

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia**

TESE DE DOUTORADO

**LEVEDURAS FERMENTADORAS DE CELOBIOSE ISOLADAS DE
ECOSSISTEMAS BRASILEIROS**

Mariana Rocha Lopes

Belo Horizonte – MG

2015

Mariana Rocha Lopes

**LEVEDURAS FERMENTADORAS DE CELOBIOSE ISOLADAS DE
ECOSSISTEMAS BRASILEIROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte – MG
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me iluminar nos momentos de dificuldade e me guiar nesta caminhada. Aos meus pais pelo amor, dedicação e por não medirem esforços para que eu pudesse seguir sempre em frente. Aos meus irmãos pelo incentivo, amor e alegria de viver. Ao meu companheiro Pule, pelo amor, atenção e carinho e, principalmente, pela paciência e apoio em todos os momentos. Aos amigos e colegas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, por tornar a adaptação em Belo Horizonte mais fácil e agradável e pelo apoio em todos os experimentos; em especial às curicas pela amizade e pelas inúmeras noites divertidas do “dia das meninas”. Aos colegas do grupo C5C6 pelas valiosas críticas e sugestões e auxílio nos experimentos. Aos amigos em geral, conquistados em Manhuaçu, Viçosa, BH ou Madison, pelo grande incentivo, apoio nos momentos difíceis e pelos ótimos momentos de descontração. Enfim, a todos os amigos e familiares, pela torcida, incentivo e apoio em todas as horas, e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa por me receber como membro de sua equipe e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação e apoio. Ao professor Dr. Chris T. Hittinger por me receber em seu laboratório durante um ano, por toda atenção, orientação e dedicação. À Dra. Raquel Cadete e à professora Dra. Fátima O. Gomes pelas valiosas contribuições dadas para o aprimoramento deste trabalho, desde o exame de qualificação, e por aceitarem participar deste momento como membros da banca examinadora. Aos demais membros da banca, professores Dr. Luciano G. Fietto, Dr. Boris U. Stambuk, Dra. Vera Lúcia e Dr. Daniel Bonoto por aceitarem o convite; em especial ao professor Luciano, por acreditar e me iniciar na vida científica, pelo apoio e incentivo desde sempre. À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia pelo apoio acadêmico e institucional, e ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Contexto energético mundial	1
1.2. Contexto energético no Brasil.....	3
1.3. Produção de etanol de segunda geração	5
1.3.1. Biomassa lignocelulósica.....	5
1.3.2. Processo de conversão da biomassa a etanol	7
1.3.3. Celulases	9
1.4. Leveduras fermentadoras de celobiose.....	11
2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Especificos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Coletas	18
4.1.1. Áreas de coleta.....	18
4.1.1.1. <i>Parque Nacional do Caraça</i>	18
4.1.1.2. <i>Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra Bonita</i>	19
4.1.1.3. <i>Reservas ambientais na região do Taquaruçu e no Centro de Pesquisa Canguçu</i>	20
4.1.1.4. <i>Reservas florestais dos municípios de São João da Baliza e Mucajaí</i>	21
4.2. Obtenção das leveduras	22
4.2.1. Isolamento de leveduras assimiladoras de celobiose	22
4.2.2. Purificação e manutenção das leveduras	22
4.2.3. Identificação das leveduras	23
4.2.3.1. <i>Extração do DNA</i>	23
4.2.3.2. <i>PCR fingerprinting</i>	24
4.2.3.3. <i>Amplificação de regiões do gene do rRNA</i>	24

