

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isolamento e identificação de leveduras
fermentadoras de D-xilose e produtoras de
xilanases associadas à madeira em
decomposição de dois ecossistemas de Mata
Atlântica

Camila Gontijo de Moraes

Belo Horizonte
2013

Camila Gontijo de Moraes

Isolamento e identificação de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de xilanases associadas à madeira em decomposição de dois ecossistemas de Mata Atlântica

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2013

Agradecimentos

Amor substantivo não existe. O que existe é amar, o verbo.

Agradeço a Deus pela vida e pelo cuidado que sempre teve comigo. Aos meus pais por me ensinarem a amar, sonhar e lutar com honra e dignidade. Também por exorcizarem meus medos e construírem comigo um lar de confiança, respeito e paz. Aos meus tios e avós, guias de sabedoria e fé. Especialmente tio Tomaz e tia Elzira que me acolheram com tanto carinho e ao tio Marcelo que me faz lembrar todos os dias o valor da vida, da alegria e da entrega. Aos meus primos-irmãos e às minhas primas-irmãs por estarem sempre juntinhos de mim, compartilhando alegrias e tristezas, lutas e vitórias. Ao Marcelo por todo carinho, amor, apoio e paciência. Enfim, a toda minha família, que me ensinou a ver a vida com mais poesia, a chorar de tanto achar bonito, a respeitar as diferenças e, principalmente, que o amor constrói e nos move em direção ao que realmente importa na vida. Aos meus amigos por me ouvirem, acolher e fazer com que a caminhada seja menos árdua. Em especial aos meus amigos de infância, que me acompanham a vida inteira; à Lívia, por estar perto mesmo quando longe; aos *“Deboaceae”* por serem o melhor clado da biologia e aos amigos do laboratório, que acompanharam de perto essa trajetória e encheram diariamente minha vida de alegria. Ao prof., Luciano Fietto e à Mariana Vieira por aceitarem participar comigo desta etapa importante de minha vida pessoal e profissional. A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro. De maneira especial agradeço ao prof. Carlos A. Rosa pela oportunidade, apoio e orientação.

“Todos os homens, por natureza, desejam saber.”
Aristóteles - Filósofo grego

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	1
Lista de Figuras	2
Lista de Anexos.....	3
Resumo.....	4
Abstract	5
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 <i>O uso da energia pelos seres humanos</i>	8
2.2 <i>Os combustíveis fósseis</i>	8
2.3 <i>Energias renováveis</i>	10
2.4 <i>O Bioetanol</i>	10
2.4.1 <i>O etanol de primeira geração</i>	12
2.4.2 <i>O etanol de segunda geração</i>	14
2.5 <i>Composição da Biomassa Lignocelulósica</i>	17
2.6 <i>Xilanases</i>	20
2.7 <i>A fermentação de D-xilose</i>	23
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 <i>Geral</i>	27
3.2 <i>Específicos</i>	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 <i>Áreas de coleta</i>	28
4.1.1 <i>Reserva Particular do Patrimônio Natural Parque do Caraça</i>	28

4.1.2 Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra	
Bonita.....	29
4.2 Coleta e processamento das amostras de madeira em decomposição.....	30
4.2.1 Isolamento das leveduras.....	30
4.2.2 Purificação e Manutenção das Leveduras.....	31
4.3 Identificação das Leveduras.....	31
4.3.1 Extração do DNA.....	31
4.3.2 PCR com o iniciador EI1.....	32
4.3.3 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4, ITS1 e ITS4.....	33
4.3.4 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento.....	34
4.3.5 Análise das sequências.....	34
4.4 Seleção das Leveduras Fermentadoras de D-xilose.....	35
4.5 Seleção das Leveduras Produtoras de Xilanases.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Isolamento das Leveduras.....	37
5.2 Identificação das Leveduras.....	38
5.3 Leveduras Fermentadoras de D-xilose.....	50
5.4 Leveduras Produtoras de Xilanases.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção típica de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa lignocelulósica.....	17
Tabela 2: Número de isolados de leveduras por área de coleta e por meio de cultura utilizados.....	38
Tabela 3: Espécies novas encontradas na RPPN Parque do Caraça e na RPPN Serra Bonita.....	45
Tabela 4: Espécies de leveduras isoladas na RPPN Parque do Caraça de acordo com os meios utilizados no isolamento, o número de isolados e a frequência de ocorrência.....	46
Tabela 5: Espécies de leveduras isoladas na RPPN Serra Bonita de acordo com os meios utilizados no isolamento, o número de isolados e a frequência de ocorrência.....	48
Tabela 6: Leveduras fermentadoras de D-xilose, a maior concentração de etanol em g/L produzida, o número total de isolados obtidos e o número de linhagens que fermentaram D-xilose.....	53
Tabela 7: Espécies produtoras de xilanases, número de isolados que produziram a enzima na primeira triagem e número de isolados que não tiveram a atividade confirmada.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da hemicelulose e ponto de ataque das enzimas responsáveis pela degradação deste polímero.....23

