a</sup>
P8-2.12	<i>Spathaspora roraimanensis</i>	Intestino besouro	98%	JN099269.1	ITS1/ITS4
P16-1.1	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Intestino besouro	99%	NR_111397.1	ITS1/ITS4
P19-1.1	<i>Candida</i> sp.	Intestino besouro	84%	JQ901890.1; JQ647915.1	ITS1/ITS4
P21-1.7	<i>Candida</i> sp.	Intestino besouro	90%	JQ647915.1; JQ901890.1; FN4241041	ITS1/ITS4
P21-2.1	<i>Candida</i> sp.	Intestino besouro	93%	JQ647915.1; JQ901890.1; JX448364.1	ITS1/ITS4
P22-1.2	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Intestino besouro	99%	JQ425347.1; HQ115736.1; AJ586527.1; EF198011.1; JQ425390.1	ITS1/ITS4
P22-1.3	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Intestino besouro	99%	HQ115736.1; JQ425347.1; EF198011.1; AJ586527.1; JQ425390.1	ITS1/ITS4
P22-2.19	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Intestino besouro	99%	HQ115736.1; JQ425347.1; EF198011.1; JQ425390.1	ITS1/ITS4
P22-2.20	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Intestino besouro	99%	JQ425390.1; EF198011.1; AJ586527.1; JQ425347.1; JQ425390.1; LN875174.1	ITS1/ITS4
P22-3.18	<i>Candida</i> sp.	Intestino besouro	99%	FN424204.1; NR_137087.1; JF916546.1	ITS1/ITS4
G7-1.4 <sup>b</sup>	<i>Candida jeffriesii</i>	Galeria	96%	NR_111398.1	ITS1/ITS4
G13-2.1	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Galeria	99%	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G13-3.8	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Galeria	99%	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G14-1.8	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Galeria	99%	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G14-2.2	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Galeria	99%	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G18-3.7	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Galeria	99%	NR_111397.1	ITS1/ITS4

Tabela 3 – Identificação molecular dos isolados de leveduras por sequenciamento do rDNA

<sup>a</sup> Região do gene rDNA utilizado para identificação (PRAKASH *et al*, 2011; SPANOGHE *et al*, 2016; TROST *et al*, 2004)

<sup>b</sup> Boa sequência; provável nova espécie.

### 5.3. Ensaio de fermentação em pequena escala

Os 16 isolados selecionados foram submetidos a fermentações em pequena escala inicialmente em meio contendo xilose 4% como única fonte de carbono. Os isolados P22-1.2, P22-1.3, P22-2.19, P22-2.20, P22-3.18 e G7-1.4 não produziram etanol. Após 30 horas de fermentação, os isolados P16-1.1, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 e G18-3.7 apresentaram pico de produção de etanol com aproximadamente 85% de eficiência de fermentação (Figuras 15 A, B, C, D, E e F), demonstrando considerável capacidade de conversão de xilose em etanol. A produção de xilitol ultrapassou os rendimentos de etanol nas leveduras P8-2.12 (12.25 g.L<sup>-1</sup>), P19-1.1 (21.66 g.L<sup>-1</sup>), P21-1.7 (19.20 g.L<sup>-1</sup>), P21-2.1 (19.14 g.L<sup>-1</sup>), P22-2.19 (13,60 g.L<sup>-1</sup>), P22-2.20 (17.57 g.L<sup>-1</sup>), P22-3.18 (22.10 g.L<sup>-1</sup>) e G7-1.4 (20.01 g.L<sup>-1</sup>) (Tabela 4). O etanol e/ou xilitol foram os principais produtos do metabolismo da xilose.

Os resultados dos parâmetros fermentativos ( $Y_{P/S}$  = rendimento de etanol ou xilitol;  $Q_P$  = produtividade de etanol ou xilitol;  $\eta\%$  = eficiência de fermentação de etanol ou xilitol;  $Y\%$  = consumo de xilose) referentes à comparação entre fermentação em meio contendo somente xilose 4% e da cofermentação em meio com xilose 4% e glicose 2% são apresentados na Tabela 4. Estes resultados foram calculados de acordo com o tempo de fermentação (tempo máximo de produção de etanol/xilitol). Durante o processo de cofermentação, foi observado que o esgotamento de glicose ocorreu rapidamente, que as leveduras consumiram simultaneamente a xilose e que ao final de 70 horas de fermentação a xilose não foi totalmente consumida.

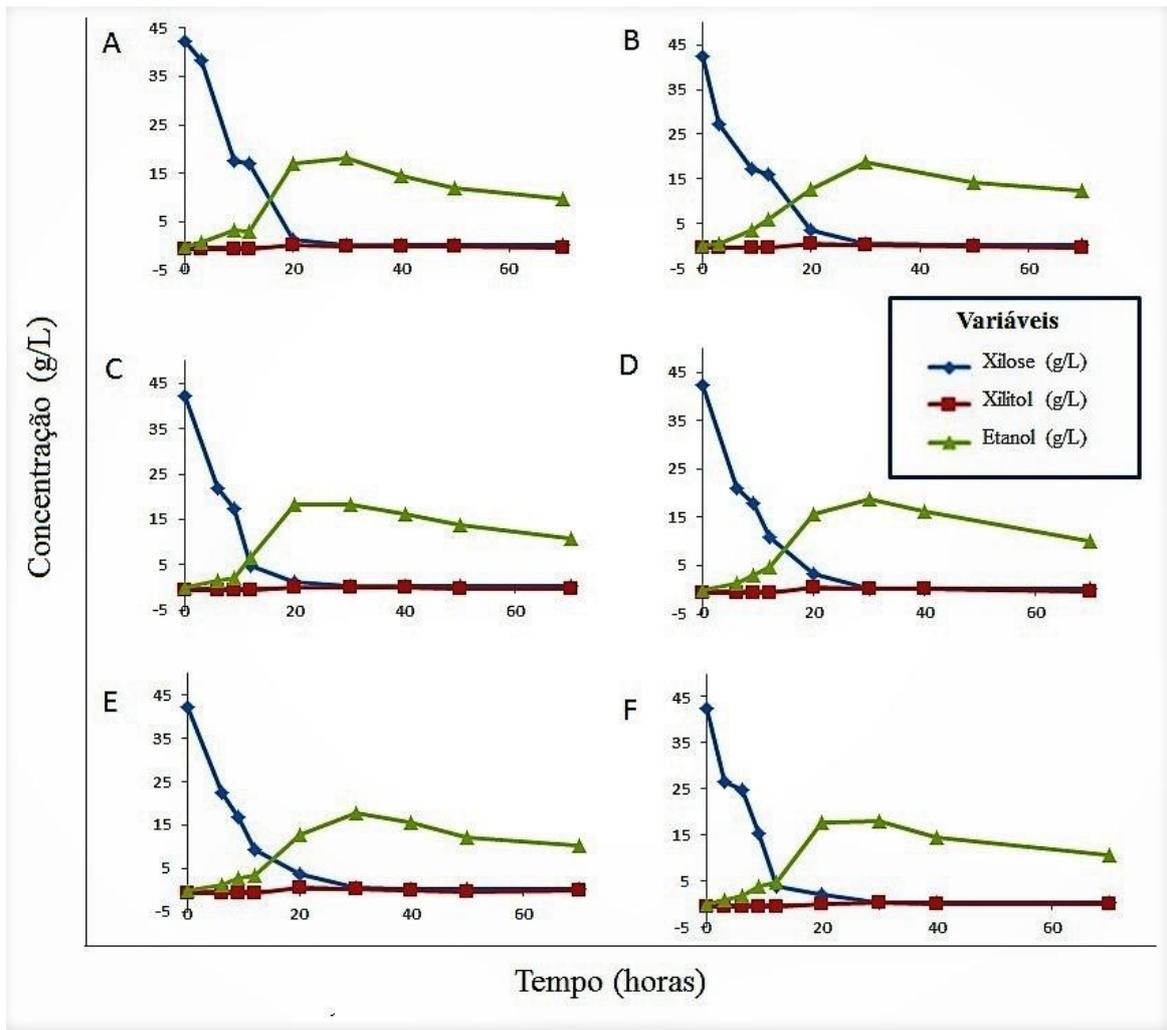


Figura 15 – Cinética de fermentação em 4% de xilose em 30°C por; (A) P16-1.1 pico de produção de etanol - 18,04 g.L<sup>-1</sup>; (B) G13-2.1 pico de produção de etanol - 18,85 g.L<sup>-1</sup>; (C) G13-3.8 pico de produção de etanol - 18,40 g.L<sup>-1</sup>; (D) G14-1.8 pico de produção de etanol - 18,68 g.L<sup>-1</sup>; (E) G14-2.2 pico de produção de etanol - 17,85 g.L<sup>-1</sup> e (F) G18-3.7 pico de produção de etanol - 17,92 g.L<sup>-1</sup>

Isolados	Concentração de xilose	Concentração de glicose	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Xilitol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sup>1</sup> <sub>P/S</sub> (g/g)	Y <sup>2</sup> <sub>P/S</sub> (g/g)	Q <sup>1</sup> <sub>P</sub> (g/l.h)	Q <sup>2</sup> <sub>P</sub> (g/l.h)	η <sup>1</sup> (%)	η <sup>2</sup> (%)	Y (%)	Pico de produção (horas)
P8-2.12	4%	0%	2,09	12,25	-	0,39	-	0,64	-	43,19	76,49	20
	4%	2%	6,51	10,59	-	0,23	-	0,15	-	24,90	99,62	70
P16-1.1	4%	0%	18,04	ND	0,43	-	0,60	-	82,25	-	99,19	30
	4%	2%	22,87	ND	0,47	-	0,76	-	82,25	-	99,35	30
P19-1.1	4%	0%	1,52	21,66	-	0,59	-	0,56	-	64,47	88,80	40
	4%	2%	5,02	16,76	-	0,13	-	0,87	-	14,58	75,51	20
P21-1.7	4%	0%	2,04	19,20	-	0,53	-	0,49	-	57,80	88,12	40
	4%	2%	7,28	11,80	-	0,26	-	0,18	-	28,72	95,71	70
P21-2.1	4%	0%	5,22	19,14	-	0,59	-	0,66	-	64,46	78,78	30
	4%	2%	6,03	17,99	-	0,43	-	0,37	-	46,40	88,81	50
P22-2.19	4%	0%	ND	13,60	-	0,44	-	0,20	-	47,96	76,15	70
	4%	2%	ND	ND	-	-	-	-	-	1,07	63,62	70
P22-2.20	4%	0%	ND	17,57	-	0,59	-	0,36	-	64,27	72,71	50
	4%	2%	ND	ND	-	-	-	-	-	8,04	18,06	70
P22-3.18	4%	0%	ND	22,10	-	0,54	-	0,32	-	58,65	99,57	70
	4%	2%	7,15	13,39	-	0,32	-	0,20	-	35,42	87,51	70
G7-1.4	4%	0%	1,94	20,01	-	0,58	-	0,69	-	62,89	84,28	30
	4%	2%	3,31	17,40	-	0,37	-	0,26	-	40,20	99,25	70
G13-2.1	4%	0%	18,85	ND	0,45	-	0,63	-	85,94	-	99,18	30
	4%	2%	23,81	ND	0,49	-	0,79	-	93,84	-	99,03	30
G13-3.8	4%	0%	18,40	ND	0,44	-	0,61	-	83,91	-	99,15	30
	4%	2%	23,69	ND	0,49	-	0,79	-	93,30	-	99,10	30
G14-1.8	4%	0%	18,68	ND	0,44	-	0,62	-	85,03	-	99,32	30
	4%	2%	24,70	ND	0,51	-	0,82	-	97,46	-	98,93	30
G14-2.2	4%	0%	17,85	ND	0,42	-	0,59	-	81,63	-	98,87	30
	4%	2%	23,95	ND	0,49	-	0,80	-	94,57	-	98,86	30
G18-3.7	4%	0%	17,92	ND	0,43	-	0,59	-	81,74	-	99,11	30
	4%	2%	24,26	ND	0,50	-	0,81	-	95,44	-	99,20	30

Tabela 4 – Parâmetros fermentativos: Comparação entre fermentação em meio com xilose 4% e cofermentação em meio com xilose 4% e glicose 2%

Legenda: Y<sup>1</sup><sub>P/S</sub> = rendimento de etanol, Y<sup>2</sup><sub>P/S</sub> (g/g) = rendimento de xilitol, Q<sup>1</sup><sub>P</sub> = produtividade de etanol, Q<sup>2</sup><sub>P</sub> = produtividade de xilitol, η<sup>1</sup> % = Eficiência de fermentação em etanol, η<sup>2</sup> % = Eficiência de fermentação em xilitol, Y% = consume de xilose, ND = Não detectado.

O ensaio em microplacas foi realizado a fim de comparar os resultados da fermentação com suplementação de xilose 4% com os suplementados com 10% de xilose. Foi avaliada a turbidez da cultura microbiana dos isolados, para assim estimar a concentração celular. Foram obtidas as curvas de crescimento dos isolados, por meio de leituras da densidade óptica, durante 60 horas de incubação. Para melhor visualização dos resultados, os gráficos foram plotados separando os produtores de etanol, os produtores de xilitol e os que não foram observados produção de etanol nem de xilitol (Figuras 16, 17 e 18).

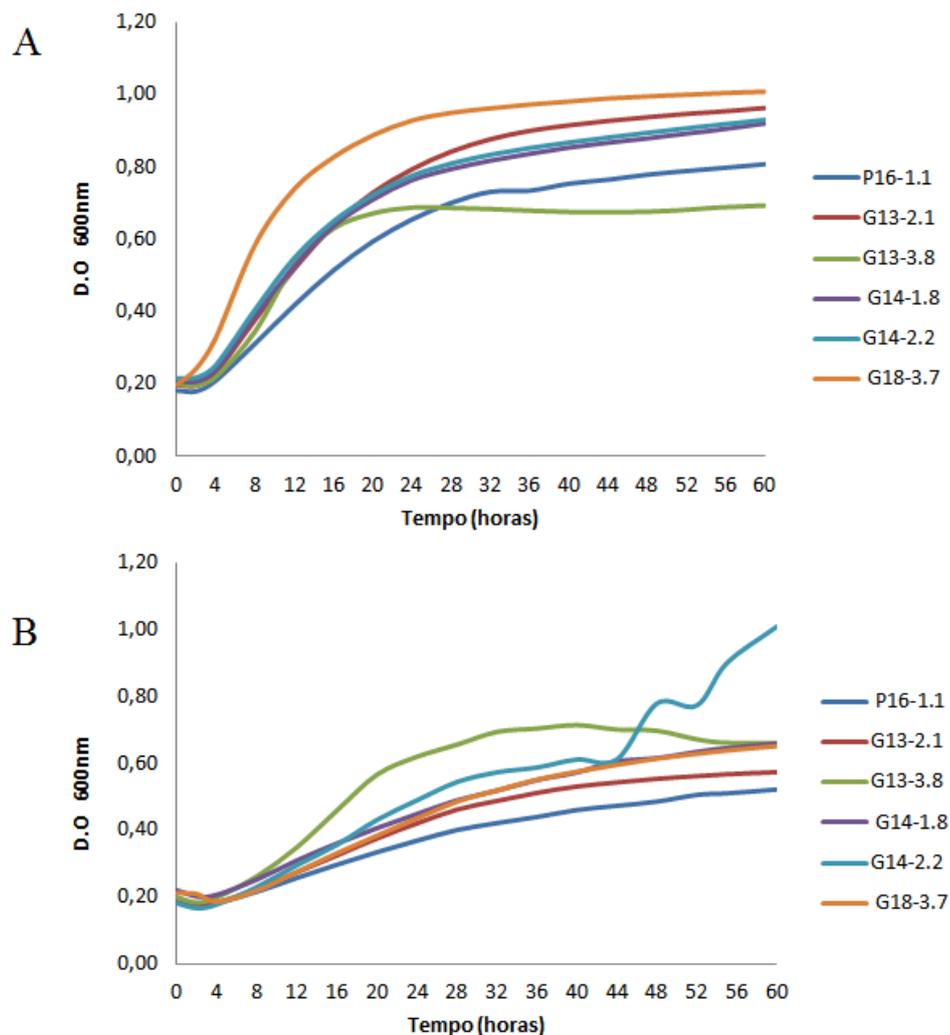


Figura 16 - Curvas de crescimento dos produtores de etanol obtidas com base na medição da D.O 600nm (Densidade óptica) da suspensão celular ao longo do tempo. A – Suplementação com 4% de xilose; B – Suplementação com 10% de xilose

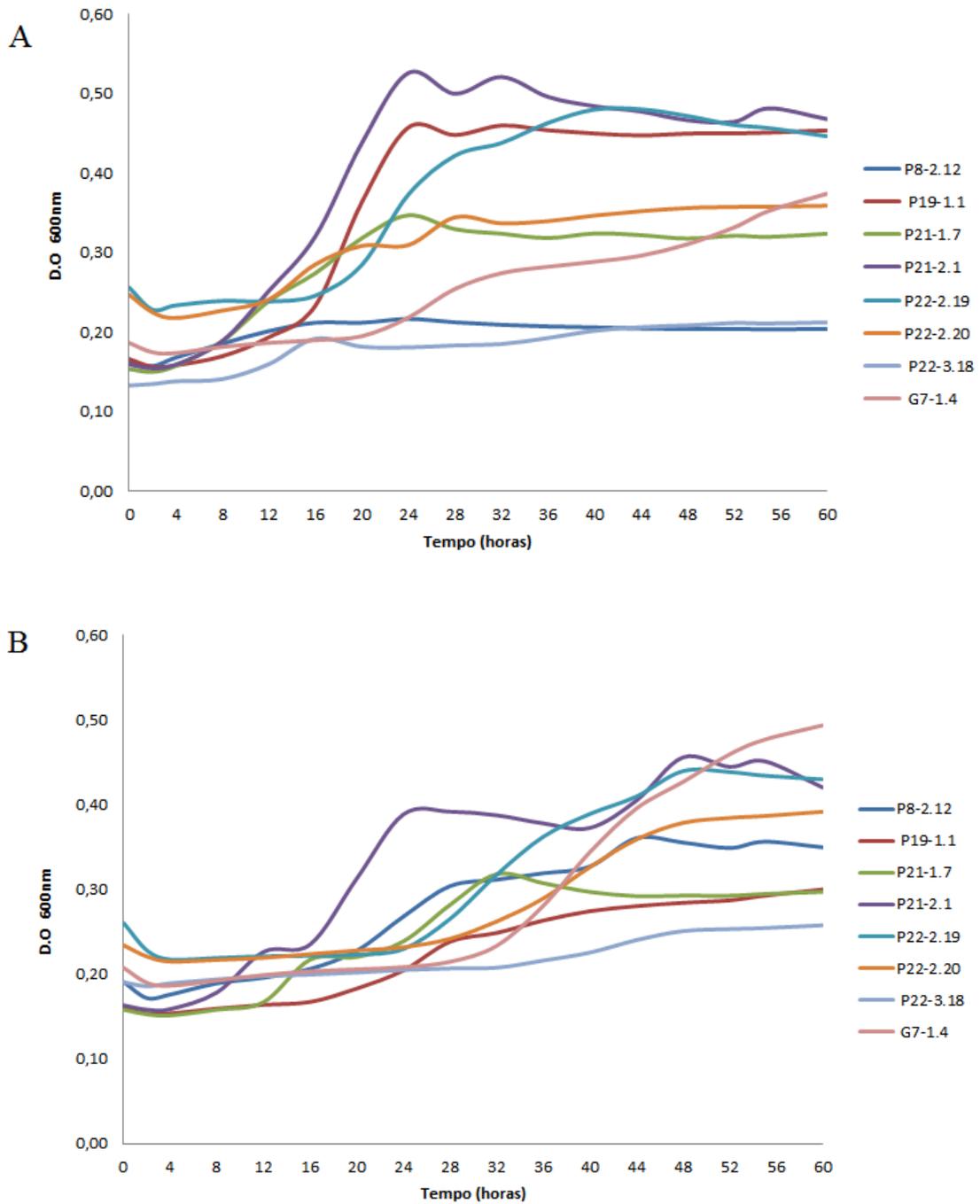


Figura 17 - Curvas de crescimento dos produtores de xilitol obtidas com base na medição da D.O 600nm (Densidade óptica) da suspensão celular ao longo do tempo; A – Suplementação com 4% de xilose; B – Suplementação com 10% de xilose