4.2.3.4. <i>Purificação dos produtos de PCR e reação de seqüenciamento</i>	25
4.2.3.5. <i>Análise das seqüências</i>	26
4.3. <i>Seleção das leveduras fermentadoras de celobiose</i>	26
4.4. <i>Caracterização do metabolismo fermentativo de celobiose das leveduras selecionadas</i>	28
4.4.1. <i>Determinação da atividade β-glicosídica</i>	28
4.4.2. <i>Ensaio de fermentação em escala de bancada</i>	29
4.4.3. <i>Métodos analíticos</i>	30
4.4.3.1. <i>Determinação da concentração celular</i>	30
4.4.3.2. <i>Determinação da concentração de açúcares e etanol</i>	30
4.4.3.3. <i>Calculo dos parâmetros fermentativos</i>	31
4.5. <i>Identificação de genes relacionados ao metabolismo de celobiose em leveduras Scheffersomyces spp.</i>	31
4.5.1. <i>Leveduras utilizadas</i>	31
4.5.2. <i>Plasmídeos utilizados</i>	32
4.5.3. <i>Sequenciamento dos genomas</i>	32
4.5.3.1. <i>Extração de DNA</i>	32
4.5.3.2. <i>Biblioteca genômica e sequenciamento por Illumina</i>	33
4.5.4. <i>Obtenção dos genomas</i>	33
4.5.4.1. <i>Aquisição e processamento dos reads obtidos após o sequenciamento</i>	33
4.5.4.2. <i>Montagem dos genomas</i>	34
4.5.5. <i>Obtenção das seqüências dos genes de interesse</i>	34
4.5.5.1. <i>Análises por tBLASTn</i>	34
4.5.5.2. <i>Identificação da seqüência codificadora</i>	35
4.5.6. <i>Clonagem dos genes</i>	35
4.5.6.1. <i>Amplificação dos genes</i>	35
4.5.6.2. <i>Construção dos plasmídeos pela técnica “GAP repair”</i>	36
4.5.6.3. <i>Propagação dos plasmídeos</i>	37
4.5.7. <i>Expressão gênica</i>	37
4.5.7.1. <i>Obtenção dos transformantes</i>	37
4.5.7.2. <i>Avaliação da expressão por atividade enzimática</i>	38
4.5.7.3. <i>Avaliação da capacidade fermentativa dos transformantes</i>	38
5. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	40

5.1. Isolamento e identificação das leveduras	40
5.2. Leveduras fermentadoras de celobiose	56
5.3. Ensaio de fermentação em escala de bancada	59
5.4. Determinação da atividade β -glicosídica	63
5.5. Sequenciamento genômico	66
5.6. Obtenção das sequências, amplificação e clonagem dos genes de interesse... ..	66
5.7. Obtenção dos transformantes.....	69
5.7.1. Avaliação da expressão gênica pelos transformantes	69
5.7.2. Avaliação da fermentação de celobiose pelas leveduras transformantes.....	72
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enzimas celulolíticas responsáveis pela hidrólise da celulose.	8
Figura 2. Inibição das enzimas celulolíticas pelos produtos, celobiose e glicose. ...	10
Figura 3. Método colorimétrico de detecção de etanol.....	27
Figura 4. Ensaio enzimático de β -glicosidase com pNP β G.	29
Figura 5. Fracionamento em gel de agarose 1,0% dos produtos de amplificação a partir do DNA genômico de <i>Sc. queiroziae</i>	67
Figura 6. Atividade β -glicosídica intracelular nas leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformantes.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e ocorrência das espécies de leveduras isoladas nos ecossistemas brasileiros estudados.....	47
Tabela 2. Identificação das novas espécies encontradas.	51
Tabela 3. Identificação, produção de etanol e número de isolados fermentadores por espécie de levedura.	58
Tabela 5. Atividade da enzima β -glicosidase intracelular e periplasmática nas leveduras fermentadoras de celobiose selecionadas.	65
Tabela 6. Resultados das análises tBLASTn no genoma de <i>Sc. queiroziae</i> . Genes encontrados, localização dos genes, score e identidade da sequência em relação aos genes referência.....	68
Tabela 7. Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformantes. Linhagem, genótipo e os antibióticos necessários para crescimento e indução da expressão gênica.	69
Tabela 8. Atividade β -glicosídica intracelular nas leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformantes.	71
Tabela 9. Parâmetros fermentativos do ensaio de fermentação pelas leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformantes.....	73

RESUMO

A limitação dos combustíveis fósseis junto às políticas de desenvolvimento sustentável tem reforçado a busca por combustíveis alternativos e, neste cenário, o etanol de segunda geração tornou-se uma prioridade. A hidrólise da celulose é uma etapa crítica no processo, uma vez que as enzimas sofrem inibição pelos produtos, celobiose e glicose. O uso de leveduras fermentadoras de celobiose constitui uma alternativa interessante e podem aumentar o rendimento ao converter, além da glicose, celobiose à etanol. Os objetivos deste trabalho foram isolar, identificar e caracterizar leveduras fermentadoras de celobiose, bem como identificar genes do metabolismo deste açúcar. 647 leveduras foram isoladas e identificadas em 133 espécies, sendo 48 novas para a ciência. *Candida boidinii* foi a mais frequente. *Scheffersomyces queiroziae*, *Sc. amazonensis*, *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov., *C. jaroonii*, *C. tammaniensis* e *Hanseniaspora opuntiae* apresentaram maior produção de etanol e foram selecionados para caracterização do metabolismo fermentativo de celobiose. As leveduras apresentaram atividade β -glicosídica intracelular e elevados rendimentos de produção de etanol e eficiência de fermentação, sendo que *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis* apresentaram os melhores perfis. *Scheffersomyces queiroziae* teve o genoma sequenciado e foram encontrados 9 genes hipotéticos, codificadores de transportadores de açúcares e β -glicosidases. Dois genes, similares a HXT2.4 e BGL5 de *Sc. stipitis*, foram expressos na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os transformantes apresentaram atividade β -glicosídica intracelular e fermentaram celobiose com eficiência de até 50%. Os resultados mostram o potencial biotecnológico de leveduras isoladas da biodiversidade brasileira para aplicação em processos fermentativos e obtenção de novos genes interessantes para futuros estudos de produção de etanol lignocelulósico.