Figura 2: Vias de fermentação de xilose.....24

Figura 3: Reação de uma molécula de etanol com o oxigênio, catalisada pela enzima álcool oxidase, formando acetaldeído e peróxido de hidrogênio, que por sua vez reage com fenol e aminoantipirina, catalisada pela enzima peroxidase, levando a formação do quinonimina, composto de cor vermelha.....51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: <i>Sugiyamaella xylanicola</i> sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting-wood in Brazil.....	72
--	----

RESUMO

Devido ao esgotamento das reservas de petróleo e às questões ambientais relacionadas à sua utilização, é necessária a busca por fontes alternativas e renováveis de energia. O etanol lignocelulósico é interessante, pois é fabricado a partir da biomassa lignocelulósica, uma matéria prima abundante e barata. Os empecilhos para sua fabricação incluem a ausência de um micro-organismo capaz de produzir as enzimas necessárias para a degradação da hemicelulose e de uma levedura capaz de fermentar D-xilose. O objetivo deste trabalho foi isolar as leveduras assimiladoras de D-xilose e Xilana presentes na madeira em decomposição e testá-las quanto à capacidade de fermentar D-xilose e de produzir xilanases. Foram isoladas 326 leveduras, sendo que nos testes de triagem 28 (8,58%) isolados produziram xilanases e 49 (15,03%) fermentaram D-xilose produzindo etanol. A maioria dos isolados produtores de xilanase foi identificada como *Sugiyamaella xylicolla*, uma espécie nova identificada neste trabalho. A maior parte das leveduras fermentadoras de D-xilose foi identificada como *Scheffersomyces (Candida) queiroziae* e *S. stipitis*. Além disso, foram isoladas 18 possíveis espécies novas, sendo que três delas produziram xilanases e três fermentaram D-xilose. O isolamento de novas espécies de leveduras produtoras de enzimas e fermentadoras de D-xilose nos dois ecossistemas de Mata Atlântica estudados mostra o potencial destes ambientes para a obtenção de novos microrganismos de interesse para a produção de etanol lignocelulósico.

ABSTRACT

Due to the depletion of oil reserves and environmental issues related to its use, it is necessary to search for alternative and renewable sources of energy. The lignocellulosic ethanol is interesting because it is manufactured from lignocellulosic biomass, an abundant and cheap material. The obstacles for lignocellulosic ethanol production include the absence of a micro-organism capable of producing the enzymes required for the degradation of hemicellulose and yeasts capable of fermenting D-xylose. The aim of this study was to isolate yeasts that assimilate D-xylose and xylan present in decaying wood as sole carbon source, and to test them for their ability to ferment D-xylose and to produce extracellular xylanases. Thirty hundred and twenty-six yeasts were isolated, and in the screening tests 28 (8.58%) isolates produced xylanases and 49 (15.03%) fermented D-xylose producing ethanol. Most xylanase-producing yeast isolates was identified as *Sugiyamaella xylanicola*, a new species identified in this work. Most yeast fermenting D-xylose was identified as *Scheffersomyces (Candida) queiroziae* and *S. stipitis*. Furthermore, we isolated 18 possible new species, three of which produced xylanases and three fermented D-xylose. The isolation of new yeast species that produce enzymes and ferment D-xylose from the Atlantic Rain Forest sites studied, shows the potential of of this environment to obtain new microorganisms of interest for the production of lignocellulosic ethanol.