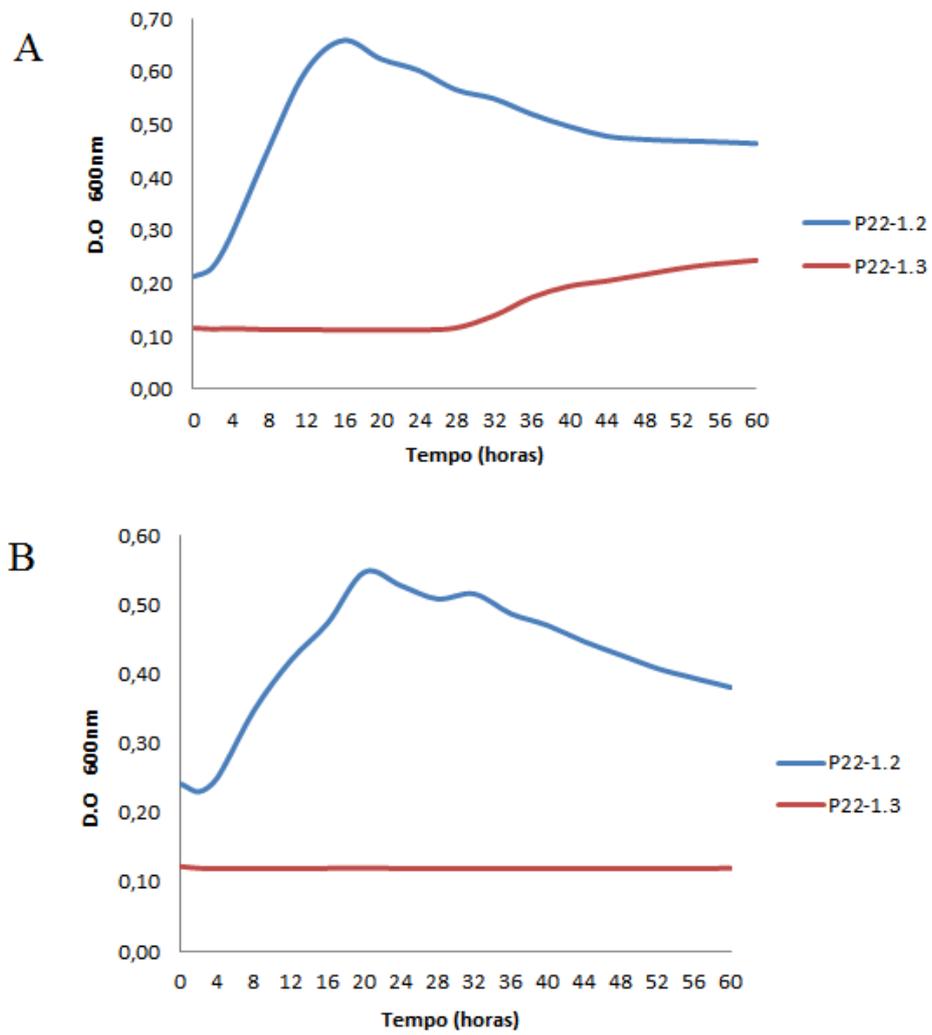


Figura 18 – Curvas de crescimento dos isolados que não foram capazes de produzir etanol/xilitol obtidas com base na medição da D.O 600nm (Densidade óptica) da suspensão celular ao longo do tempo; A – Suplementação com 4% de xilose; B – Suplementação com 10% de xilose

## 6. DISCUSSÃO

Leveduras ascomicéticas que tanto fermentam quanto assimilam xilose foram associadas a insetos que se alimentam de madeira em decomposição (RAVELLA *et al*, 2011; TAO *et al*, 2011; YOUNG *et al*, 2010). Aqui foi testada a capacidade de assimilação de xilose de 792 leveduras isoladas do intestino de besouros e de suas galerias. Somente 12 não apresentaram crescimento no meio contendo xilose como única fonte de carbono. Curiosamente, foi observado uma capacidade xilolítica significativamente maior nos isolados provenientes de galerias em comparação com os obtidos a partir do conteúdo intestinal dos besouros (Figura 10). Esta informação é preliminar, mas até onde sabemos não há menção na literatura, o que pode ser de interesse em futuras seleções de leveduras nativas para a produção de bioetanol.

Considerando as condições de estresse envolvidas nos processos de fermentação para a produção de etanol 2G (COSTA *et al*, 2014; LI, H. *et al*, 2015), os dezesseis isolados selecionados, apresentaram diferentes graus de tolerância (Tabela 2), mas nenhum desses tolerou todas as condições impostas. Esta informação é corroborada por Li, H. *et al* (2015), onde nenhuma das cinco cepas de *S. cerevisiae* tolerou todas as condições de estresse impostas e isso parece ser condição comum em cepas selvagens (SLININGER *et al*, 2015).

De fato, a produção de compostos tóxicos durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica afeta negativamente o crescimento das leveduras e a capacidade de fermentação, porém a remoção destes compostos aumenta em muito o custo da produção de etanol. Dubey *et al* (2015) reafirmam a importância destes compostos tóxicos e, segundo estes autores, cepas com maior tolerância ao furfural e a 5-hidroximetil furfural (5-HMF) tornariam a produção de etanol lignocelulósico economicamente viável. Neste recente trabalho, estes autores descrevem uma cepa

selvagem com melhor desempenho na fermentação em presença de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de furfural e  $7,6 \text{ g.L}^{-1}$  de 5-HMF, comparado com uma cepa industrial e uma de laboratório, demonstrando o interesse na busca por isolados selvagens com perfil apropriado.

Melhorar a utilização de xilose em leveduras com relevância industrial é essencial para produzir biocombustível economicamente viável de material celulósico. Lam *et al* (2014) adicionaram sais (particularmente KCl – cloreto de potássio e KOH – hidróxido de potássio) a culturas com alta densidade celular e de glicose que simulam culturas de fermentação industrial para determinar os efeitos sobre a produção de etanol. Estes ajustes ao meio, além de melhorar a fermentação a partir de xilose, um importante açúcar hemicelulósico que não pode ser consumido por cepas padrão de *S. cerevisiae*, foi observado um aumento proporcional à completa assimilação da xilose. Estes autores observaram, enfim, que a suplementação com  $\text{K}^+$  e a redução da acidez, aumentaram a tolerância de uma forma imparcial em relação ao tipo de substrato.

Kumari & Pramanik (2012) selecionaram leveduras mutantes que apresentaram boa tolerância a altas temperaturas e etanol. Eles relataram que tanto o crescimento quanto os processos de produção de etanol em leveduras fermentadoras de xilose foram fortemente inibidos em uma concentração inicial de vanilina de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ . Considerando a vanilina, o furfural e o ácido acético, o que menos apresentou efeito tóxico em todas as cepas avaliadas foi o ácido acético. Isso diferiu dos resultados encontrados, em que não foi observado crescimento na placa contendo 1% de ácido acético, exceto no isolado G7-1.4 com 0,5% de ácido acético. Onze dos isolados apresentaram crescimento frente à furfural  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  e todos os isolados foram, em certa medida, inibidos por furfural em concentrações de  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ .

<sup>1</sup>. Em relação à suplementação com vanilina, apenas os isolados P8-2.12, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 e G18-3.7 não apresentaram crescimento nas placas com vanilina 8 $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (Tabela 2).

A identificação molecular foi feita pela amplificação das regiões ITS1 e ITS4 que são os iniciadores universais recomendados para identificações de fungos (PRAKASH *et al*, 2011; SPANOGHE *et al*, 2016; TROST *et al*, 2004). O isolado G7-1.4 apresentou-se como sendo potencialmente uma espécie de levedura não descrita anteriormente, mais provavelmente do gênero *Candida*. As espécies de *Candida* não foram amplamente relatadas como sendo leveduras fermentadoras para utilização industrial (EBABHI *et al*, 2013). As leveduras que foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* (Tabela 3) também não produziram etanol, mas foram capazes de produzir xilitol.

Morais *et al* (2013) relataram pela primeira vez a conversão de D-xilose em etanol pelas leveduras *Schwanniomyces polymorphus* e *Wickerhamomyces pijperi*. Neste estudo, isolados que foram identificados como *Schwanniomyces* sp. não produziram etanol, mas foram capazes de produzir xilitol.

As espécies isoladas encontradas aqui diferiram de outros estudos, como em Rivera *et al* (2009). Esses autores isolaram 403 leveduras de besouros (Coleoptera: Dendroctonus). As leveduras foram isoladas do intestino, dos ovários, ovos e fezes dos insetos coletados de pinheiros em 34 locais no México, Guatemala e EUA. As leveduras foram relacionadas a três gêneros: *Candida* spp. (*C. ernobii*, *C. piceae*, *C. membranifaciens*, *C. lessepsii*, *C. arabinofementans* e *C. oregonensis*), *Pichia* spp. (*P. americana*, *P. guilliermondii*, *P. scolyti*, *P. mexicana*, *P. glucozyma* e *P. canadensis*) e *Kurashia* spp. (*K. capsulata* e *K. cf. molischiana*). Estudos da associação entre besouros e galerias realizados na China para investigar a

comunidade fúngica dos besouros do Pinho branco chinês (*Dendroctonus armandi* Tsai and Li, Scolytidae) revelou que as leveduras do gênero *Candida* predominaram tanto no inseto quanto em suas galerias (HU *et al*, 2015).

Nesta pesquisa, os isolados com alta homologia com a cepa *Spathaspora passalidarum* obtiveram maiores rendimentos de etanol em meios contendo 4% de xilose. Pesquisas anteriores (CADETE *et al*, 2009; HOU, 2012) mostraram que todas as espécies do clado *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição ou de insetos associados a este substrato converteram xilose em etanol de forma mais eficiente do que a espécie de referência *Pichia stipitis*.

Cadete *et al* (2016a) classificaram algumas espécies de *Spathaspora* como produtores de etanol e produtores de xilitol, de acordo com o principal produto do metabolismo da xilose. Em sua pesquisa, o etanol foi o principal produto para *S. passalidarum*. Entre os produtores de xilitol, a espécie *S. roraimanensis* apresentou maior produção, sendo esta característica fisiológica associada à atividade bioquímica da xilose-redutase (XR). Os produtores de etanol, como *S. passalidarum*, revelaram atividades de XR com NADH e NADPH como cofatores. Os produtores de xilitol tiveram atividade XR com NADPH- dependente. Considerando isso, neste trabalho, os isolados P16-1.1, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 e G18-3.7 podem ser considerados produtores de etanol e os isolados P8-2.12, P19-1.1, P21- 1.7, P21-2.1, P22-2.20, P22-3.18 e G7-1.4 podem ser considerados produtores de xilitol.

De acordo com Hou (2012), em condições aeróbicas, o consumo de glicose e xilose ocorre simultaneamente, o que não ocorre em condições anaeróbicas, onde o consumo de xilose inicia após depleção da glicose. Sugerindo que *S. passalidarum* pode utilizar diferentes sistemas de transporte de xilose sob condições anaeróbicas e aeróbicas.

Cadete *et al* (2016a), em condições de limitação severa de oxigênio obtiveram uma produção de etanol acima de 20 g/L para *S. passalidarum*. Em comparação com este trabalho, os isolados P16-1.1 (18,04 g.L<sup>-1</sup>), G13-2.1 (18,85 g.L<sup>-1</sup>), G13-3.8 (18,40 g.L<sup>-1</sup>), G14-1.8 (18,68 g.L<sup>-1</sup>), G14-2.2 (17,85 g.L<sup>-1</sup>) e G18-3.7 (17,92 g.L<sup>-1</sup>) foram eficientes na produção de etanol (Figura 14) e apresentaram melhores resultados quando realizada a cofermentação (até 24,7 g.L<sup>-1</sup>). O pico de produção foi de 30 horas para fermentação e cofermentação. A eficiência de fermentação ( $\eta\%$ ) para estes isolados variou entre 81-85,94%. Durante a cofermentação, obtivemos uma variação de 89-95,44% (Tabela 4), o que parece promissor. Considerando os resultados de Cadete *et al* (2012a), que, com *S. passalidarum* em meio com D-xilose (50 g.L<sup>-1</sup>) como fonte exclusiva de carbono, obtiveram a produção máxima de etanol em 24h a temperatura de 30°C, com produção de etanol variando de 15 g.L<sup>-1</sup> a 18 g.L<sup>-1</sup> ( $Q_p=0,6\text{g/L.h}^{-1}$  a  $0,75\text{g/L.h}^{-1}$ ) e eficiência de fermentação de aproximadamente 70%.

Cepas com este perfil, a exemplo do recentemente realizado por Slininger *et al* (2015), podem servir a técnicas para forçar a evolução destas cepas selvagens. Estes autores descrevem significativo melhoramento da cepa *Scheffersomyce stipitidis* NRRL Y-7124, tanto para a produção quantitativa de etanol (55-60 g.L<sup>-1</sup> na cepa modificada frente a 40-45 g.L<sup>-1</sup> na cepa progenitora) quanto para a tolerância a agentes tóxicos.

Com relação aos produtores de xilitol, o isolado P8-2.12 - *S. roraimanensis* não foi eficiente se comparado com o reportado por Cadete *et al* (2016a), para esta mesma espécie. Nosso isolado produziu 12,25 g.L<sup>-1</sup> de xilitol. Os *S. roraimanensis* estudados por estes autores produziram 27,4 g.L<sup>-1</sup>. Porém, os isolados P19-1.1, P21-1.7, P21-2.1, P22-2.19, P22-2.20, P22-3.18 e G7-1.4 demonstraram boa

produção de xilitol com: 21,66 g.L<sup>-1</sup>; 19,20 g.L<sup>-1</sup>; 19,14g.L<sup>-1</sup>; 13,60 g.L<sup>-1</sup>; 17,57 g.L<sup>-1</sup>; 22,10g.L<sup>-1</sup> e 20,01g.L<sup>-1</sup> mas durante o teste de cofermentação não obtivemos boa produção de xilitol, em alguns casos não apresentando produção (Tabela 4). Os rendimentos obtidos usando *Scheffersomyces Amazonensis* UFMG-CM-Y493T (34,2 g.L<sup>-1</sup>) foram maiores do que os obtidos usando espécies produtoras de xilitol da *Spathaspora* (CADETE *et al*, 2016b).

Ping *et al* (2013) determinaram a produção de xilitol por *Candida tropicalis* utilizando hidrolisado de hemicelulose de milho sem detoxificação obtendo uma concentração máxima de 38.8 g.L<sup>-1</sup> de xilitol. Dentre as espécies estudadas por Junyapate *et al* (2014), *C. tropicalis* foi a que produziu maior concentração de xilitol (7,2 g.L<sup>-1</sup>). Cadete *et al* (2015) avaliaram a produção de xilitol a partir de 50 g.L<sup>-1</sup> de xilose de cinco cepas da espécie *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov. A produção máxima de xilitol atingida em 72 h foi praticamente igual entre os isolados, com uma produção média igual a 33,02 g.L<sup>-1</sup>, consideravelmente superior ao perfil de nossos isolados.

Yu *et al* (2017), utilizaram uma cepa mutante que consumisse eficientemente glicose e xilose, para produção de etanol, onde sujeitaram a *S. passalidarum* NRRLY-27907 (U1) à mutagênese atmosférica e à temperatura ambiente. O desempenho da fermentação foi comparado com o da cepa parental em meio contendo 100 g/L de xilose durante 72 h. A produção de etanol aumentou para 35,41 g.L<sup>-1</sup> de 20,58 g.L<sup>-1</sup> da cepa parental, sendo um aumento de aproximadamente 72,1%.

Com o teste em microplaca foi possível obter a curva de crescimento dos isolados nas condições testada, onde foi observado alterações da densidade óptica (D.O.) quando a suplementação foi de 10% de xilose, ou seja, houve diminuição

da turbidez da cultura microbiana destes isolados. E com relação ao tempo, os isolados que tiveram suplementação de 4% de xilose atingiram um ponto de equilíbrio com um tempo menor do que os que foram suplementados com 10% de xilose. E este resultado foi observado para ambos os tipos de isolados, os capazes de produzir etanol e os capazes de produzir primordialmente xilitol (Figura 15). Não foi possível encontrar outro dado desta natureza para comparação na literatura. Ainda com relação à concentração de xilose 10%, não foi possível precisar se a produção de etanol/xilitol ocorreria em quantidades significativas, visto que não foram realizados os teste de fermentação em escala laboratorial com esta concentração de xilose.

## 7. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu a obtenção de três isolados (P16-1.1; P21-1.7 e P21-2.1) tolerantes a diversas condições de estresse normalmente enfrentadas no processo de obtenção de etanol de segunda geração. Foi observada boa produção comparativa de etanol a partir de xilose com aparente potencial para testes em maior escala ou ferramentas de alteração destas cepas selvagens. Estes três isolados com melhor desempenho foram curiosamente todos isolados do intestino do besouro *Popilius marginatus* (Percheron, 1835). O isolado P16-1.1, identificado como *S. passalidarum* apresentou particularmente um considerável potencial para trabalhos posteriores. Este estudo adiciona algumas informações e isolados possivelmente relevantes na busca por produção economicamente viável de etanol 2G, reafirmando o interesse da amostragem de ambientes naturais para a obtenção de cepas selvagens para a produção de bioetanol. Ainda, os resultados sugerem preliminarmente que leveduras isoladas de galerias de insetos apresentam maior capacidade xilolítica do que leveduras isoladas do intestino de besouros.

## REFERÊNCIAS

- ALI, M. N.; KHAN, M. M. Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, vol. 2, n. 1, p. 316-324, 2014.
- BERKOV, A.; FEINSTEIN, J.; SMALL, J.; NKAMANY, M. Yeasts isolated from neotropical wood-boring beetles in SE Peru. **Biotropica**, vol. 39, n. 4, p. 530–538, 2007.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 75, n. 8, p. 2304–11, 2009.
- BOEKHOUT, T. Biodiversity: gut feeling for yeasts. **Nature**, vol. 434, n. 7032, p. 449-451, 2005.
- BOUCHER, S. Évolution et phylogénie des Coleoptères Passalidae (Scarabaeoidea) Les taxons du groupe famille. In: La tribu néotropical de Proculini et son complexe *Veturius*. **Annales de la Société Entomologique de France** (N. S.) vol. 41, n. 3-4 p. 239-604, 2005.
- CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, vol. 9, n. 8, p. 1338–42, 2009.
- CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSSA, N.K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, vol. 7, n. 8 e43135, 2012a.
- CADETE, R.M.; MELO, M.A.; LOPES, M.R.; PEREIRA, G.M.D.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M-A.; ROSA, C.A. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 62, n.6, p. 1438–1440, 2012b.
- CADETE, R.M.; CHEAB, M.A.M.; SANTOS, R.O.; SAFAR, S.V.B.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; BASSO, L.C.; LEE, C.F.; KURTZMAN, C.P.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from lignocellulosic materials. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 65, n. 9, p.2968–2974, 2015.
- CADETE, R.M.; HERAS, A.M.; SANDSTRÖM, A.G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M-F.; ROSA, C.A.; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: *XYL1.2* from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 9, n.167, p. 1-14, 2016a.

CADETE, R.M.; MELO-CHEAB, M.A.; VIANA, A.L.; OLIVEIRA, E.S; ROSA, C.A. The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 32, n. 207, p. 1-5, 2016b.

CAGGIA C.; RESTUCCIA C.; PULVIRENTI A.; GIUDICI, P. Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 71, n. 1, p. 71-73, 2001.

CALDERON, O.; BERKOV, A. Midgut and fat body bacteriocytes in neotropical cerambycid beetles (Coleoptera: Cerambycidae) **Environmental Entomology**, vol. 41, n. 1, p. 108-117, 2012.

CAMPOS, V.J. Caracterização fisiológica de leveduras fermentadora de xilose. 2015. p. 48. **Dissertação** – Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

CAMPOS, L.M.A.S. Estudos dos parâmetros fermentativos na obtenção de aguardente de mel. 2011. p. 167. **Tese** – Doutorado em Ciências. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena/SP.

CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; VITOLO, M.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated batch immobilized cell system. **Zeitschrift für Naturforschung C**, vol. 57, n. 1/2 p.109–112, 2002.

CARVALHO, F.P.; SOUZA, A.C.; MAGALHÃES-GUEDES, K.T.; DIAS, D.R.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 7, n. 32, p. 4176-4190, 2013.

CASA-VILLEGAS, M.; MARIN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a *Trichoderma reesei* enzyme preparation and a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, vol. 33, n. 140, p. 1-8, 2016.

CHANDEL, A.K.; CHANDRASEKHAR, G RADHIKA, K.; RAVINDER, R RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review* vol. 6, n.1, p. 08-20, 2011.

CORTEZ, D.V.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Improvement on D-xylose to Xylitol Biotransformation by *Candida guilliermondii* using cells permeabilized with Triton X-100 and selected process conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 180, n. 5, p. 969-979, 2016.

COSTA, A.D. SOUZA, C.J.A.; COSTA, O.S.; RODRIGUES, M.Q.R.B.; SANTOS, A.F.S.; LOPES, M.R.; GENIER, H.L.A.G.; WENDEL, B.; SILVEIRA, W.B.; FIETTO, L.G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 98, n. 8, p. 3829–3840, 2014.

DAVIS, T. S. The ecology of yeasts in the bark beetle holobiont: a century of research revisited. **Microbial Ecology**, vol. 69, n. 4, p. 723–732, 2015.

DORAN-PETERSON, J.; COOK, D.M.; BRANDON, S.K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. **The Plant Journal**, vol. 54, n. 4, p. 582–592, 2008.