Palavras-chave: leveduras, etanol, celobiose, β -glicosidase.

ABSTRACT

The fossil fuels restriction and new policies of sustainable development have been increased the demand for alternative fuels and in this scenario the second-generation ethanol became a priority. The cellulose hydrolysis is a critical step in the process, since the enzymes are inhibited by products, glucose and cellobiose. Cellobiose-fermenting yeasts is an interesting alternative and applying them could increase the ethanol yield, by metabolizing cellobiose in addition to glucose. The goals of this study were to isolate, identify and characterize cellobiose-fermenting yeast and identify genes of cellobiose metabolism. A total of 647 yeasts strains were isolated and 133 species were identified, where 48 are new species for science. *Candida boidinii* was found more frequently. *Scheffersomyces queiroziae*, *Sc. amazonensis*, *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov., *C. jaronii*, *C. tammaniensis*, and *Hanseniaspora opuntiae* produced more ethanol and were selected to characterize the fermentative metabolism of cellobiose. The yeasts showed intracellular β -glucosidase activity and high ethanol yields and fermentation efficiency, *Sc. queiroziae* and *Sc. amazonensis* showed the best profiles. The genome of *Sc. queiroziae* was sequenced and 9 hypothetical genes were found, encoding sugar transporters and β -glucosidases enzymes. Two genes similar to *Sc. stipitis* genes HXT2.4 and BGL5 have been expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The recombinant strains showed intracellular β -glucosidase activity and could ferment cellobiose with 50% efficiency. The results show the biotechnological potential of yeasts isolated from Brazilian biodiversity for use in fermentation processes and to obtain new interesting genes for future studies in lignocellulosic ethanol production.

Key words: yeast, ethanol, cellobiose, β -glucosidase.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Contexto energético mundial

Durante o século XX, o desenvolvimento industrial e social foi essencialmente impulsionado pelo crescimento do setor petroquímico. O constante aumento das taxas de exploração e utilização das reservas de recursos fósseis assegurou por muito tempo a disponibilidade de matéria-prima para a indústria e combustíveis para transporte e geração de energia. A formação de recursos fósseis é um processo cíclico, mas que leva muito tempo para se completar, enquanto que a capacidade de exploração desses recursos pela humanidade é muito mais rápida. Assim, no início do século XXI, vários fatores contribuíram para a crescente e urgente necessidade da utilização de fontes alternativas renováveis que pudessem atender uma economia global até então predominantemente dependente de recursos fósseis, como o petróleo (van Maris et al., 2006).

Ainda hoje o petróleo apresenta-se como a principal fonte de energia mantenedora do desenvolvimento industrial. Entretanto, a dependência cada vez maior de energia, a possibilidade do esgotamento das reservas fósseis e a preocupação com a questão ecológica cada vez mais forte, fundamentada nos impactos ambientais observados atualmente, compreendem fatores que instigam a procura e o desenvolvimento de alternativas energéticas (Sánchez e Cardona, 2008). Por meio do uso de recursos energéticos renováveis, o mundo pode encontrar parte da solução para as suas necessidades energéticas, de uma maneira ambientalmente sustentável. Neste contexto, a produção de biocombustíveis surge como alternativa promissora, já que se baseia na utilização de fontes naturais renováveis (Bhattarai et al., 2011; Hahn-Hägerdal et al., 2006).

O potencial global de bioenergia é representado pelas culturas energéticas e pelos resíduos lignocelulósicos. O bioetanol considerado uma fonte renovável de energia, pode ser produzido a partir de diferentes culturas, incluindo milho, cana-de-açúcar, trigo e beterraba (Singhania et al., 2009). Sendo fabricado a partir da fermentação de açúcares presentes nas culturas que se destinam a alimentação, o etanol obtido é classificado como biocombustível de primeira geração, sendo essa a principal forma de produção do combustível comercializado atualmente. No entanto,

os biocombustíveis de primeira geração geram preocupações em relação ao balanço de carbono e o aumento nos preços dos alimentos pela competição pelo uso da terra (Naik et al., 2010).