DUBEY, R.; JAKEER, S.; GAUR, N.A. Screening of natural yeast isolates under the effects of stresses associated with second generation biofuel production, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 121, n. 5, p. 509-16 2015.

EBABHI, A.M.; ADEKUNLE, A.A.; OKUNOWO, W.O.; OSUNTOKI, A.A. Isolation and characterization of yeast strains from local food crops. *Journal of Yeast and Fungal Research*, vol. 4, n. 4, p.38-43, 2013.

FILLAT, U.; IBARRA, D.; EUGENIO, M.E.; 1, MORENO, A.D.; ELIA TOMÁS-PEJÓ, E.; MARTÍN-SAMPEDRO, R. Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: A review. **Fermentation**, vol. 3, n. 17, p. 1-30, 2017.

FONSECA, C.R.V.; BARBOSA, M.L.L.; FERNANDEZ, M.F.S. A hypothetical evolutionary history of passalid beetles narrated by the comparative anatomy of the hindgut (Coleoptera: Passalidae). **Zootaxa**, vol. 3012, n. 1, p. 1–20, 2011.

GAO, J.; FENG, H.; YUAN, W.; LI, Y.; HOU, S.; ZHONG, S.; BAI, F. Enhanced fermentative performance under stresses of multiple lignocellulose-derived inhibitors by over expression of a typical 2-Cys peroxiredoxin from *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 10, n. 79, 2017.

GUAMÁN-BURNEO, M.C.; DUSSÁN, K.J.; CADETE, R.M.; CHEAB, M.A.; PORTERO, P.; CARVAJAL-BARRIGA, E.J.; DA SILVA, S.S.; ROSA, C.A. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, vol. 108, n. 4, p. 919–931, 2015.

GRUNWALD, S.; PILHOFER, M.; HOLL, W. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 33, n. 1, p. 25-34, 2010.

GOLINSKI, M.R.; BOECKLEN, J.W.; DAWE, A.L. Two-dimensional fractal growth properties of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*: the effects of hypovirus infection. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 48, n. 5, p. 426–429, 2008.

GOULIAMOVA, D.E.; DIMITROV, R. A.; SMITH, M. T.; GROENEWALD, M.; STOILOVA-DISHEVA, M. M.; GUÉORGUIEV, B. V.; BOEKHOUT, T. DNA barcoding revealed *Nematodospora valgi* gen. nov., sp. nov. and *Candida cetoniae* sp. nov. in the *Lodderomyces* clade. **Fungal Biology**, vol. 120, n. 2, p. 179-190, 2015.

GUO, X.; ZHANG, R.; LI, Z.; DAI, D.; LI, C.; ZHOU, X. A novel pathway construction in *Candida tropicalis* for direct xylitol conversion from corn cob xylan. **Bioresource Technology**, vol. 128, n. 7, p. 547–552, 2013.

HAHN-HÄGERDAL B, GALBE M, GORWA-GRAUSLUND MF, LIDÉN G, ZACCHI G. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, vol. 24, n. 12, p. 549–556, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWAGRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 94, n. 1, p. 205–214, 2012.

HOU, X.; YAO, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 93, n. 6, p.2591–2601, 2012.

HOUSEKNECHT, J.L.; HART, E.L.; SUH, S.O.; ZHOU, J.J., Yeasts in the *Sugiyamaella* clade associated with wood-ingesting beetles and the proposal of *Candida bullrunensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 61, n. 7, 1751-1756, 2011.

HU, X.; LI, M.; CHEN, H. 2015. Community structure of gut fungi during different developmental stages of the Chinese white pine beetle (*Dendroctonus armandi*). **Scientific Reports**, vol. 5, n. 8411, p. 1-7, 2015.

JOELSSON, E.; ERDEI, B.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. **Biotechnol Biofuels**, vol. 9, n. 1, p. 1-16, 2016.

JOHN R.P.; ANISHA, G.S.; MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, vol. 102, n. 1, 186–193, 2011.

JUNYAPATE, K.; JINDAMORAKOT, S.; LIMTONG, S. *Yamadazyma ubonensis* f.a., sp. nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 105, n. 3, p. 471–480, 2014.

KIM, S.R.; PARK, Y.C.; JIN, Y.S.; SEO, J.H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology advances**, vol. 31, n. 6, p.851-861, 2013.

KRICKA, W.; FITZPATRICK, J.; BOND, U. Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass:a perspective. **Frontiers in Microbiology**, vol. 5, n. 174, p. 1-11, 2014.

KUMARI, R.; PRAMANIK, K. Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 114 n. 6, p.622-629, 2012.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. M.; BOEKHOUT, T. (eds), **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 4<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 3-5, 1998.

- KUSARI, P.; KUSARI, S.; SPITELLER, M.; KAYSER, O. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. **Fungal Diversity**, vol. 20, n.1, p. 131-151, 2012.
- KWAK, S.; JIN, Y.S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microbial Cell Factories**, vol. 16, n. 82, p. 1-15, 2017.
- LAM, F. H.; GHADERI, A.; FINK, G. R.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering alcohol tolerance in yeast. **Science**, vol 346, n. 6205, p. 71-75, 2014.
- LELEJ, A. S.; STOROZHENKO, S. Y. Insect taxonomic diversity in the Russian far east. **Entomological Review**, vol. 90, n. 2, p. 372–386. 2010.
- LI, H.; WU, M.; XU, L.; HOU, J.; GUO, T.; BAO, X.; SHEN, Y. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. **Microbial Biotechnology**, vol. 8, n. 2, p. 266–274, 2015.
- LI, Z.; QU, H.; LI, C.; ZHOU, X. Direct and efficient xylitol production from xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through transcriptional level and fermentation processing optimizations. **Bioresource Technology**, n.149, p. 413–419, 2013.
- LONG, T.M.; SU, Y.K.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 78, n. 16, p. 5492–500, 2012.
- MAGIOLI, M.D.; SCARDINI, V.A.C.; BASTOS, M.; JULIANA, B.; MIGUEL, A.; FRANCK, T. A mobilidade brasileira como etanol de segunda geração. **Blucher Engineering Proceedings**, vol 1, n. 2, p.333–350, 2014.
- MARIN, F.R.; MARTHA, JR., G.B.; CASSMAN, K.G.; GRASSINI, P. Prospects for increasing sugarcane and bioethanol production on existing crop area in Brazil. **BioScience**, vol. 66, n. 4, p. 307-316, 2016.
- MORAIS, C.G.; CADETE, R.M.; UETANABARO, A.P.T.; ROSA, L.H.; LACHANCE, M-A.; ROSA, C.A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, vol. 60, n. 11, p.19–28, 2013.
- MOYSÉS, D.N.; REIS, V.C.B.; ALMEIDA, J.R.M.; MORAES, L.M.P.; TORRES, F.A.G. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, n. 207, p. 1-18, 2016.
- NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, vol. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.
- PAL, S.; MONDAL, A.K.; SAHOO, D.K. Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, vol. 51, n. 7, p. 809-819, 2016.

PING, Y.; LING, H.Z.; SONG, G.; GE, J.P. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 75, n.15, p. 86–91, 2013.

PRAKASH, G.; VARMA, A.J.; PRABHUNE, A.; YOGESH SHOUICHE, Y.; RAO, M. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, vol. 102, n. 3, p. 3304-3308, 2011.

RADECKA, D.; MUKHERJEE, V.; MATEO, R.Q.; STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS Yeast Research**, vol. 15, n. 6, p. 1-13, 2015.

RAO, V.L.; GOLI, J.K.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, vol.213, n.1 , p.299-310, 2016.

RAVELLA, R. S.; DONOVAN, N.; JAMES, S. A.; SHIVAJI, S.; ARUNASRI, K.; BOND, C. J.; ROBERTS, I. N.; HOBBS, P. J. *Candida northwykensis* sp. nov., a novel yeast isolated from the gut of the click beetle *Melanotus villosus*. **Current Microbiology**, vol. 63, n. 2, p. 115–120, 2011.

REYES-CASTILLO, P. Coleoptera, Passalidae: Morfología y división en grandes grupos: géneros americanos. **Folia Entomológica Mexicana**, vol. 20, n. 22, p. 3–240, 1970.

RIVERA, F. N.; GONZÁLEZ, E.; GÓMEZ, Z.; LÓPEZ, N.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.; BERKOV, A.; ZÚÑIGA, G. Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, vol. 98, n. 2, p. 325–342, 2009.

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

SATO, T.K.; TREMAINE, M.; PARREIRAS, L.S.; HEBERT, A.S.; MYERS, K.S.; HIGBEE, A.J.; SARDI, M.; MCILWAIN, S.J.; ONG, I.M.; BREUER, R.J.; AVANASI-NARASIMHAN, R.; MCGEE, M.A.; DICKINSON, Q.; LA-REAU, A.; XIE, D.; TIAN, M.; REED, J.L.; ZHANG, Y.; COON, J.J. HITTINGER CT, GASCH AP, LANDICK R. Directed evolution reveals unexpected epistatic interactions that alter metabolic regulation and enable anaerobic xylose use by *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, vol. 12 n. 10, 2016.

SENA, L.M.; MORAIS, C.G.; LOPES, M.R.; SANTOS, R.O.; UETANABARO, A.P.; MORAIS, P.B.; VITAL, M.J.; DE MORAIS, M.A. JR, LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 110, n. 1, p. 53-67, 2016.

SHARROUH, B.F. Estudos da produção biotecnológica de xilitol em reator de leite fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar células imobilizadas: avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica. 2009. p.185. **Tese** – Doutorado em Conversão de biomassa. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena/SP.

SLININGER, P.J.; SHEA-ANDERSH, M.A.; THOMPSON, S.R.; DIEN, B.S.; KURTZMAN, C.P.; BALAN, V.; SOUSA, L.C.; UPPUGUNDLA, N.; DALE, B.E.; COTTA, M.A. Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid- and base-pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 8, n. 60, p. 1-27, 2015.

SLININGER, P.J.; SHEA-ANDERSH, M.A.; THOMPSON, S.R.; DIEN, B.S.; KURTZMAN, C.P.; SOUSA, L.D.; BALAN, V. Techniques for the evolution of robust pentose-fermenting yeast for bioconversion of lignocellulose to ethanol. **Journal of Visualized Experiments**, vol. 24, n. 116, p. 1-15, 2016.

SILVA, G. A.; BERNARDI, T. L.; SCHAKER, P. D. C.; MENEGOTTO, M.; VALENTE, P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian archives of biology and technology**, vol. 55, n. 2, p. 319-327, 2012.

SPANOGHE, M.; JARA, M.G.; RIVIÈRE, J.; LANTERBECQ, D.; GADENNE, M.; MARIQUE, T. Development and application of a quantitative real-time PCR assay for rapid detection of the multifaceted yeast *Kazachstania servazzii* in food. **Food Microbiology**, vol. 62, n. 1, p. 133-140, 2016.

STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; TIMOTHY Y. JAMES, T. Y.; SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. The Fungi. **Current Biology**, vol. 19, n. 18, p. 840-845, 2009.

SUH, S.O.; BLACKWEL, M. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**, vol. 5, n. 1, p. 87-95, 2004.

SUH, S.O.; BLACKWEL, M. Four new yeasts in the *Candida mesenterica* clade associated with basidiocarp-feeding beetles. **Mycologia**, vol. 97, n.1 , p. 167-177, 2005.

SUH, S.O.; BLACKWEL, M. Three new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histeridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. **Mycological Research**, vol. 110, n. 1, p. 220-228, 2006.

SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; MCHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, vol. 12, n. 11, p. 3137–3145, 2003.

TANAHASHI, M.; KUBOTA, K.; MATSUSHITA, N.; TOGASHI, K. Discovery of mycangia and the associated xylose-fermenting yeasts in stag beetles (Coleoptera: Lucanidae). **Naturwissenschaften**, vol. 97, n. 3, p. 311–317, 2010.

TAO, N.; GAO, Y.; LIU, Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: a promising candidate for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 42, n. 2, p. 668-675, 2011.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; POSSINGER, K.; GÖBEL, U.B.; ADAM, T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 56, n. 2, p. 201-211, 2004.

TYE Y.Y.; LEE, K.T.; ABDULLAH, W.N.W.; LEH, C.P. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 60, n.1, p. 155–172, 2016.

URUBSCHUROV, V.; JANCZYK, P. Biodiversity of yeasts in the gastrointestinal ecosystem with emphasis on its importance for the host. In: GRILLO, O.; VERONA, G. **The dynamical processes of biodiversity – Case studies of evolution and spatial distribution**. In Tech, p. 277-302, 2011.

URBINA, H.; SCHUSTER, J.; BLACKWELL, M. The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. **Fungal Ecology**, vol. 6, n. 5, p. 339–355, 2013.

WANNAWILAI, S.; LEE, W-C.; CHISTI, Y.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Furfural and glucose can enhance conversion of xylose to xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. **Journal of Biotechnology**, vol. 241, n. 1, p. 299-310, 2017.

YOUNG, E.; LEE, S. M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 3, n. 24, p. 1-12, 2010.

YU, H.; GUO, J.; CHEN, Y.; FU, G.; LI, B.; GUO, X.; XIAO, D. Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *Spathaspora passalidarum* U1-58. **Bioresource Technology**, vol. 232, n. 1, p. 168-175, 2017.

ZHANG, B.; ZHANG, J.; WANG, D.; HAN, R.; DING, R.; GAO, X.; SUN, L.; HONG, J. Simultaneous fermentation of glucose and xylose at elevated temperatures co-produces ethanol and xylitol through overexpression of a xylose-specific transporter in engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, n.216, p. 227–237, 2016.

## **ANEXOS**

### **I – Artigo publicado na revista African Journal of Microbiology Research.**

Souza, G.F.L.; Valentim, L.T.C.N.; Nogueira, S.R.P.; Abegg, M.A. Efficient production of second generation ethanol and xylitol by yeasts from Amazonian beetles (Coleoptera) and their galleries. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 11, n. 20, p. 814-824, 2017.

## Full Length Research Paper

# Efficient production of second generation ethanol and xylitol by yeasts from Amazonian beetles (Coleoptera) and their galleries

Gisele de Fátima Leite Souza\*, Luana Tainah Campos Nazaré Valentim, Samila Rayana Pinto Nogueira and Maxwel Adriano Abegg

Institute of Exact Sciences and Technology (ICET), Federal University of Amazonas (UFAM), Itacoatiara, Amazonas, Brazil.

Received 11 March, 2017; Accepted 4 May, 2017

Beetles of the Passalidae family live and feed on decaying wood and their guts are richly colonized by yeasts. The goal of this research was to prospect xylolytic yeasts with potential for the production of second-generation bioethanol. Therefore, 83 specimens of beetles belonging to the Passalidae and the Scarabaeidae families were collected in the Amazonian rainforest in Itacoatiara - AM, Brazil. Morphological differences of the beetles were identified and 25 chosen specimens were dissected. Yeasts from galleries inhabited by beetles and from insect guts were isolated. Isolates were previously selected through tolerance tests for temperature, ethanol and xylose assimilation capacity. Those isolates were then submitted to a panel of conditions related to ethanol production. The ethanol production reached  $24.70 \text{ g.L}^{-1}$  and the xylitol production reached  $21.66 \text{ g.L}^{-1}$ . One of the isolates with a promising profile was identified as *Spathaspora roraimanensis* and six as *Spathaspora passalidarum*. Three isolates showed to be more promising and, curiously, all came from the gut of the species *Popilius marginatus* (Percheron, 1835). In plate testing, however, the isolates obtained from galleries showed a greater capacity to assimilate xylose. As reported in this field of study, no isolate tolerated all conditions tested. Wild isolates with this profile may be used for testing larger-scale ethanol production, genetic engineering, or evolutionary techniques.

**Key words:** Beetles, bioethanol, *Popilius marginatus*, xylose.

## INTRODUCTION

Fuels from renewable resources are becoming progressively important in times of increasing environmental concern. In the specific case of bioethanol production, researchers have sought to use plant

biomass as the raw material (Brat et al., 2009).

Usually, production of bioethanol is a biological process in which sugars such as glucose, fructose and sucrose are converted into cellular energy by microbial

\*Corresponding author: E-mail: giseleflsouza@gmail.com. Tel/fax: 55-92-3521-3603.

fermentation and thus produce ethanol and carbon dioxide as metabolic residues (Tao et al., 2011). When production occurs from easily accessible sugars, it is referred to as first generation (1G) production, whereas, if lignocellulosic materials such as agricultural residues, forest materials and dedicated crops are used, they are called second-generation (2G) production (Joelsson et al., 2016).

*Saccharomyces cerevisiae* is the preferred microorganism for ethanol production, due to its capacity to grow into simple sugars such as disaccharides. However, wild strains of *S. cerevisiae* are unable to ferment D-xylose, which is one of the major polysaccharide constituents of lignocellulosic biomass. Also, D-xylose is the second most abundant sugar in the cell walls of plants and lignocellulosic biomass is of interest as a substrate for production of ethanol, xylitol and other microbial products (Carvalho et al., 2002; Hahn-Hägerdal et al., 2006; Doran-Peterson et al., 2008; Junyapate et al., 2014).

Although hydrolysis of plant biomass, which breaks hemicellulose and exposes cellulose to an enzymatic attack, is important to the production of 2G ethanol and it produces sugar mixtures rich in glucose and xylose, fermentation inhibitors are generated by the chemical pretreatment. Acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF) are considered key components among many inhibitors that are formed during pretreatment. According to Slininger et al. (2016), in order to advance the 2G ethanol process of production, research and procedures are required to allow evolution of yeast strains. It is necessary to work on the capability of surviving and functioning efficiently using both hexose and pentose sugars in the presence of such inhibitory compounds. Thus, an industrial strain, with high metabolic potential for xylose fermentation and good inhibitor tolerance would be potentially useful for industrial bioethanol production (Li et al., 2015).

Different approaches in genetic engineering have been used to allow fermentation of D-xylose by wild strains of *S. cerevisiae*, but growth and productivity rates are significantly lower in this sugar compared to glucose, and therefore the process is not industrially competitive (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Brat et al., 2009). Therefore, there is strong pressure to improve the economic viability of 2G ethanol production, thus motivating researchers to explore alternatives beyond conventional *Saccharomyces* species (Radecka et al., 2015). Recently Slininger et al. (2016) used a wild strain of *Pichia stipitis* (NRRL Y-7124) with promising capacity for pentose fermentation and reported good results using evolutionary techniques to obtain more robust variants.

Alternatively, D-xylose can be converted into the polyol xylitol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>), which is an important chemical product and with higher financial value than ethanol. Xylitol is extensively used in food and pharmaceutical industries as sweetener (Guo et al., 2013; Li et al., 2013; Sena et

al., 2016; Zhang et al., 2016).

Xylose-fermenting yeasts are commonly found into the digestive tract and/or feeding tubes of many xylophagous insects, suggesting an association with wood digestion (Suh et al., 2003, 2006). In fact, the gut of beetles and other insects is considered a hotspot of yeast diversity (Suh and Blackwell, 2004; Boekhout, 2005; Rivera et al., 2009; Cadete et al., 2009, 2012; Urbina et al., 2013; Gouliamova et al., 2015; Cadete et al., 2015, 2016).

In this context, it was hypothesized that the almost unexplored biodiversity of the Amazonian rainforest near Itacoatiara – AM, Brazil, could provide us yeast isolates from beetle guts and galleries in tree trunks with potential for 2G ethanol production.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of beetles and deposition in arthropod collection

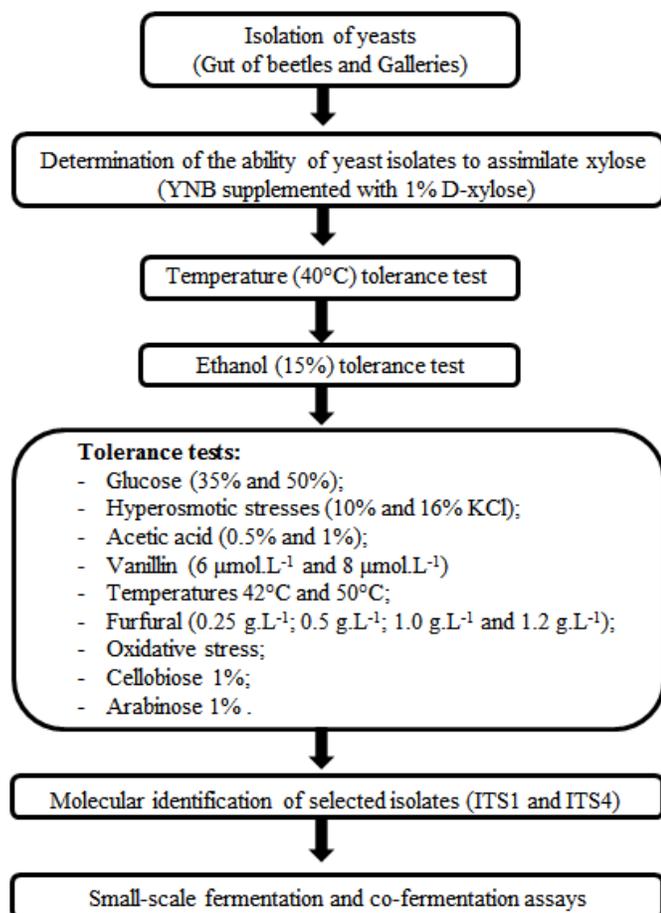
Adult beetles (Passalidae) were collected in natural habitats due to their association with decomposing wood. Beetles were collected at two sites in the Amazon forest: Campus II of the Federal University of Amazonas (UFAM), kilometer 260 of Rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464'), and in the Sol Nascente community (S03°01.045' W058°28.830'), both in the municipality of Itacoatiara - AM.

The beetles were collected individually with aid of sterile tweezers, deposited in sterile Petri plates and brought to the Mycology Laboratory of the Institute of Exact Sciences and Technology (ICET) at the Federal University of Amazonas (UFAM). The insects were transported alive with bark fragments collected from where they were found. A sampling of insects would be destroyed by the dissection process, so control specimens were collected from the same gallery and at the same time as the beetles that would be dissected (Suh and Blackwell, 2004). The entomologist Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca identified the specimens of beetles, and control specimens were deposited into the collection of the National Institute of Amazonian Research (INPA). A summary of the methods used to carry out the selection procedures was presented in Figure 1.

### Isolation of yeasts from the intestinal tract of beetles

The beetles were kept in sterile Petri plates for three days, without feeding, before euthanasia (in 0.56% KCl solution) and dissection. According to Suh and Blackwell (2004), keeping specimens without food assists in eliminating some contaminating organisms that may eventually be isolated from their gut. The insects were submitted to a surface disinfection by submersion in 70% ethanol (5 min), bleach (5 min) and sterile water (10 min) prior to removal of their guts. Sterile water (100 µl) was seeded in acidified yeast malt YM extract agar (composition/L: 5 g peptone, 3 g yeast extract, 3 g malt extract, 10 g dextrose, 15 g agar, 1000 mL distilled water, supplemented with 0.1 g chloramphenicol; pH adjusted to 3.5 with hydrochloric acid), as a negative control (Suh and Blackwell, 2004).

Guts were removed aseptically with the aid of a stereomicroscope in a biological safety cabinet. After dissection, the large gut of the insects was cut into three parts with a sterile scalpel and crushed with a clamp into sterile microtubes containing 100 µL of saline solution, and this was spread on acidified YM agar (modified from Ravella et al., 2011). The cultures were incubated at 30°C for five days. After that, individual colonies with yeast morphology were taken from and purified by at least two successive



**Figure 1.** Flowchart showing the approach for the isolation of yeasts from beetles and their galleries and screening for ethanol and xylitol producers.

replications in YM agar. From each culture, the square root of the total colonies was calculated. That number was the number of colonies isolated for later identification.

#### Determination of the ability of yeast isolates to assimilate xylose

To determine the ability to utilize xylose, the isolates were seeded in yeast nitrogen-based medium (YNB) supplemented with 1% D-xylose per puncture and incubated at 30°C for 72 h. As a positive control, the same strains were inoculated in YNB supplemented with 1% glucose (Tanahashi et al., 2010). After growth, the growth rate was evaluated by measuring the diameter of the colonies considering a horizontal axis and its perpendicular axis, after the arithmetic mean was obtained of the measurements for each isolate, according to Golinski et al. (2008).

#### Tolerance tests

Tolerance tests evaluated the growth performance of yeast isolates under some typical stress conditions in fermentations for production of 2G ethanol. The conditions tested respectively were: Glucose (35% and 50%), hyperosmotic stresses (10 and 16% KCl), acetic

acid (0.5 and 1%), temperatures of 42 and 50°C, vanillin (6 and 8  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), furfural (0.25, 0.5, 1.0 and 1.2  $\text{g.L}^{-1}$ ) and oxidative stress. Also concentrations of cellobiose 1% and arabinose 1% (Ali and Khan, 2014; Li et al., 2015) were tested. For this, the strains were previously cultured overnight in YEPD agar medium (composition/L: 10 g yeast extract, 20 g peptone, 20 g dextrose, and 20 g agar, 1000 mL distilled water) and washed twice with sterile water. The optical density was adjusted ( $\text{OD}_{600}=1.0$ ), dilution of the suspension ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) was carried out, and for oxidative stress and temperature (42 and 50°C), the density was adjusted to  $\text{OD}_{600} = 2.0$ . 4  $\mu\text{L}$  of each diluted suspension in each solid medium was applied. Except for the acetic acid test, where the plates remained incubated for four weeks at 30°C, and against furfural, with ten day incubation, the remaining tests were performed with 48-hour incubation at 30°C.

To determine the resistance to oxidative stress, the cells were mixed with 20 mL of YEPD agar (cooled to approximately 50°C) and immediately plated. Thereafter, sterile filter paper (0.5 mm diameter) was placed in the center of each plate with 6  $\mu\text{L}$  of hydrogen peroxide 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), followed by incubation of two days at 30°C. The diameters of the growth inhibition zones (in mm) were recorded (Li et al., 2015).

#### Molecular identification of selected isolates

The molecular method for yeast identification was based on the amplification and sequence analysis of rDNA internal transcribed spacer (ITS) (Caggia et al., 2001). Prior to extraction, the yeasts were grown in a YEPD medium and incubated for 24 h at 30°C. For the extraction of the genomic DNA with a pipette tip, an isolated colony was resuspended in 1 mL of sterile water in microtube that was centrifuged for 1 min at 10,000 to 12,000 rpm. Then the supernatant was removed. After that, 100  $\mu\text{L}$  of InstaGene™ Matrix (under continuous stirring) was then added to the pellet and incubated at 56°C for 30 min. The suspension was homogenized in a vortex for 10 s and the tubes incubated in boiling water (100°C) for 8 min, with further vortexing for 10 s and centrifuging at 10,000 to 12,000 rpm for 3 min. 2.5  $\mu\text{L}$  of the supernatant result per 50  $\mu\text{L}$  of the PCR reaction was used. The DNA sample was stored at -20°C, according to da Silva et al. (2012).

The primers used to amplify the rDNA ITS region were ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). The amplification reaction was performed in 50  $\mu\text{L}$  (final volume) containing 1  $\mu\text{L}$  of each primer, 25  $\mu\text{L}$  of TopTaq® Master Mix Kit (Qiagen), 21  $\mu\text{L}$  of miliQ water and 2  $\mu\text{L}$  of genomic DNA (sample) in a thermocycler. Samples were sent to Macrogen (Rockville, USA) for sequencing. The PCR product sequences were compared to the ITS regions deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the similarity compared using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (modified Tao et al., 2011).

#### Small-scale fermentation and co-fermentation assays

The fermentation tests were performed in 125 mL Erlenmeyer flasks in culture medium containing yeast extract (5  $\text{g.L}^{-1}$ ); peptone (5  $\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2  $\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1  $\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.3  $\text{g.L}^{-1}$ ) and glucose and/or xylose under stirring at 120 rpm for 70 h. The strains were previously cultured in YP medium with 2% xylose, under stirring at 120 rpm, at 28°C. From the pre-inoculum, dilutions were performed so that the initial optical density ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) of all strains was equal to 1. Each isolate was inoculated in fermentation liquid medium (4% xylose), resulting in a final volume of 50 mL. The Erlenmeyer flasks were incubated in a horizontal shaker at 28°C for 70 h and at 120 rpm. At intervals of 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 h, aliquots of 200  $\mu\text{L}$  were withdrawn to evaluate  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ,

**Table 1.** Species of beetles used for the isolation of yeasts.

Family	Genus	Species	Specimens
Passalidae	Passalus	<i>Passalus latifrons</i> (Percheron, 1841)	11
Passalidae	Passalus	<i>Passalus interruptus</i> (Lin, 1758)	4
Passalidae	Veturius	<i>Veturius platyrhinus</i> (Westwood, 1845)	1
Passalidae	Popilius	<i>Popilius marginatus</i> (Percheron, 1835)	5
Passalidae	Passalus	<i>Passalus punctiger</i> (Lep & Serv. 1825)	1
Passalidae	Passalus	<i>Passalus convexus</i> (Dalman, 1817)	1
Passalidae	Veturius	<i>Veturius transversus</i> (Dalman, 1837)	1
Scarabaeidae	Cetoniinae sp	Unidentified species	1

the cell viability by serial dilution and an aliquot of 800  $\mu\text{L}$  was centrifuged at 10,000 rpm for three minutes. The supernatant was filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  membrane and subsequently frozen for analysis of xylose, xylitol, glycerol and ethanol levels through high performance liquid chromatography (HPLC). For the co-fermentation assays, glucose (2%) was added.

## RESULTS

In this research, 83 specimens of beetles were collected from two different sites in the Amazon forest. Due to the easily observable morphological differences, 24 specimens of beetles were dissected and identified as belonging to the Passalidae family and one to the Scarabaeidae family (Table 1). From the intestinal contents of these insects and swabs rotated inside the log galleries they inhabited, 380 and 412 isolates suggestive of yeasts were obtained, totaling 792 isolates. The obtained isolates were then subjected to screening tests to verify their potential for production of 2G ethanol.

### Screening of yeast strains for bioethanol production

The 792 isolates obtained were initially submitted to a screening to verify xylose assimilation capacity. Only twelve isolates, all from the intestinal contents of the insects, did not present growth in the medium containing xylose as the only carbon source. Considering the size of the colonies (see Materials and methods), the isolates obtained from galleries had higher xylolytic capacity when compared to the isolates obtained from the guts of the beetles (t test;  $p < 0.001$ ) (Figure 2).

The 780 strains that assimilated xylose were submitted to a temperature tolerance test of 42°C for 48 h. In this condition, 73 isolates showed growth. These 73 isolates were then tested against 15% ethanol. Sixteen strains showed growth after 48 h of incubation at 30°C.

The 16 selected strains were subsequently submitted to tolerance tests to evaluate the growth performance under typical stress conditions in fermentations. Growth on the plate containing 1% acetic acid was not observed. The G7-1.4 isolate showed growth on the plate

containing 0.5% acetic acid after 22 days of incubation. There was growing in the plates with supplementation of furfural 0.25g.L<sup>-1</sup>. The isolates were categorized according to the growth observed in the plates as: Absence of growth (-), slight growth (+), moderate growth (++) and intense growth (+++) (Table 2).

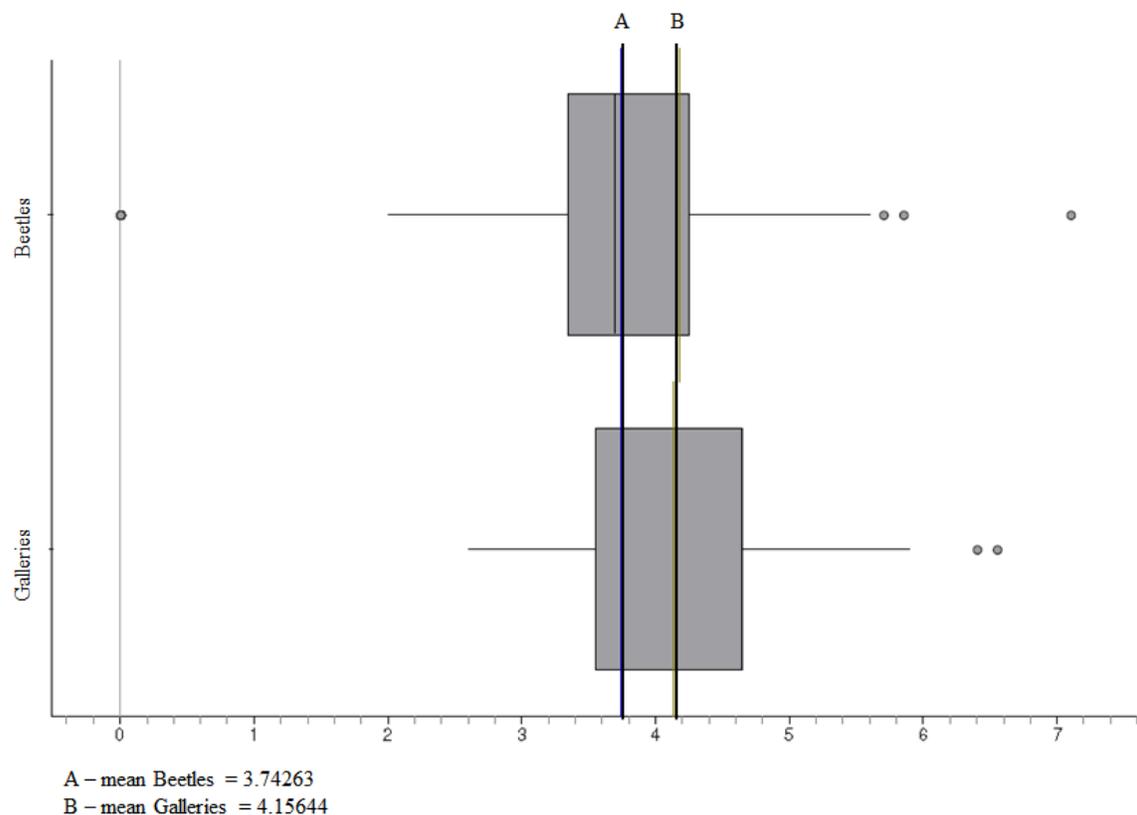
The degree of resistance to oxidative stress was demonstrated by the diameter of the inhibition halo (mm). The experiment was performed in triplicate and expressed as the mean halo diameter. Four isolates (P22-1.2, P22-1.3, P22-2.19 and P22-2.20) were not inhibited by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the tested condition (Table 2). Under the conditions used here, of the 16 isolates pre-selected and tested against this panel, three, P16-1.1; P21-1.7 and P21-2.1, showed superior tolerance (Table 2).

### Molecular identification of the selected isolates

Considering the results obtained in tests for xylose assimilation capacity, temperature tolerance for 42°C and tolerance for 15% of ethanol, 16 isolates were submitted to molecular identification. The P8-2.12 isolate showed high homology (98%) to *Spathaspora roraimanensis* XMD23.2 (JN099269.1); the P16-1.1, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 and G18-3.7 isolates showed high homology (99%) with *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345 (NR\_111397.1). It was possible to obtain genera identification through the sequencing of isolates P19-1.1, P21-1.7, P21-2.1, P22-3.18 (*Candida* sp.) and P22-1.2, P22-1.3, P22-2.19, P22-2.20 (*Schwanniomyces* sp.). The G7-1.4 isolate has a good sequence, but low similarity (96%) with *Candida jeffriesii*, being able to be a new species (Table 3).

### Small-scale fermentation tests

The 16 isolates selected were submitted to small-scale fermentations initially in media containing 4% xylose as the only carbon source. Isolates P22-1.2, P22-1.3 and P22-2.19 did not produce ethanol. After 30 h of



**Figure 2.** Difference between the dimension of the colonies (considering the mean of two perpendicular measures from the largest diameter) of yeasts isolated from the intestinal contents of beetles compared to yeasts isolated from inhabited galleries (\*\* *t* test:  $p < 0.001$ ), when cultivated in nitrogen-based agar with 1% of D-xylose as the sole carbon source.

fermentation, isolates P16-1.1, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 and G18-3.7 showed a peak of ethanol production with approximately 85% fermentation efficiency (Figure 3), demonstrating considerable capacity to convert xylose into ethanol. The production of xylitol exceeded the yields of ethanol in the yeasts P8-2.12 (12.25 g.L<sup>-1</sup>), P19-1.1 (21.66 g.L<sup>-1</sup>), P21-1.7 (19.20 g.L<sup>-1</sup>), P21-2.1 (19.14 g.L<sup>-1</sup>), P22-2.20 (17.57 g.L<sup>-1</sup>), P22-3.18 (22.10 g.L<sup>-1</sup>) and G7-1.4 (20.01 g.L<sup>-1</sup>) (Table 4). Ethanol or xylitol were the main products of xylose metabolism.

The results of the fermentative parameters ( $Y_{P/S}$  = ethanol or xylitol yield;  $Q_p$  = ethanol or xylitol productivity;  $\eta\%$  = ethanol or xylitol fermentation efficiency;  $Y\%$  = xylose consumption) relative to the comparison between fermentation in media containing only 4% xylose and co-fermentation in media with 4% xylose and 2% glucose are shown in Table 4. These results were calculated according to the fermentation time (maximum ethanol or xylitol production time). During the co-fermentation process, it was observed that glucose depletion occurred rapidly, that yeasts simultaneously consumed xylose and that, at the end of 70 h of fermentation, and xylose had not been totally consumed.

## DISCUSSION

Ascomycetic yeasts that both ferment and assimilate xylose have been associated with insects that feed on decaying wood (Young et al., 2010; Ravello et al., 2011; Tao et al., 2011). Here the xylose assimilation capacity of 792 yeasts isolated from the gut of beetles and their galleries were tested. Only 12 did not show growth in the medium containing xylose as the sole carbon source. Interestingly, a significantly higher xylolytic capacity was observed in the isolates from galleries compared to those obtained from the intestinal contents of the beetles (Figure 2). This is preliminary data, however, to our knowledge there is no mention of this in the literature, which may be of interest in future native yeast screenings for bioethanol production.

Considering stress conditions involved in the fermentation processes for the production of 2G ethanol (Costa et al., 2014; Li et al., 2015), the sixteen isolates that showed tolerance to ethanol and were selected had different degrees of tolerance (Table 2), but none of those tolerated all the conditions imposed. This information is corroborated by Li et al. (2015), where none of the five strains of *S. cerevisiae* tolerated all

**Table 2.** Cultivation tests of sixteen isolates selected on a panel of conditions frequently observed in the production of second-generation ethanol.

Strains	Glucose 35%	Glucose 50%	Cellobiose 1%	KCl 16%	KCl 10%	Acetic acid 1%	Acetic acid 0.5%	42°C (OD <sub>600</sub> 1.0)	50°C (OD <sub>600</sub> 1.0)	42°C (OD <sub>600</sub> 2.0)	50°C (OD <sub>600</sub> 2.0)	Arabinose 1%	Vanillin 6 µmol L <sup>-1</sup>	Vanillin 8 µmol L <sup>-1</sup>	Furfural 1.2 gL <sup>-1</sup>	Furfural 1.0 gL <sup>-1</sup>	Furfural 0.5g L <sup>-1</sup>	Furfural 0.25 gL <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mm)
P8-2.12	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	37.34
P16-1.1	++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	+	-	+	+++	++	-	-	-	++	17
P19-1.1	++	+++	+	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	++	21.67
P21-1.7	++	+++	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+++	+++	-	-	-	++	24.34
P21-2.1	++	+++	+++	-	+	-	-	-	-	++	-	+	+++	+++	-	-	-	++	21
P22-1.2	+++	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	0
P22-1.3	+++	+++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	0
P22-2.19	+++	++	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+++	++	-	-	-	-	0
P22-2.20	+++	+++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	0
P22-3.18	++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+++	23.67
G7-1.4	++	++	+++	-	+	-	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	+	22.67
G13-2.1	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	28.67
G13-3.8	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	28.67
G14-1.8	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	27
G14-2.2	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	29.67
G18-3.7	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	29.67

- = absence of growth; + = slight growth; ++ = moderate growth; +++ = intense growth. OD = optical density, mm = millimeters (for detailed information see materials and methods).

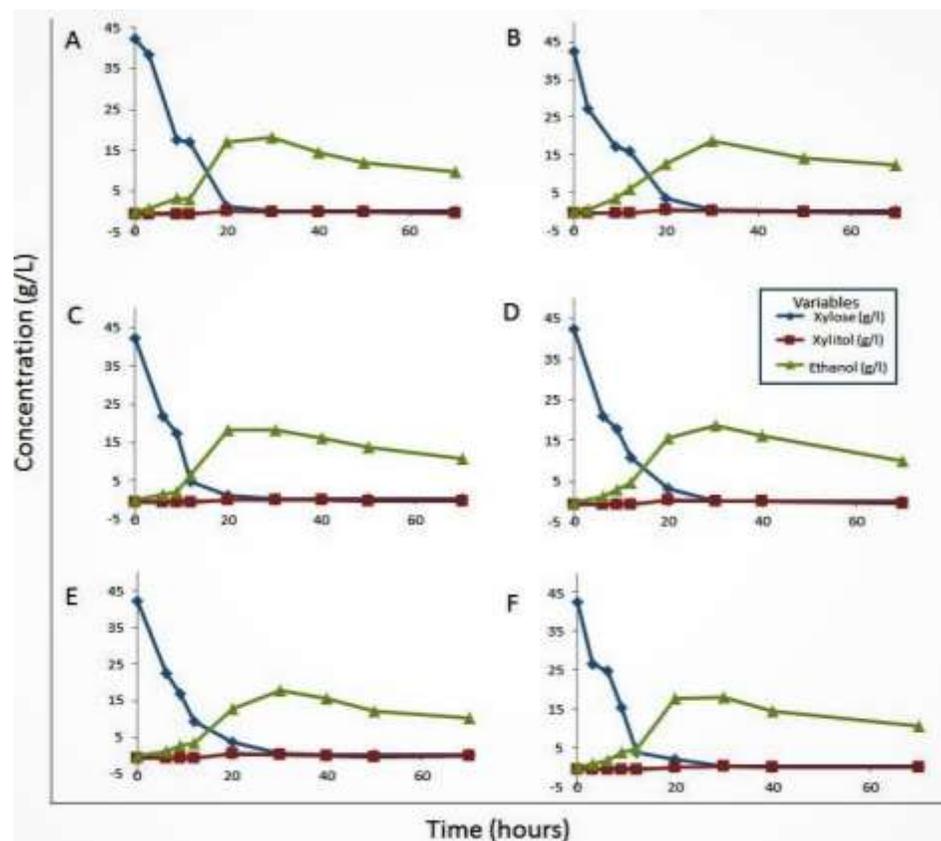
**Table 3.** Molecular identity of yeasts isolated by rDNA sequencing.

Isolate code	Organisms	Origin	Identification (%)	Genbank identification number/access number	rDNA <sup>a</sup>
P8-2.12	<i>Spathaspora roraimanensis</i>	Beetle gut	98	JN099269.1	ITS1/ITS4
P16-1.1	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Beetle gut	99	NR_111397.1	ITS1/ITS4
P19-1.1	<i>Candida</i> sp.	Beetle gut	84	JQ901890.1; JQ647915.1	ITS1/ITS4
P21-1.7	<i>Candida</i> sp.	Beetle gut	90	JQ647915.1; JQ901890.1; FN4241041	ITS1/ITS4
P21-2.1	<i>Candida</i> sp.	Beetle gut	93	JQ647915.1; JQ901890.1; JX448364.1	ITS1/ITS4
P22-1.2	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Beetle gut	99	JQ425347.1; HQ115736.1; AJ586527.1; EF198011.1; JQ425390.1	ITS1/ITS4
P22-1.3	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Beetle gut	99	HQ115736.1; JQ425347.1; EF198011.1; AJ586527.1; JQ425390.1	ITS1/ITS4
P22-2.19	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Beetle gut	99	HQ115736.1; JQ425347.1; EF198011.1; JQ425390.1	ITS1/ITS4
P22-2.20	<i>Schwanniomyces</i> sp.	Beetle gut	99	JQ425390.1; EF198011.1; AJ586527.1; JQ425347.1; JQ425390.1; LN875174.1	ITS1/ITS4
P22-3.18	<i>Candida</i> sp.	Beetle gut	99	FN424204.1; NR_137087.1; JF916546.1	ITS1/ITS4
G7-1.4 <sup>b</sup>	<i>Candida jeffriesii</i>	Gallery	96	NR_111398.1	ITS1/ITS4
G13-2.1	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Gallery	99	NR_111397.1	ITS1/ITS4

Table 3. Contd.

G13-3.8	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Gallery	99	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G14-1.8	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Gallery	99	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G14-2.2	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Gallery	99	NR_111397.1	ITS1/ITS4
G18-3.7	<i>Spathaspora passalidarum</i>	Gallery	99	NR_111397.1	ITS1/ITS4

<sup>a</sup>Region of the rDNA gene used for identification. <sup>b</sup>Good sequence; may also represent a new species.



**Figure 3.** Fermentation kinetics in media containing 4% of xylose as a carbon source at 30°C and 120 rpm, where (A) P16-1.1 ethanol production peak - 18.04 g.L<sup>-1</sup>, (B) G13-2.1 ethanol production peak - 18.85g.L<sup>-1</sup>, (C) G13-3.8 ethanol production peak - 18.40g.L<sup>-1</sup>, (D) G14-1.8 ethanol production peak - 18.68g.L<sup>-1</sup>, (E) G14 -2.2 ethanol production peak - 17.85g.L<sup>-1</sup> and (F) G18-3.7 ethanol production peak - 17.92 g.L<sup>-1</sup>.

**Table 4.** Fermentation parameters - comparison between fermentation in media with 4% of xylose and co-fermentation in medium with xylose 4% and glucose 2%.

Strains	Xylose concentration (%)	Glucose concentration (%)	Ethanol (g.L <sup>-1</sup> )	Xylitol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sup>1</sup> <sub>P/S</sub> (g/g)	Y <sup>2</sup> <sub>P/S</sub> (g/g)	Q <sup>1</sup> <sub>P</sub> (g/l.h)	Q <sup>2</sup> <sub>P</sub> (g/l.h)	η <sup>1</sup> (%)	η <sup>2</sup> (%)	Y (%)	Peak of production (hours)
P8-2.12	4	0	2.09	12.25	-	0.39	-	0.64	-	43.19	76.49	20
	4	2	6.51	10.59	-	0.23	-	0.15	-	24.90	99.62	70
P16-1.1	4	0	18.04	ND	0.43	-	0.60	-	82.25	-	99.19	30
	4	2	22.87	ND	0.47	-	0.76	-	82.25	-	99.35	30
P19-1.1	4	0	1.52	21.66	-	0.59	-	0.56	-	64.47	88.80	40
	4	2	5.02	16.76	-	0.13	-	0.87	-	14.58	75.51	20
P21-1.7	4	0	2.04	19.20	-	0.53	-	0.49	-	57.80	88.12	40
	4	2	7.28	11.80	-	0.26	-	0.18	-	28.72	95.71	70
P21-2.1	4	0	5.22	19.14	-	0.59	-	0.66	-	64.46	78.78	30
	4	2	6.03	17.99	-	0.43	-	0.37	-	46.40	88.81	50
P22-2.19	4	0	ND	13.60	-	0.44	-	0.20	-	47.96	76.15	70
	4	2	ND	ND	-	-	-	-	-	1.07	63.62	70
P22-2.20	4	0	ND	17.57	-	0.59	-	0.36	-	64.27	72.71	50
	4	2	ND	ND	-	-	-	-	-	8.04	18.06	70
P22-3.18	4	0	ND	22.10	-	0.54	-	0.32	-	58.65	99.57	70
	4	2	7.15	13.39	-	0.32	-	0.20	-	35.42	87.51	70
G7-1.4	4	0	1.94	20.01	-	0.58	-	0.69	-	62.89	84.28	30
	4	2	3.31	17.40	-	0.37	-	0.26	-	40.20	99.25	70
G13-2.1	4	0	18.85	ND	0.45	-	0.63	-	85.94	-	99.18	30
	4	2	23.81	ND	0.49	-	0.79	-	93.84	-	99.03	30
G13-3.8	4	0	18.40	ND	0.44	-	0.61	-	83.91	-	99.15	30
	4	2	23.69	ND	0.49	-	0.79	-	93.30	-	99.10	30
G14-1.8	4	0	18.68	ND	0.44	-	0.62	-	85.03	-	99.32	30
	4	2	24.70	ND	0.51	-	0.82	-	97.46	-	98.93	30
G14-2.2	4	0	17.85	ND	0.42	-	0.59	-	81.63	-	98.87	30
	4	2	23.95	ND	0.49	-	0.80	-	94.57	-	98.86	30
G18-3.7	4	0	17.92	ND	0.43	-	0.59	-	81.74	-	99.11	30
	4	2	24.26	ND	0.50	-	0.81	-	95.44	-	99.20	30

Y<sup>1</sup><sub>P/S</sub> = ethanol yield, Y<sup>2</sup><sub>P/S</sub> (g/g) = xylitol yield, Q<sup>1</sup><sub>P</sub> = ethanol productivity, Q<sup>2</sup><sub>P</sub> = xylitol productivity, η<sup>1</sup> % = ethanol fermentation efficiency, η<sup>2</sup> % = xylitol fermentation efficiency, Y% = xylose consumption, ND = not detected.

stress conditions imposed, and that seems to be a common condition for wild strains (Slininger et al., 2015).

The production of toxic compounds during pretreatment of lignocellulosic biomass negatively affects yeast growth and fermentation capacity, but removal of these compounds greatly increases the cost of ethanol production. Dubey et al. (2016) reaffirm the importance of these toxic compounds and, according to these authors, strains with greater tolerance to furfural and 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF) would make the production of lignocellulosic ethanol economically viable. In the cited research, these authors described a wild strain with higher fermentation performance in the presence of 0.5 g.L<sup>-1</sup> of furfural and 7.6 g.L<sup>-1</sup> of 5-HMF compared to an industrial strain and a laboratory strain, demonstrating interest in searching for wild isolates with the appropriate profile.

Kumari and Pramanik (2012) selected mutant yeasts that showed good tolerance to high temperatures and ethanol. They reported that both growth and ethanol production processes in xylose fermenting yeasts were strongly inhibited at an initial vanillin concentration of 1.0 g.L<sup>-1</sup>. Considering vanillin, furfural and acetic acid, the acetic acid showed the least toxic effect in all strains evaluated. This differed from our results, in which growth was not observed on the plate containing 1% acetic acid, except in the G7-1.4 isolate with 0.5% acetic acid. Eleven of the isolates showed growth against 0.2 g.L<sup>-1</sup> furfural and all the isolates were to some degree inhibited by furfural at concentrations of 1.2, 1.0 and 0.5 g.L<sup>-1</sup>. Regarding supplementation with vanillin, only the isolates P8-2.12, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 and G18-3.7 did not show growth on the plates with 8 µmol L<sup>-1</sup> vanillin (Table 2).

Molecular identification was done by the amplification of the regions ITS1 and ITS4 which are recommended universal primers for fungi identifications (Trost et al., 2004). The G7-1.4 isolate was potentially a yeast species not previously described from the *Candida* genus. *Candida* species have not been extensively reported as fermentative yeasts for industrial utilization such as the production of bioethanol nor in the production of other useful organic compounds except as causal agents of human diseases (Ebabhi et al., 2013). The yeasts that were identified as belonging to the *Candida* genus (Table 3) also did not produce ethanol, but they were capable of producing xylitol.

Morais et al. (2013) reported for the first time the conversion of D-xylose to ethanol by the yeasts *Schwanniomyces polymorphus* and *Wickerhamomyces pijperi*. In this study, isolates that were identified as *Schwanniomyces* sp. did not produce ethanol, but produced xylitol instead.

The isolated species found here differed from other studies, such as in Rivera et al. (2009). These authors isolated 403 yeasts from beetles (Coleoptera: Dendroctonus). The yeasts were isolated from the gut,

ovaries, eggs and feces of insects collected from pines at 34 sites in Mexico, Guatemala and the USA. The yeasts were related to three genera: *Candida* species (*C. ernobii*, *C. piceae*, *C. membranifaciens*, *C. lessepsii*, *C. arabinofermentans* and *C. oregonensis*), *Pichia* spp. (*P. americana*, *P. guilliermondii*, *P. scolyti*, *P. mexicana*, *P. glucozyma* and *P. canadensis*) and *Kurashia* spp. (*K. capsulata* and *K. cf. molischiana*). Studies of the association between beetles and galleries conducted in China to investigate the fungal community of Chinese white pine beetles (*Dendroctonus armandi* Tsai and Li, Scolytidae) revealed that yeasts of the genus *Candida* predominated both in the insect and in its galleries (Hu et al., 2015).

In our research, isolates with high homology with the strain *S. passalidarum* obtained higher yields of ethanol in media containing 4% of xylose. Previous research (Cadete et al., 2009; Hou, 2012) has shown that all species of the *Spathaspora* clade isolated from decomposing wood trunks or insects associated with this substrate have converted xylose into ethanol more efficiently than the species of reference *Pichia stipitis*.

Cadete et al. (2016) classified some species of *Spathaspora* as ethanol producers and xylitol producers, according to the main product of xylose metabolism. In their research, ethanol was the main product for *S. passalidarum*. Among the xylitol producers, the *S. roraimanensis* species had higher production, with this being the physiological characteristic associated with the biochemical activity of xylose reductase (XR). The ethanol producers such as *S. passalidarum* revealed XR activities with both NADH and NADPH as cofactors. Xylitol producers had strictly NADPH-dependent XR activity. Considering this, in our research, the isolates P16-1.1, G13-2.1, G13-3.8, G14-1.8, G14-2.2 and G18-3.7 can be considered ethanol producers and the isolates P8-2.12, P19-1.1, P21-1.7, P21-2.1, P22-2.20, P22-3.18 and G7-1.4 can be considered xylitol producers.

According to Hou (2012), under aerobic conditions, glucose and xylose consumption occur simultaneously, which does not occur under anaerobic conditions, where xylose consumption begins after glucose depletion. It suggests that *S. passalidarum* may use different xylose transport systems under anaerobic and aerobic conditions.

Cadete et al. (2016), under severe oxygen limitation conditions, obtained ethanol production above 20 g.L<sup>-1</sup> for *S. passalidarum*. Compared with this study, the isolates P16-1.1 (18.04 g.L<sup>-1</sup>), G13-2.1 (18.85 g.L<sup>-1</sup>), G13-3.8 (18.40 g.L<sup>-1</sup>), G14-1.8 (18.68 g.L<sup>-1</sup>), G14-2.2 (17.85 g.L<sup>-1</sup>) and G18-3.7 (17.92 g.L<sup>-1</sup>) were efficient in ethanol production (Figure 3) and better results were obtained when co-fermentation was carried out (up to 24.7 g.L<sup>-1</sup>). The peak of production was 30 h for both fermentation and co-fermentation. The fermentation efficiency (η%) for these isolates varied between 81 and 85.94%. During co-fermentation, a variation of 89-95.44% was obtained

(Table 4), which seems promising. Considering the results of Cadete et al. (2012), who, with *S. passalidarum* in a medium with D-xylose (50 g.L<sup>-1</sup>) as the exclusive carbon source, obtained the maximum ethanol production in 24 h at a temperature of 30°C, with ethanol production ranging from 15 to 18 g.L<sup>-1</sup> ( $Q_p = 0.6$  to  $0.75$  g.L.h<sup>-1</sup>) and fermentation efficiency of approximately 70%. Khoja et al. (2015) found that the optimum yield was achieved in 34°C for *Zymomonas mobilis* with the bioethanol yield being 8.0% (v/v) with a fermentation efficiency of 88.96%. These authors observed that *S. cerevisiae* was suitable for low temperature process while *Z. mobilis* could be used in regions having an elevated-temperature process. In another study, Chibuzor et al. (2016) examined the production of bioethanol from cassava peels and found that the combination of *Rhizopus nigricans*, *Spirogyra africana* and *S. cereviceae* could be suitable for ethanol production, where they obtained the highest ethanol yield of 14.46 g/cm<sup>3</sup> and a concentration of 38% (v/v).

Strains with this profile, as recently reported by Slininger et al. (2015), may help techniques to force the evolution of these wild strains. These authors describe a significant improvement of the strain *Scheffersomyce stipitis* NRRL Y-7124, both for the quantitative ethanol production (55-60 g.L<sup>-1</sup> in the modified strain against 40-45 g.L<sup>-1</sup> in the parent strain) and for tolerance to toxic agents.

Regarding the xylitol producers, isolate P8-2.12 - *S. roraimanensis* was not efficient when compared to that reported by Cadete et al. (2016) for the same species. Our isolate produced 12.25 g.L<sup>-1</sup> of xylitol. The *S. roraimanensis* studied by these authors produced 27.4 g.L<sup>-1</sup>. However, isolates P19-1.1, P21-1.7, P21-2.1, P22-2.19, P22-2.20, P22-3.18 and G7-1.4 showed good xylitol production with 21.66, 19.20, 19.14, 13.60, 17.57, 22.10 and 20.01 g.L<sup>-1</sup> respectively, but during the co-fermentation test good xylitol production was not obtained, in some cases not having any xylitol production (Table 4). Ping et al. (2013) determined the production of xylitol by *Candida tropicalis* using non-detoxified corn hemicellulose hydrolyzate, obtaining a maximum concentration of 38.8 g.L<sup>-1</sup> of xylitol. Among the species studied by Junyapate et al. (2014), *C. tropicalis* produced the highest concentration of xylitol (7.2 g.L<sup>-1</sup>). Cadete et al. (2015) evaluated the production of xylitol from 50 g.L<sup>-1</sup> of xylose from five strains of the species *Cyberlindnera xylosilytica* sp. The maximum production of xylitol was reached in 72 h, which was practically the same among the isolates, with a mean production of 33.02 g.L<sup>-1</sup>. It is considerably higher than the profile of the isolates of the study.

Three isolates (P16-1.1, P21-1.7 and P21-2.1) tolerant to several stress conditions were obtained which are normally encountered in the process of obtaining second-generation ethanol. Good comparative ethanol production from xylose was observed, with apparent potential for larger scale trials or tools for altering these wild strains.

These three isolates, with better performance, were curiously all isolated from the gut of the beetle *Popillius marginatus* (Percheron, 1835). Isolate P16-1.1, identified as *S. passalidarum* had, in particular, considerable potential for subsequent research. This study adds some information and possibly relevant isolates in the search for economically viable production of 2G ethanol, thus reaffirming the interest in the sampling of natural environments to obtain wild strains for bioethanol production. Furthermore, the results suggest that yeast isolated from insect galleries have a higher xylolytic capacity than yeasts isolated from the gut of beetles.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Projeto Universal 2014) (National Council for Scientific and Technological Development) – by the financial support, to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel) for the Master's Degree scholarship to G. de F.L.S. My most sincere thanks to Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca (INPA) for his guidance on insect collection, identification and preservation of specimens to Dr. Rosane Freitas Schwan and to the Department of Biology of the Federal University of Lavras (UFLA) for assistance in molecular identification, and to Dr. Luciano Gomes Fietto and the Laboratory of Molecular Biotechnology of the Federal University of Viçosa (UFV) for the assistance in the fermentation assays.

## REFERENCES

- Ali MN, Khan MM (2014). Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 2:316-324.
- Brat D, Boles E, Wiedemann B (2009). Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2304-2311.
- Cadete RM, Cheab MAM, Santos RO, Safar SVB, Zilli JE, Vital MJS, Basso LC, Lee CF, Kurtzman CP, Lachance MA, Rosa CA (2015). *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from lignocellulosic materials. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65:2968-2974.
- Cadete RM, Heras AM, Sandström AG, Ferreira C, Girio F, Gorwa-Grauslund M-F, Rosa CA, Fonseca C (2016). Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 9(1):167.
- Cadete RM, Melo MA, Dussa NKJ, Rodrigues RCLB, Silva SS, et al (2012). Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS ONE* 7(8):e43135.

- Cadete RM, Santos RO, Melo MA, Mouro A, Gonçalves DL, Stambuk BU, Gomes FC, Lachance MA, Rosa CA (2009). *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. FEMS Yeast Res. 9:1338-1342.
- Caggia C, Restuccia C, Pulvirenti A, Giudici P (2001). Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. Int. J. Food Microbiol. 71:71-73.
- Carvalho W, Silva SS, Vitolo M, Felipe MGA, Mancilha IM (2002). Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated batch immobilized cell system. Z. Naturforsch. C 57:109-112.
- Chibuzor O, Uyoh EA, Igile G (2016). Bioethanol production from cassava peels using different microbial inoculants. Afr. J. Biotechnol. 15(30):1608-1612.
- Costa AD, Souza CJA, Costa OS, Rodrigues MQRB, Santos AFS, Lopes MR, Genier HLAG, Wendel B, Silveira WB, Fietto LG (2014). Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98:3829-3840.
- Doran-Peterson J, Cook DM, Brandon SK (2008). Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. Plant J. 54(4):582-592.
- Dubey R, Jakeer S, Gaur NA (2016). Screening of natural yeast isolates under the effects of stresses associated with second generation biofuel production. J. Biosci. Bioeng. 121(5):509-516.
- Ebabi AM, Adekunle AA, Okunowo WO, Osuntoki AA (2013). Isolation and characterization of yeast strains from local food crops. J. Yeast Fungal Res. 4(4):38-43.
- Golinski MR, Boecklen JW, Dawe AL (2008). Two-dimensional fractal growth properties of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*: the effects of hypovirus infection. J. Basic Microbiol. 48:426-429.
- Gouliamova DE, Dimitrov RA, Smith MT, Groenewald M, Stoilova-Disheva MM, Guéorguiev BV, Boekhout T (2015). DNA barcoding revealed *Nematodospora valgi* gen. nov., sp. nov. and *Candida cetoniae* sp. nov. in the *Lodderomyces* clade. Fungal Biol. 120(2):179-190.
- Guo X, Zhang R, Li Z, Dai D, Li C, Zhou X (2013). A novel pathway construction in *Candida tropicalis* for direct xylitol conversion from corncob xylan. Bioresour. Technol. 128:547-552.
- Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G (2006). Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 24(12):549-556.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:937-953.
- Hou X (2012). Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 94:205-214.
- Hu X, Li M, Chen H (2015). Community structure of gut fungi during different developmental stages of the Chinese white pine beetle (*Dendroctonus armandi*). Sci. Rep. 5:8411.
- Joelsson E, Erdei B, Galbe M, Wallberg O (2016). Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. Biotechnol. Biofuels 9:1.
- Junyapate K, Jindamorakot S, Limtong S (2014). *Yamadazyma ubonensis* f.a., sp. nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. Antonie Van Leeuwenhoek 105:471-480.
- Khoja AH, Ali E, Zafar K, Ansari AA, Nawar A, Qayyum M (2015). Comparative study of bioethanol production from sugarcane molasses by using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Afr. J. Biotechnol. 14(31):2455-2462.
- Kumari R, Pramanik K (2012). Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. J. Biosci. Bioeng. 114(6):622-629.
- Li H, Wu M, Xu L, Hou J, Guo T, Bao X, Shen Y (2015). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. Microb. Biotechnol. 8:266-274.
- Li Z, Qu H, Li C, Zhou X (2013). Direct and efficient xylitol production from xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through transcriptional level and fermentation processing optimizations. Bioresour. Technol. 149:413-419.
- Morais CG, Cadete RM, Uetanabaro APT, Rosa LH, Lachance MA, Rosa CA (2013). D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. Fungal Genet. Biol. 60:19-28.
- Ping Y, Ling HZ, Song G, Ge JP (2013). Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. Biochem. Eng. J. 75:86-91.
- Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. FEMS Yeast Res. 15(6):fov053.
- Ravella RS, Donovan N, James SA, Shivaji S, Arunasri K, Bond CJ, Roberts IN, Hobbs PJ (2011). *Candida northwykensis* sp. nov., a novel yeast isolated from the gut of the click beetle *Melanotus villosus*. Curr. Microbiol. 63(2):115-120.
- Rivera FN, González E, Gómez Z, López N, Hernández-Rodríguez C, Berkov A, Zúñiga G (2009). Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Biol. J. Linn. Soc. 98(2):325-342.
- Sena LM, Morais CG, Lopes MR, Santos RO, Uetanabaro AP, Morais PB, Vitsl MJ, de Morais MA Jr, Lachance MA, Rosa CA (2016). D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. Antonie van Leeuwenhoek 110(1):53-67.
- Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, Valente P (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. Braz. Arch. Biol. Technol. 55(2):319-327.
- Slininger PJ, Shea-Andersh MA, Thompson SR, Dien BS, Kurtzman CP, Balan V, Sousa LC, Uppugundla N, Dale BE, Cotta MA (2015). Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid- and base-pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. Biotechnol. Biofuels 8(60):1-27.
- Slininger PJ, Shea-Andersh MA, Thompson SR, Dien BS, Kurtzman CP, Sousa LD, Balan V (2016). Techniques for the evolution of robust pentose-fermenting yeast for bioconversion of lignocellulose to ethanol. J. Vis. Exp. 116:e54227.
- Suh SO, Blackwell M (2004). Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. FEMS Yeast Res. 5(1):87-95.
- Suh SO, Marshall CJ, Mchugh JV, Blackwell M (2003). Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. Mol. Ecol. 12:3137-3145.
- Suh SO, Mchugh JV, Pollock DD, Blackwell M (2006). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. Mycol. Res. 109:261-265.
- Tanahashi M, Kubota K, Matsushita N, Togashi K (2010). Discovery of mycangia and the associated xylose-fermenting yeasts in stag beetles (Coleoptera: Lucanidae). Naturwissenschaften 97(3):311-317.
- Tao N, Gao Y, Liu Y (2011). Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: a promising candidate for bioethanol production. Braz. J. Microbiol. 42(2):668-675.
- Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Göbel UB, Adam T (2004). Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. J. Microbiol. Methods 56(2):201-211.
- Urbina H, Schuster J, Blackwell M (2013). The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. Fungal Ecol. 6(5):339-355.
- Young E, Lee SM, Alper H (2010). Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. Biotechnol. Biofuels 3(24):1-12.
- Zhang B, Zhang J, Wang D, Han R, Ding R, Gao X, Sun L, Hong J (2016). Simultaneous fermentation of glucose and xylose at elevated temperatures co-produces ethanol and xylitol through overexpression of a xylose-specific transporter in engineered *Kluyveromyces marxianus*. Bioresour. Technol. 216:227-237.

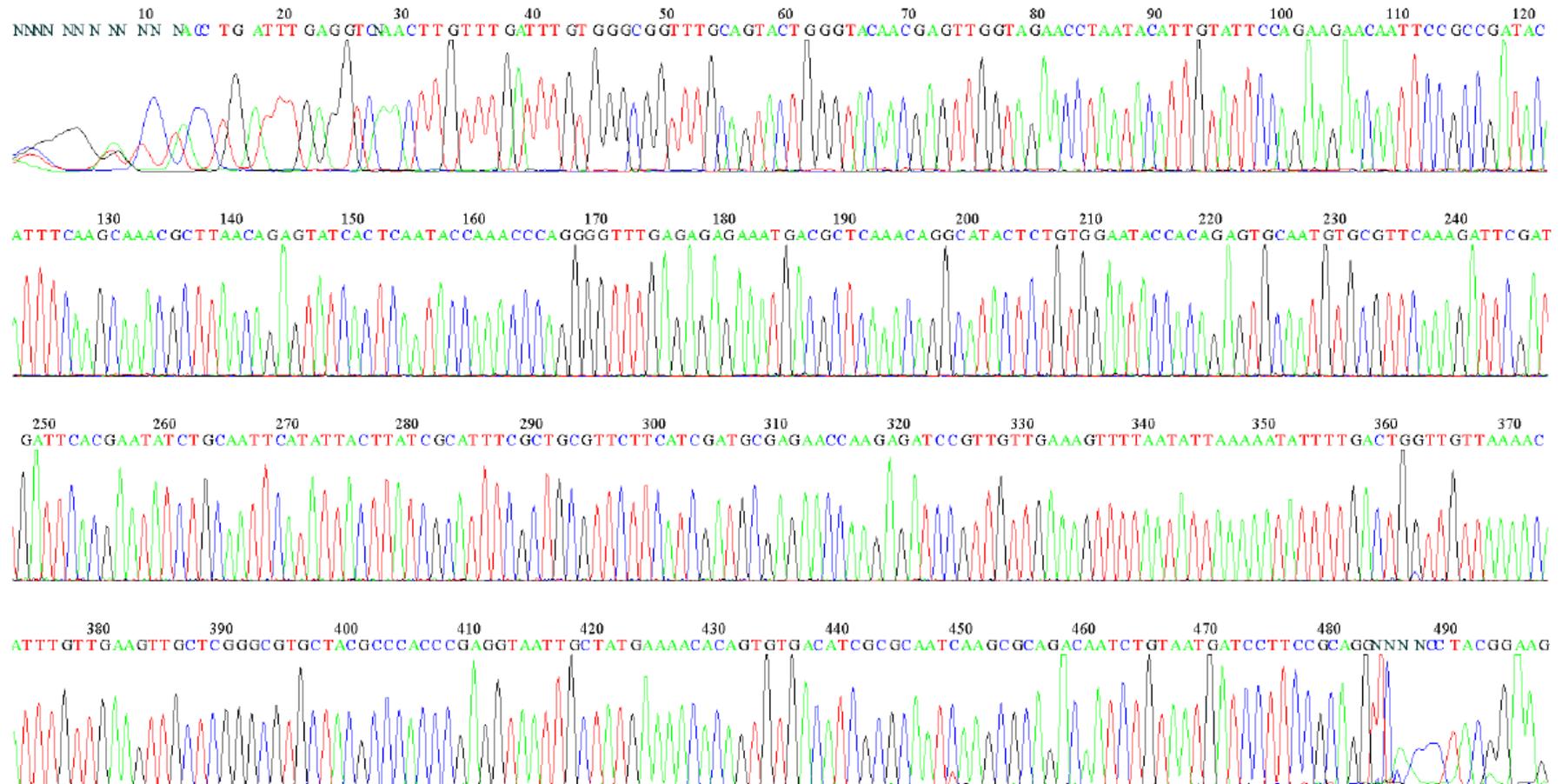
**II – Sequencias ITS 1 e ITS 4 dos isolados: P8-2.12 (*Spathaspora roraimanensis*); P16-1.1 (*Spathaspora passlidarum*) e P19-1.1 Espécie não identificada.**





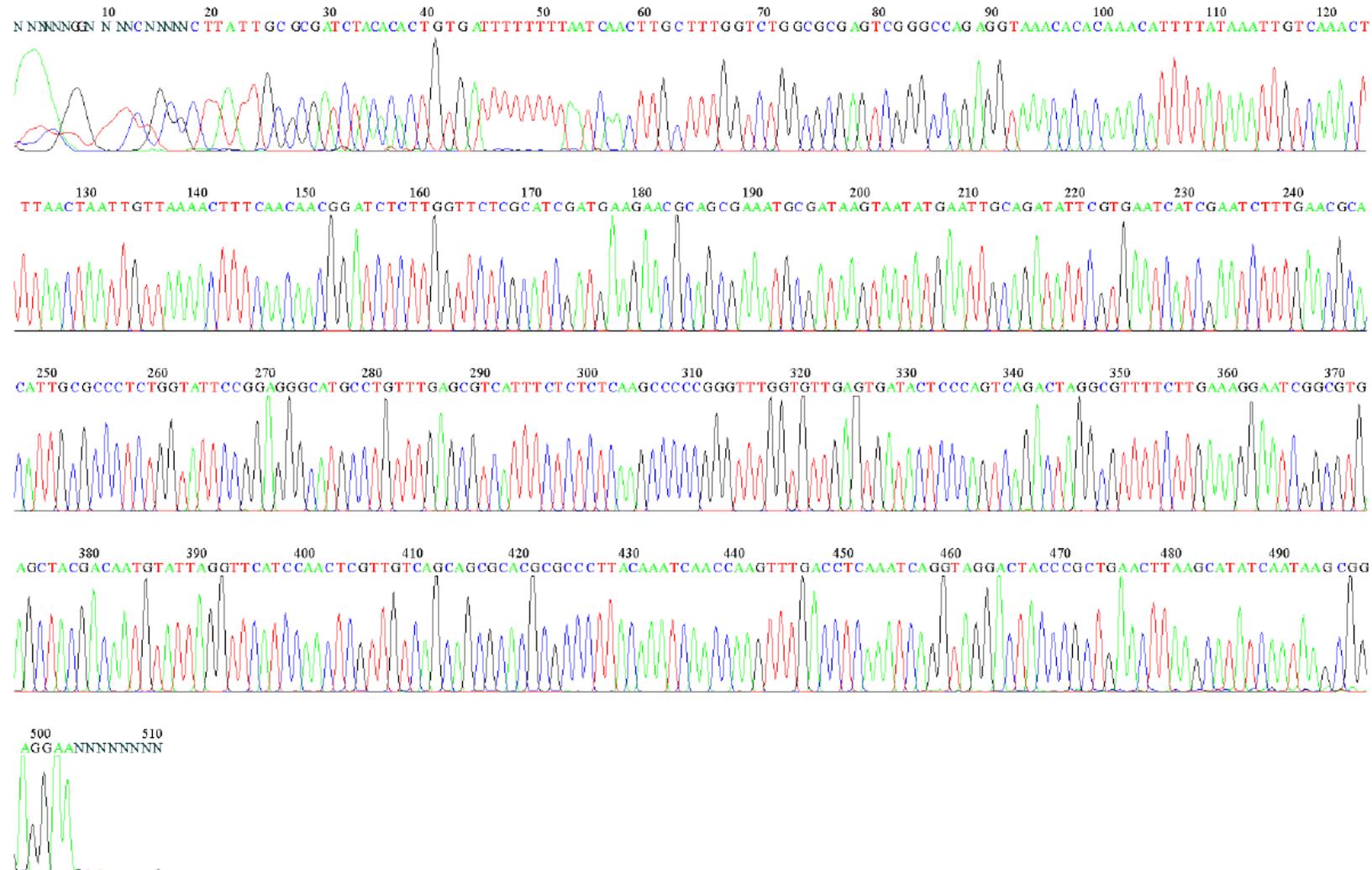
P8-2.12 (*Spathaspora roraimanensis*) – ITS 4

File: A\_ITS4.ab1 Run Ended: 2016/6/22 7:47:18 Signal G:1848 A:3036 C:3157 T:3764  
 Sample: A\_ITS4 Lane: 19 Base spacing: 15.291015 498 bases in 6017 scans Page 1 of 1



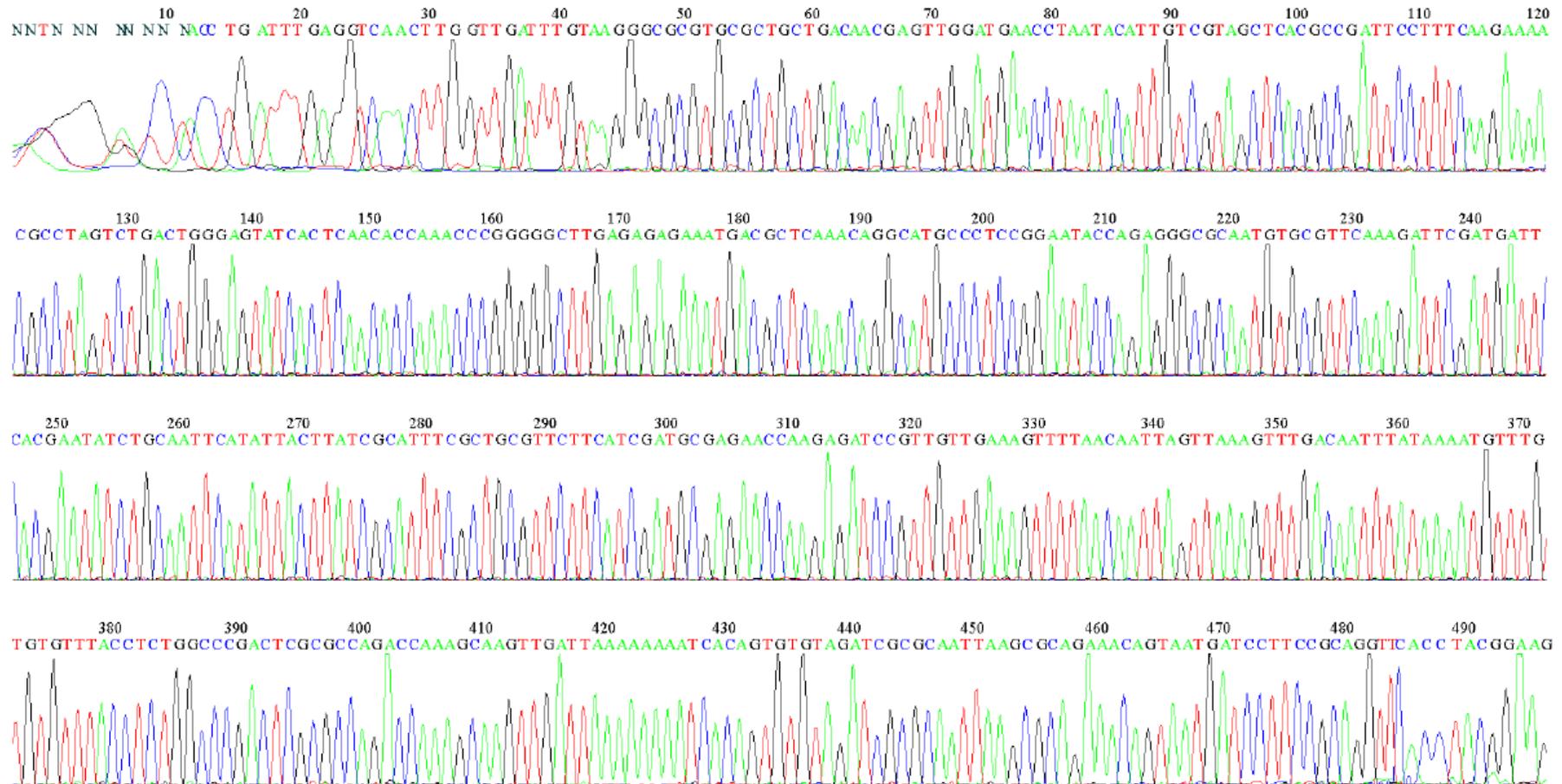
## P16-1.1 (*Spathaspora passlidarum*) – ITS 1

File: B ITS1.ab1 Run Ended: 2016/6/22 7:47:18 Signal G:330 A:400 C:458 T:492  
 Sample: B ITS1 Lane: 17 Base spacing: 15.366368 511 bases in 6161 scans Page 1 of 1



## P16-1.1 (*Spathaspora passlidarum*) – ITS 4

File: B ITS4.ab1 Run Ended: 2016/6/22 7:47:18 Signal G:1078 A:1475 C:1699 T:1620  
 Sample: B ITS4 Lane: 32 Base spacing: 15.362183 497 bases in 6021 scans Page 1 of 1



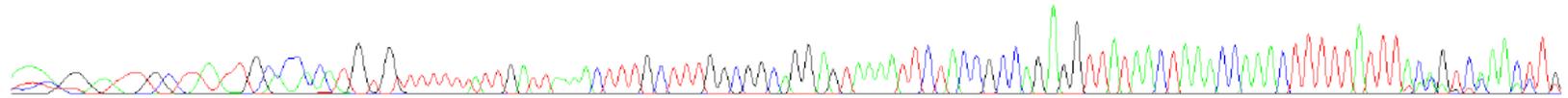
# P19-1.1 Espécie não identificada – ITS 1



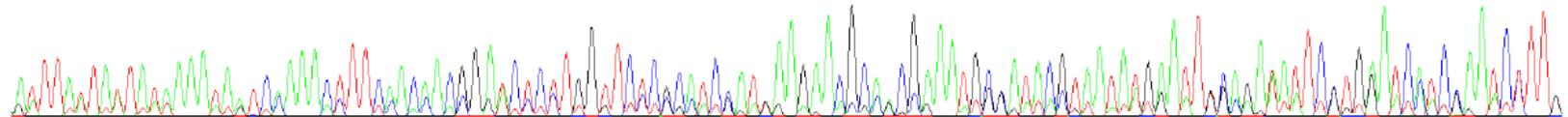
File: C ITS1.ab1 Run Ended: 2016/6/22 7:47:18 Signal G:796 A:1355 C:1363 T:1856  
Sample: C ITS1 Lane: 30 Base spacing: 15.216709 524 bases in 6209 scans Page 1 of 1



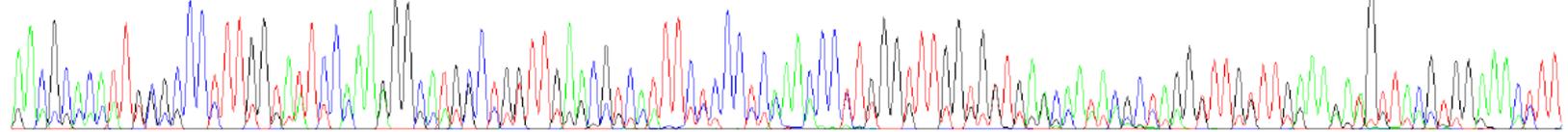
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
NNNN NN NN GC TTN TN GCACNCA TGTGTTTTTTTNTTGATTAAACTTTGCTTTGGCGGCGAGGTAAAATTCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAACCAAACCTTTTATTTACAGTCCAACCTTG



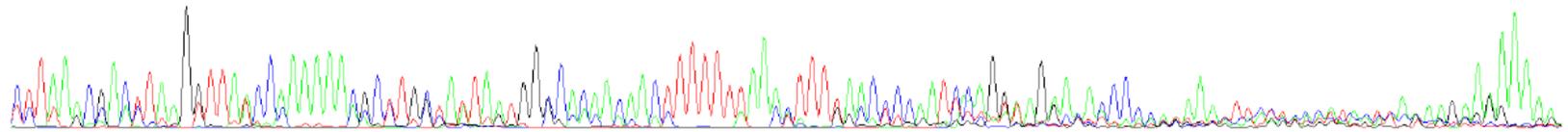
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250  
ATTTATTTATATAAAATAATCCAACCTTTCAACAA CGGATCTCTTGGTTCTCCATCCATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAAAANTTCCTGAATCATCCAATCTTTG



260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
AACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCCAAGGGCATGCCTGGTTGAACGTCCTTTCCCCCCNAAACCCTGGGTTTGGTGTGAGCAATACGCTAGGTTTGTGAAAAAAGTTACGTGGAAACTTT



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
TTTAAACGACTTAAAGTTATCCA AAAACGCTTGNNAATTAATGGGCACAACAACCTTTTAAACTTTTAAACCCCAATCCAAGNAGNCACCCCATAAATTTCTNNNNNACTNAGAAGANGAAAAAN



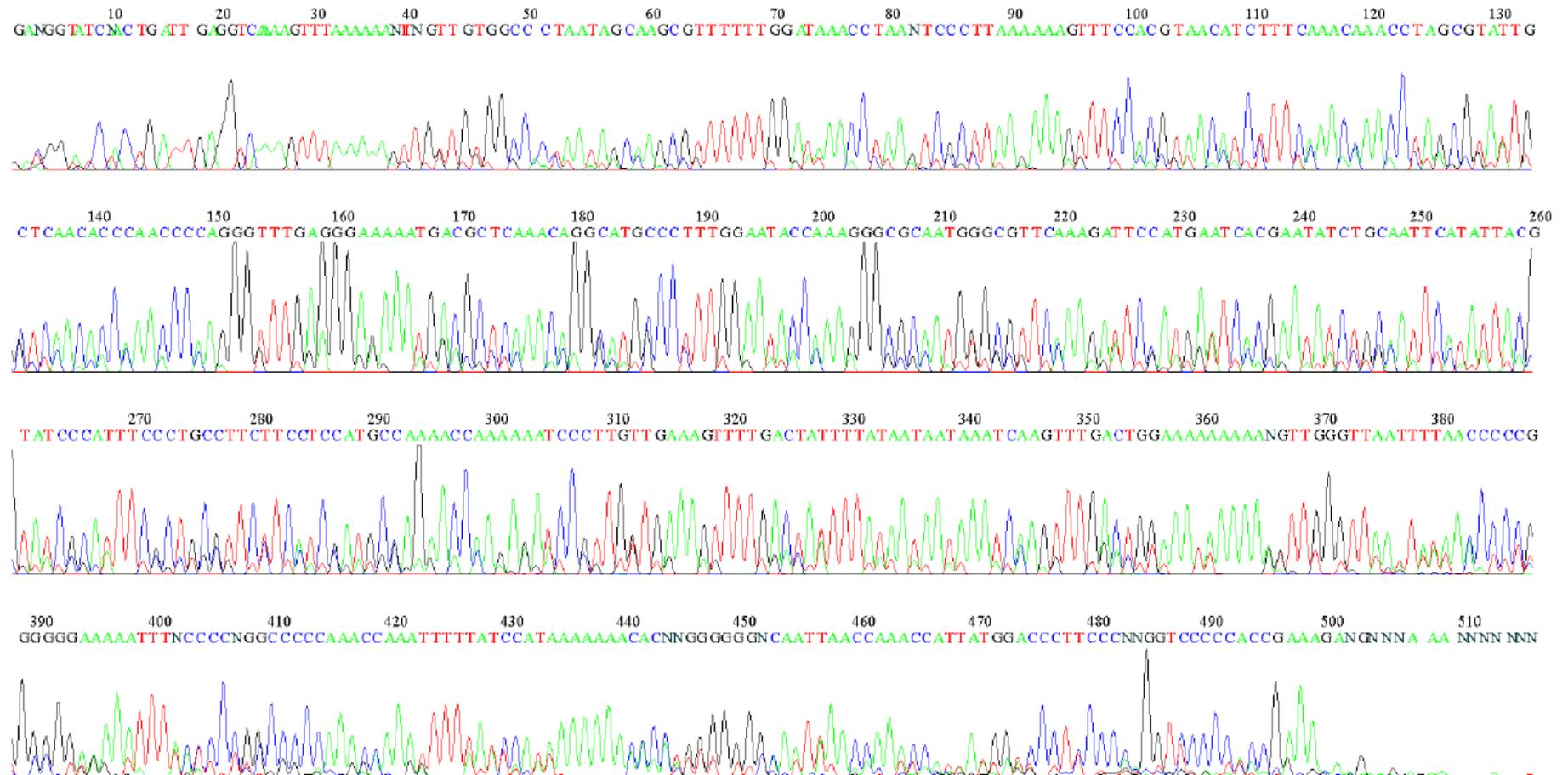
510 520  
NGTNNNN AN NNNNCGTNN



## P19-1.1 Espécie não identificada – ITS 4

File: C ITS4.ab1 Run Ended: 2016/6/22 7:47:18 Signal G: 909 A: 1574 C: 1817 T: 2166

Sample: C ITS4 Lane: 28 Base spacing: 15.121923 516 bases in 6002 scans Page 1 of 1



### III – Cromatogramas dos isolados que apresentaram pico de produção de etanol e xilitol.

#### 1. Pico de etanol do isolado P16-1.1 após 30h de fermentação



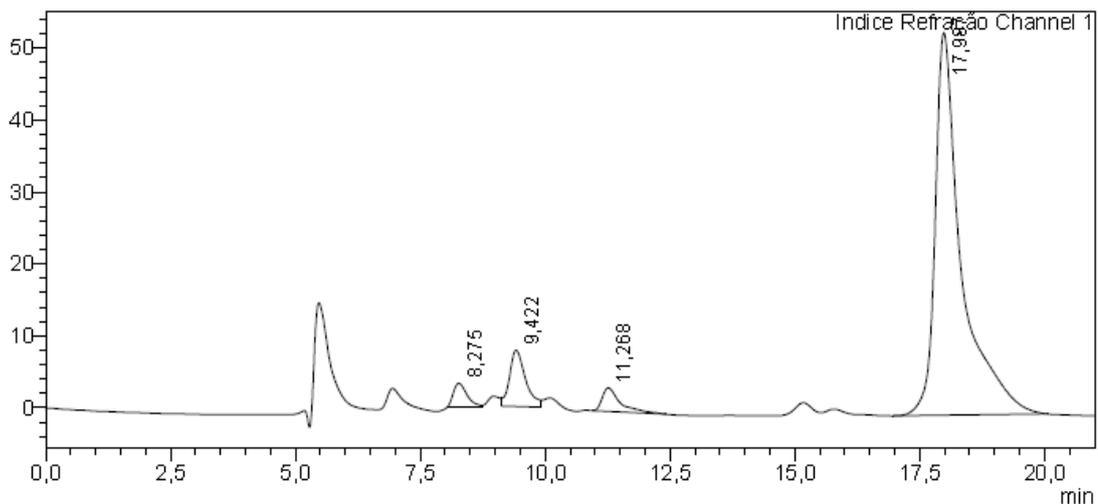
## Analysis Report

### <Sample Information>

Sample Name : 70  
 Sample ID : 70  
 Data Filename : 70.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-70  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 19:37:41  
 Date Processed : 10/07/2016 11:05:28  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

### <Chromatogram>

mV



### <Peak Table>

Indíce Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,275	64539	3341	2,838		M	
2	9,422	174735	7829	7,684		M	
3	11,268	83020	3274	3,651		M	
4	17,987	1951869	53170	85,828		M	
Total		2274164	67613				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 2. Pico de etanol do isolado G13-2.1 após 30h de fermentação



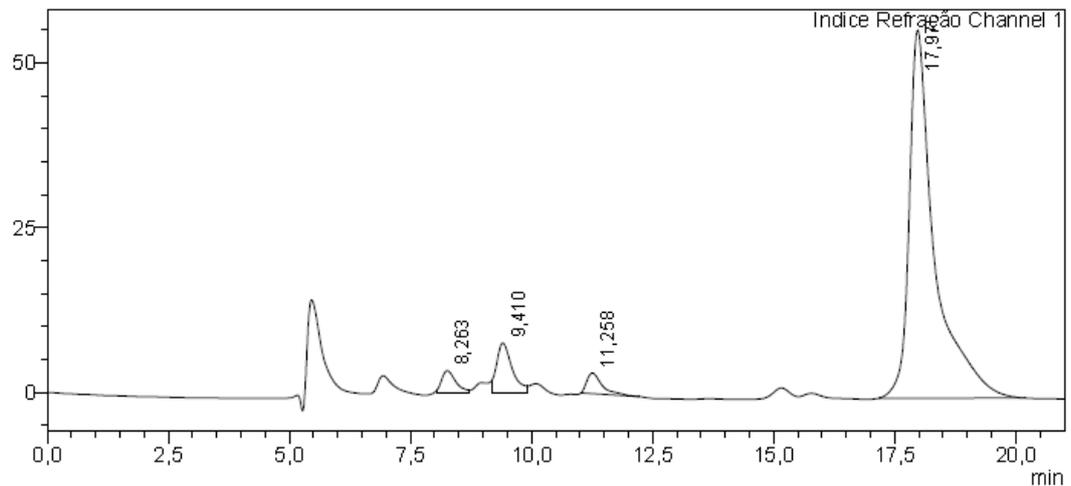
# Analysis Report

**<Sample Information>**

Sample Name	: 77	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: 77	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: 77.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm		
Batch Filename	: 080716.lcb		
Vial #	: 1-77		
Injection Volume	: 100 uL		
Date Acquired	: 07/07/2016 22:08:20		
Date Processed	: 10/07/2016 11:14:30		

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,263	65540	3282	2,801		M	
2	9,410	166175	7473	7,102		M	
3	11,258	69039	3130	2,950		M	
4	17,976	2039235	55814	87,147		M	
Total		2339988	69698				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 3. Pico de etanol do isolado G13-2.8 após 30h de fermentação



# Analysis Report

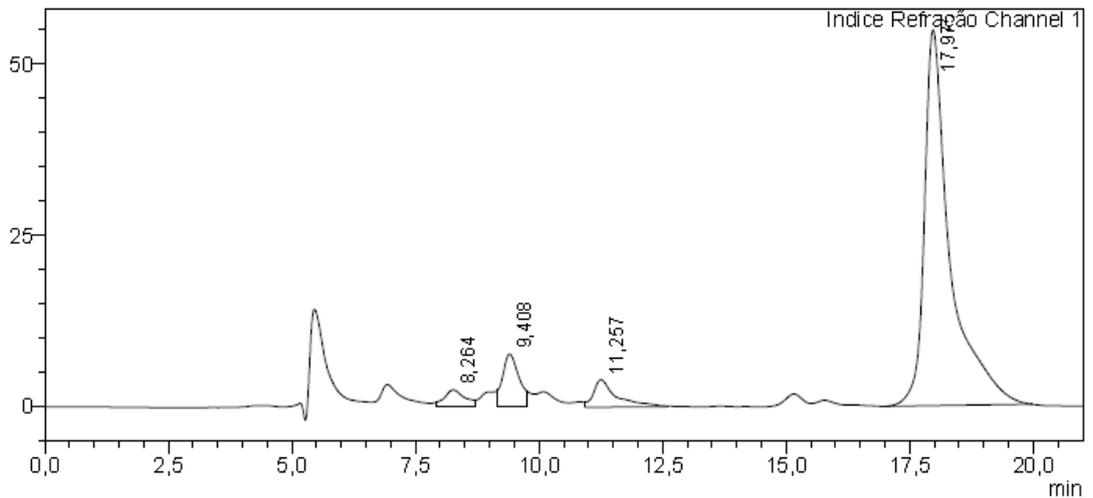
**<Sample Information>**

Sample Name : 78  
 Sample ID : 78  
 Data Filename : 78.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-78  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 22:29:51  
 Date Processed : 10/07/2016 11:15:46

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,264	69922	2438	2,959		M	
2	9,408	172362	7680	7,295		M	
3	11,257	129988	4020	5,502		M	
4	17,975	1990411	54840	84,244		M	
Total		2362683	68978				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 4. Pico de etanol do isolado G14-1.8 após 30h de fermentação



## Analysis Report

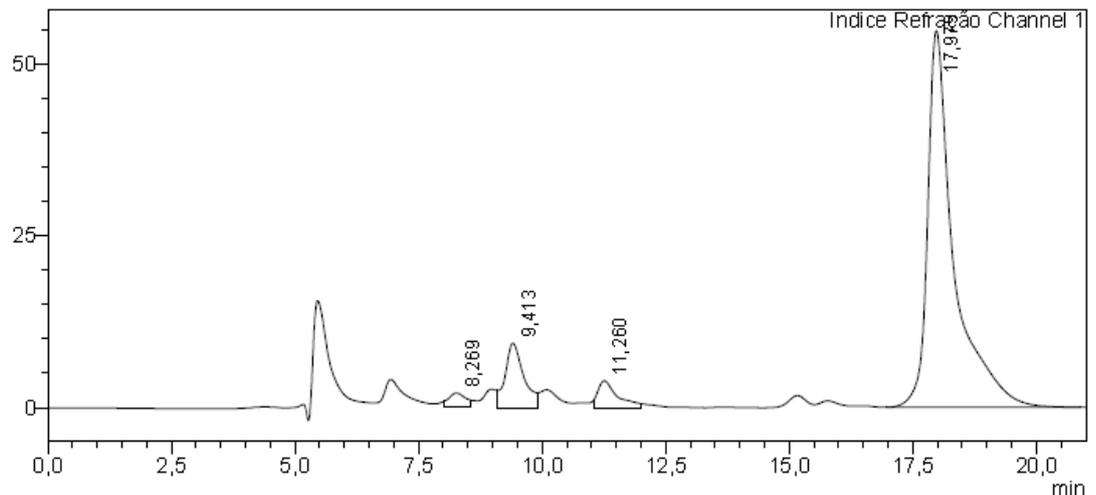
## &lt;Sample Information&gt;

Sample Name : 79  
 Sample ID : 79  
 Data Filename : 79.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-79  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 22:51:20  
 Date Processed : 10/07/2016 11:17:05

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## &lt;Chromatogram&gt;

mV



## &lt;Peak Table&gt;

Índice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,269	45712	1980	1,890		M	
2	9,413	242833	9398	10,039		M	
3	11,260	109912	3931	4,544		M	
4	17,979	2020424	54722	83,527			
Total		2418881	70030				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

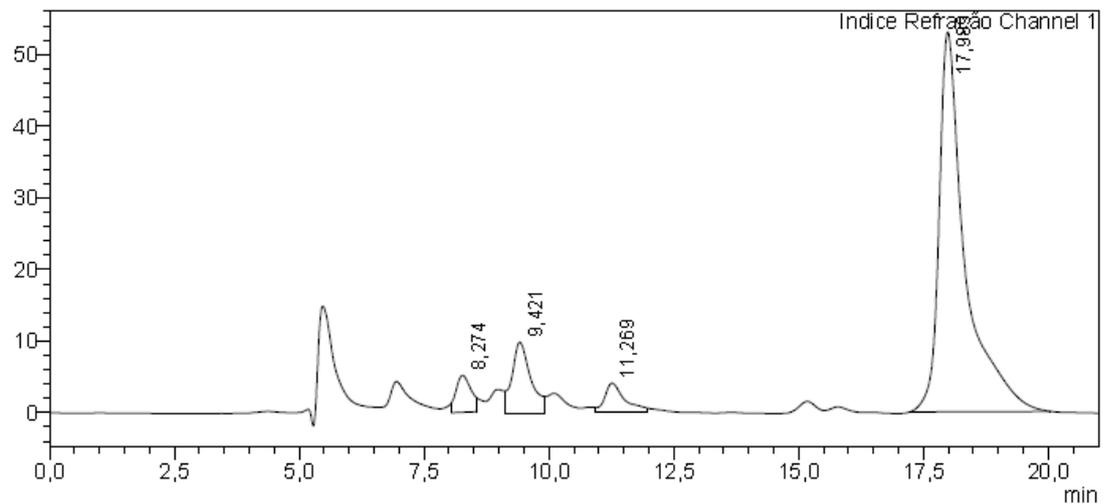
## 5. Pico de etanol do isolado G14-2.2 após 30h de fermentação


**<Sample Information>**

Sample Name : 80  
 Sample ID : 80  
 Data Filename : 80.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-80  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 23:12:50  
 Date Processed : 10/07/2016 11:18:48  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,274	110405	5167	4,570		M	
2	9,421	265992	10051	11,011		M	
3	11,269	108545	3972	4,493		M	
4	17,989	1930771	53007	79,925		M	
Total		2415714	72197				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

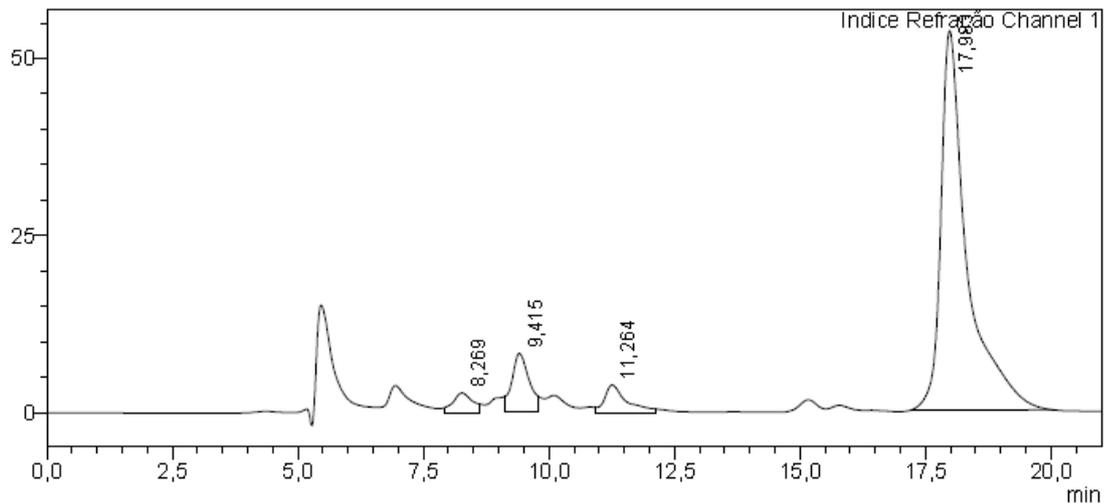
## 6. Pico de etanol do isolado G18-3.7 após 30h de fermentação


**<Sample Information>**

Sample Name : 81  
 Sample ID : 81  
 Data Filename : 81.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-81  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 23:34:21  
 Date Processed : 10/07/2016 11:20:57  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,269	75561	2782	3,243		M	
2	9,415	197094	8254	8,459		M	
3	11,264	119187	3899	5,115		M	
4	17,983	1938166	53508	83,183		M	
Total		2330008	68442				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 7. Pico de etanol do isolado P16-1.1 após 30h de cofermentação



# Analysis Report

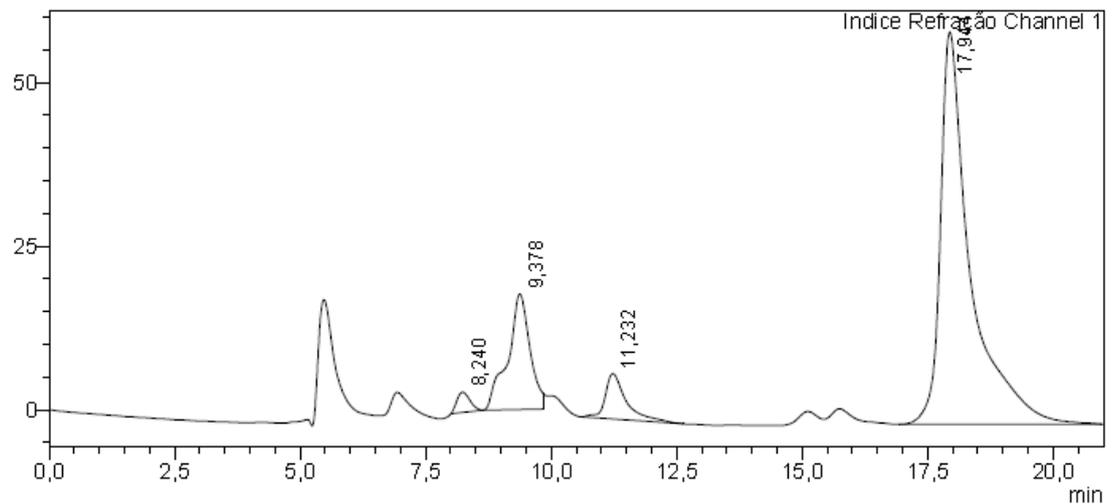
**<Sample Information>**

Sample Name : CO2T30  
 Sample ID : CO2T30  
 Data Filename : CO2T30.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 080716.lcb  
 Vial # : 1-57  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 09/07/2016 05:54:48  
 Date Processed : 09/07/2016 17:29:38

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,240	56079	3094	1,712		M	
2	9,378	543360	17679	16,587		M	
3	11,232	200863	6939	6,132			
4	17,944	2475528	59886	75,569			
Total		3275829	87599				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 8. Pico de etanol do isolado G13-2.1 após 30h de cofermentação



## Analysis Report

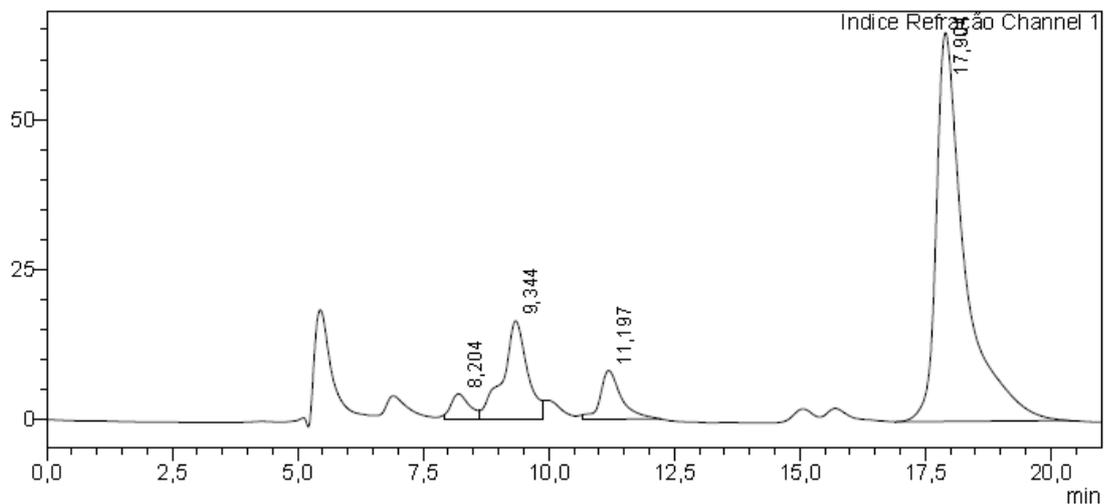
## &lt;Sample Information&gt;

Sample Name : CO12T30  
 Sample ID : CO12T30  
 Data Filename : CO12T30.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 090716.lcb  
 Vial # : 1-63  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 10/07/2016 11:33:57  
 Date Processed : 10/07/2016 13:39:43

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## &lt;Chromatogram&gt;

mV



## &lt;Peak Table&gt;

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,204	109666	4246	3,147		M	
2	9,344	560601	16404	16,086		M	
3	11,197	237160	8110	6,805		M	
4	17,904	2577554	64743	73,962		M	
Total		3484981	93502				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 9. Pico de etanol do isolado G13-2.8 após 30h de cofermentação



# Analysis Report

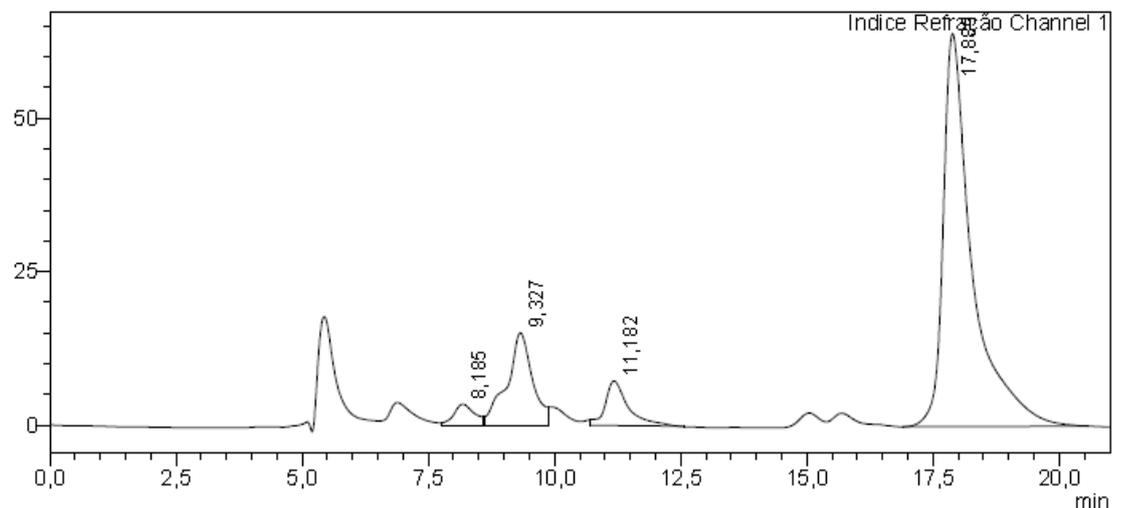
**<Sample Information>**

Sample Name : CO13T30  
 Sample ID : CO13T30  
 Data Filename : CO13T30.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 090716.lcb  
 Vial # : 1-71  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 10/07/2016 14:25:58  
 Date Processed : 10/07/2016 17:42:30

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Índice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,185	97413	3425	2,848		M	
2	9,327	530154	15038	15,501		M	
3	11,182	227916	7229	6,864		M	
4	17,889	2564714	64035	74,987		M	
Total		3420198	89727				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 10. Pico de etanol do isolado G14-1.8 após 30h de cofermentação

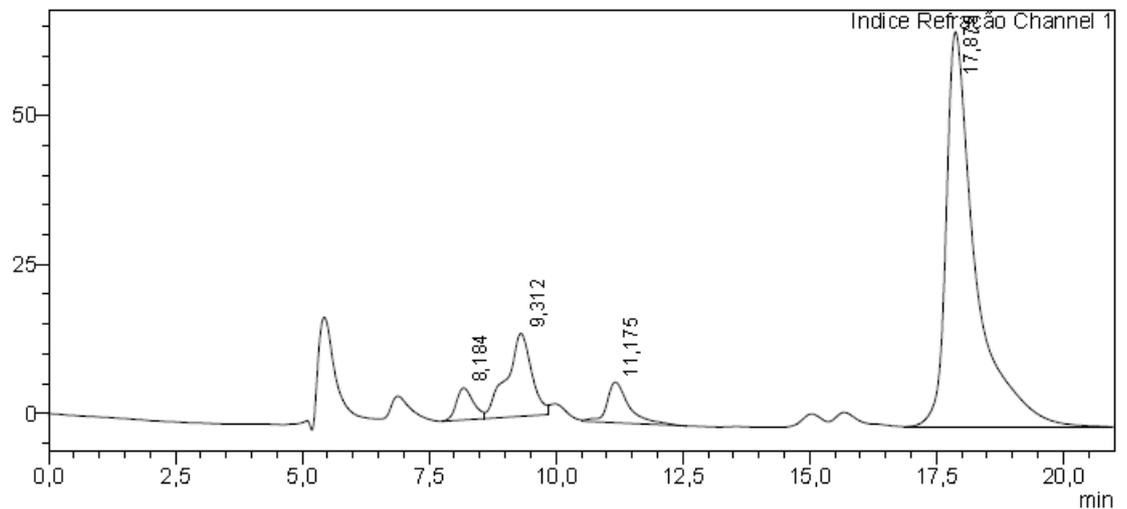

**<Sample Information>**

Sample Name : CO14T30  
 Sample ID : CO14T30  
 Data Filename : CO14T30.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 090716.lcb  
 Vial # : 1-79  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 10/07/2016 17:18:04  
 Date Processed : 10/07/2016 17:53:47

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Índice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,184	125599	5330	3,603			
2	9,312	478858	13867	13,735		V M	
3	11,175	207284	6816	5,946		M	
4	17,879	2674553	66208	76,716			
Total		3486295	92221				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 11. Pico de etanol do isolado G14-2.2 após 30h de cofermentação



## Analysis Report

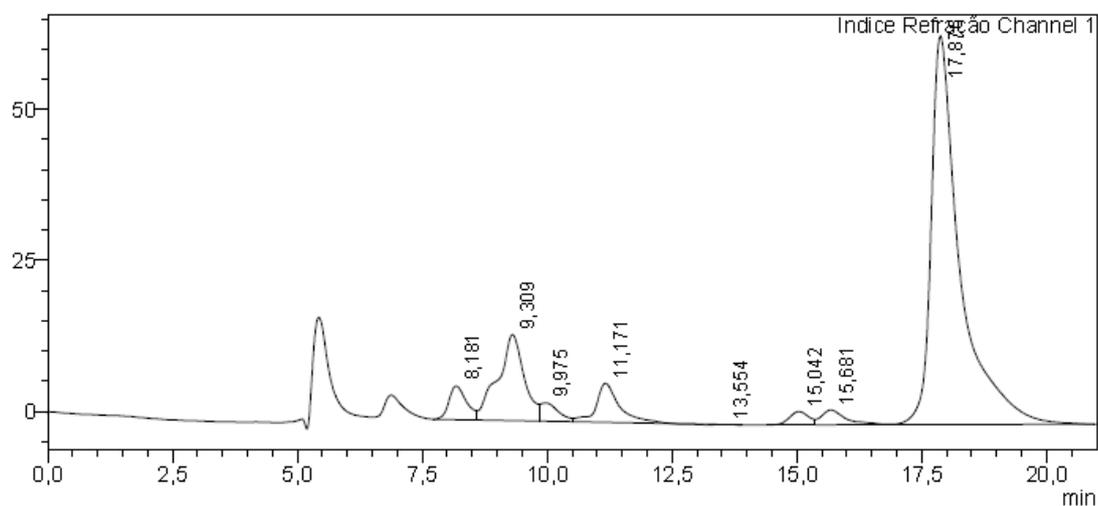
## &lt;Sample Information&gt;

Sample Name : CO15T30  
 Sample ID : CO15T30  
 Data Filename : CO15T30.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 100716.lcb  
 Vial # : 1-7  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 10/07/2016 20:55:00  
 Date Processed : 13/07/2016 10:28:50

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## &lt;Chromatogram&gt;

mV



## &lt;Peak Table&gt;

Índice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,181	137542	5568	3,734			
2	9,309	523223	14255	14,204		V	
3	9,975	77607	3046	2,107		V	
4	11,171	207460	6459	5,632		SV	
5	13,554	1354	65	0,037		T	
6	15,042	59252	2210	1,608			
7	15,681	84080	2446	2,282		V	
8	17,876	2593237	64326	70,397		V	
Total		3683755	98374				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 12. Pico de etanol do isolado G18-3.7 após 30h de cofermentação



## Analysis Report

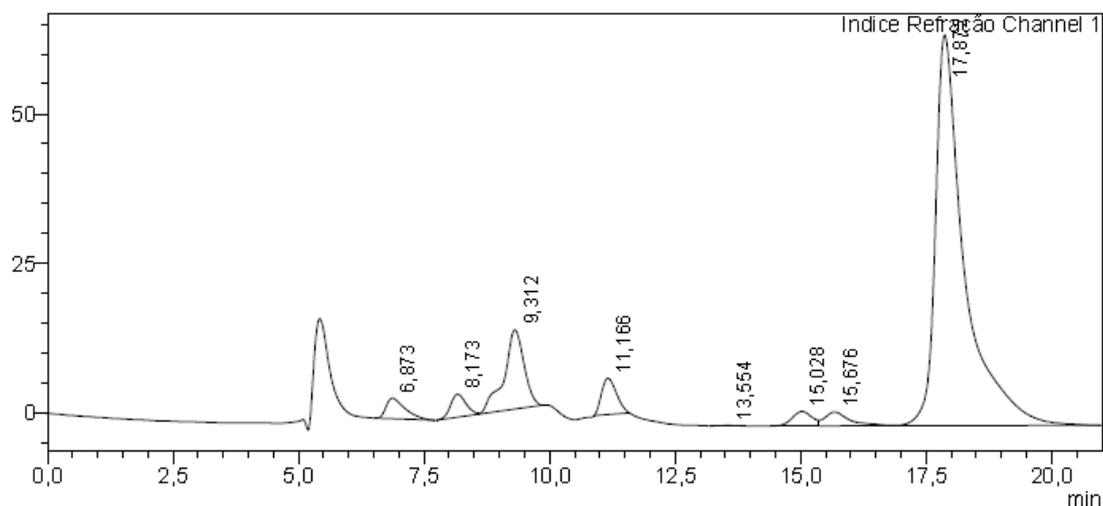
## &lt;Sample Information&gt;

Sample Name : CO18T30  
 Sample ID : CO18T30  
 Data Filename : CO18T30.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 100718.lcb  
 Vial # : 1-15  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 10/07/2016 23:47:15  
 Date Processed : 13/07/2016 10:34:07

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## &lt;Chromatogram&gt;

mV



## &lt;Peak Table&gt;

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	6,873	89631	3428	2,605			
2	8,173	81948	3837	2,381			
3	9,312	370882	13232	10,772		V	
4	11,166	125114	6036	3,636		M	
5	13,554	1330	65	0,039			
6	15,028	66216	2413	1,924			
7	15,676	80325	2328	2,334		V	
8	17,872	2625992	65220	76,310		V	
Total		3441238	96559				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 13. Pico de xilitol do isolado P8-2.12 após 20h de fermentação



# Analysis Report

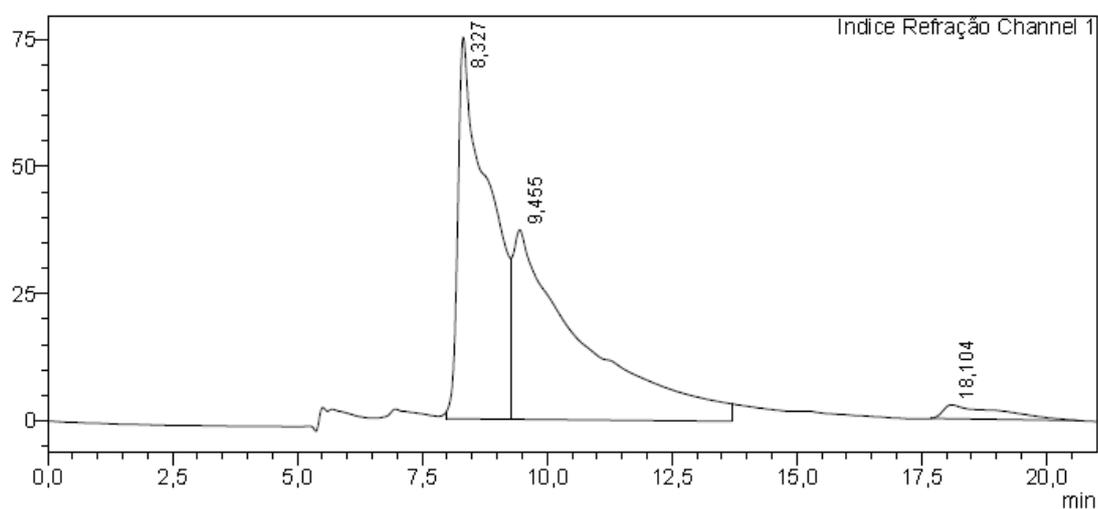
**<Sample Information>**

Sample Name : 58  
 Sample ID : 56  
 Data Filename : 58.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-56  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 14:36:30  
 Date Processed : 10/07/2016 10:48:09

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**<Chromatogram>**

mV

**<Peak Table>**

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,327	3267165	74849	46,355		M	
2	9,455	3559910	37160	50,509		V M	
3	18,104	221055	2731	3,136		M	
Total		7048131	114740				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 14. Pico de xilitol do isolado P19-1.1 após 40h de fermentação



# Analysis Report

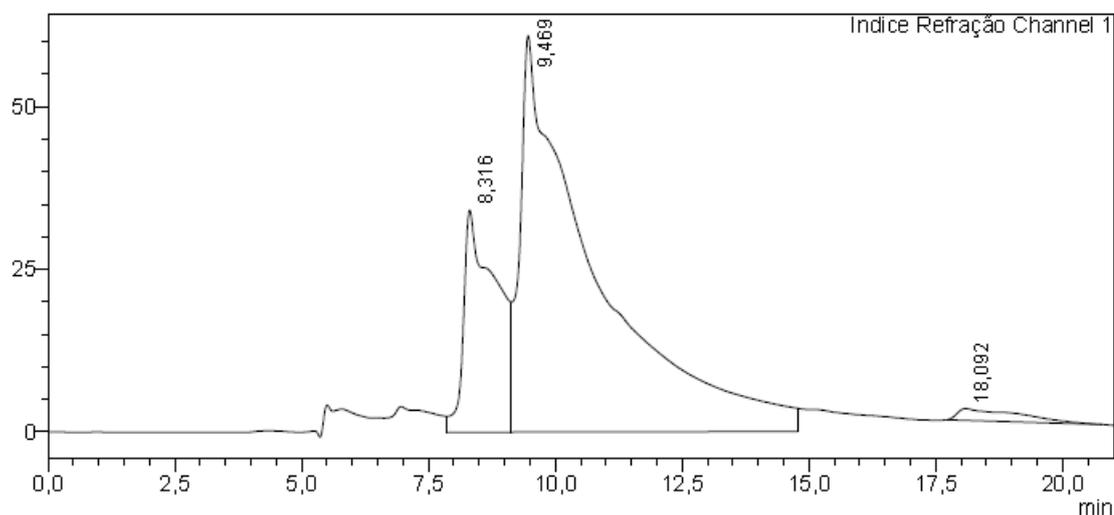
## <Sample Information>

Sample Name : 84  
 Sample ID : 84  
 Data Filename : 84.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-84  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 08/07/2016 00:38:55  
 Date Processed : 10/07/2016 11:24:43

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

mV



## <Peak Table>

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,316	1530173	34165	19,472		M	
2	9,469	6169282	60963	78,508		V M	
3	18,092	158701	1825	2,020		M	
Total		7858157	96953				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 15. Pico de xilitol do isolado P21-1.7 após 40h de fermentação



# Analysis Report

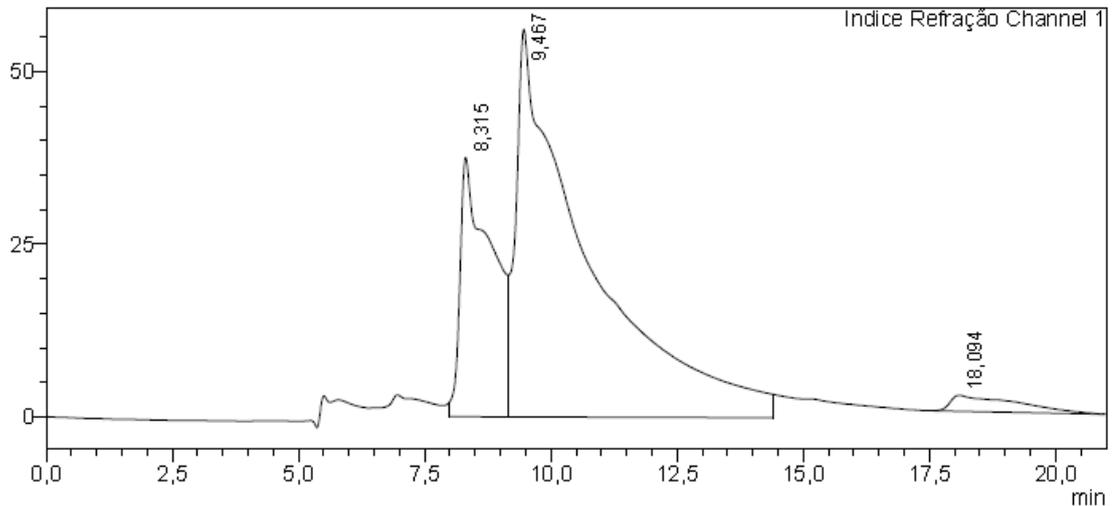
## <Sample Information>

Sample Name : 85  
 Sample ID : 85  
 Data Filename : 85.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-85  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 08/07/2016 01:00:25  
 Date Processed : 10/07/2016 11:25:14

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

mV



## <Peak Table>

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,315	1626985	37574	22,198		M	
2	9,467	5488124	56137	74,877		V M	
3	18,094	214371	2316	2,925			
Total		7329480	96028				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## 16. Pico de xilitol do isolado P21-2.1 após 30h de fermentação



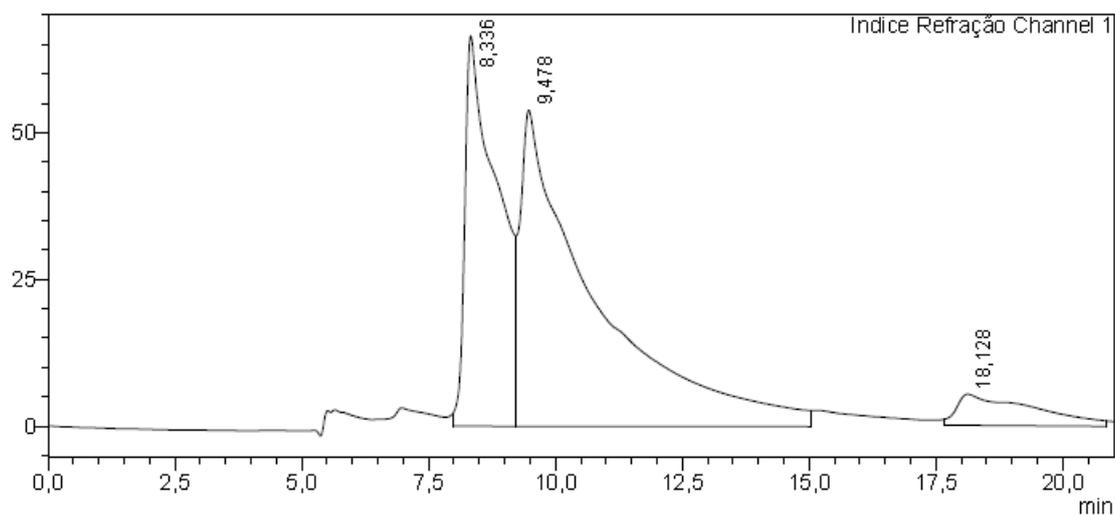
## Analysis Report

## &lt;Sample Information&gt;

Sample Name : 73  
 Sample ID : 73  
 Data Filename : 73.lcd  
 Method Filename : Luciano final NÃO MODIFICAR.lcm  
 Batch Filename : 060716.lcb  
 Vial # : 1-73  
 Injection Volume : 100 uL  
 Date Acquired : 07/07/2016 20:42:15  
 Date Processed : 10/07/2016 11:08:58  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## &lt;Chromatogram&gt;

mV



## &lt;Peak Table&gt;

Indice Refração Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,336	2944255	66482	32,799		M	
2	9,478	5472013	53878	60,958		V M	
3	18,128	560439	5319	6,243		M	
Total		8976707	125680				

UV-VIS 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							