Esforços estão sendo feitos para produzir etanol a partir de biomassa lignocelulósica, denominado biocombustível de segunda geração. A biomassa engloba uma variedade de resíduos agroindustriais, são matérias-primas de baixo custo, sustentáveis e disponíveis em ampla variedade (Premjet et al., 2013). A produção de etanol a partir de material lignocelulósico apresenta uma série de vantagens, dentre elas, maior distribuição geográfica das fontes de matéria-prima se comparado às fontes disponíveis de combustíveis fósseis e a diminuição do conflito entre o uso da terra para produção de alimentos ou para fornecimento matéria prima para produção de combustível. Além disso, há a redução do impacto ambiental pela menor emissão de gases poluentes na queima dos biocombustíveis (Agbogbo e Coward-Kelly, 2008; Fairley, 2011; Hahn-Hägerdal et al., 2006). Se produzidos de forma sustentável, os biocombustíveis de acordo com a Agência Internacional de Energia (AIE) poderiam substituir o petróleo o suficiente para evitar o equivalente a 2,1 gigatoneladas de emissões de dióxido de carbono a cada ano (Fairley, 2011). Portanto, uma forma para satisfazer as necessidades energéticas do futuro seria a utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol.

A produção de etanol lignocelulósico é uma tecnologia que já vem sendo implementada em escala piloto de plantas comerciais construídas durante a última década. Em 2009, uma usina de etanol celulósico foi construída em Kalundborg, na Dinamarca, com a finalidade de produzir 5.400 m³ de etanol por ano e, em 2013, a fábrica foi reconstruída para fornecer co-fermentação de açúcares hexoses e pentoses provenientes de palha de trigo. Em 2010, uma unidade de produção de etanol a partir de diferentes biomassas, particularmente da palha e do bagaço foi inaugurada em Oulu, na Finlândia, pela Chempolis Company (Commercial Cellulosic Ethanol Projects, 2015). Em junho de 2013, a planta de demonstração Abengoa foi inaugurada em Salamanca, na Espanha, com uma capacidade anual de 1,5 milhões de litros de bioetanol feito a partir de resíduos sólidos urbanos. A mesma empresa, Abengoa, inaugurou em outubro de 2014 uma planta comercial de etanol celulósico e energia renovável a partir de biomassa no estado do Kansas, Estados Unidos; a planta começou a produzir etanol em setembro de 2014. A empresa POET-DSM

Advanced Biofuels, LLC, foi criada como um esforço cooperativo para comercializar o etanol celulósico produzido a partir da palha e espiga de milho; as instalações da empresa, com sede em Dakota do Sul nos Estados Unidos, iniciou a produção em setembro de 2014 com perspectivas de produzir 20 milhões de litros de etanol celulósico por ano. Atualmente a maior fábrica do mundo de produção de biocombustíveis de 2ª geração, possui uma capacidade anual de 75.000 m³ de bioetanol produzido a partir de trigo e palha de arroz, e foi inaugurada em outubro de 2013, na Itália (Cellulosic Ethanol (CE), 2015). Novas instalações para produção de etanol lignocelulósico também têm sido implementadas no Brasil, e estão descritas no próximo tópico desta revisão.

1.2. Contexto energético no Brasil

Na década de 1970, o governo brasileiro lançou o Programa Nacional do Álcool – o Proálcool – para substituir a gasolina pelo etanol, a fim de diminuir a dependência política e econômica internacional. Esta medida foi tomada devido ao aumento nos preços do açúcar e do barril de petróleo a partir de 1973 (Rovere et al., 2011). Neste programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como a matéria-prima para produzir etanol e se iniciou uma das maiores aplicações comerciais de biomassa para a produção e utilização de energia no mundo, como consequência, o Brasil alcançou uma posição muito mais favorável em termos de segurança energética (Soccol et al., 2010). Até 2004 o Brasil foi o maior produtor de etanol no mundo utilizando cana-de-açúcar como matéria prima. Mas desde então, os Estados Unidos superaram a produção brasileira de etanol, utilizando o milho como principal matéria-prima. Somando a produção brasileira e americana, os dois países produzem cerca de 83% da oferta mundial de etanol combustível (Renewable Fuels Association, 2015).

Atualmente, existem inúmeras unidades de produção de bioetanol instaladas em todo o país. No entanto, deve-se notar que apenas uma pequena fração da biomassa é utilizada na produção do etanol de primeira geração; uma vez que parte é utilizada para a produção de açúcar, podendo esta variar de acordo com a demanda e o contexto econômico do país; parte do bagaço é queimado para produção de eletricidade, e o restante é deixado no campo para ser decomposto por

micro-organismos (Leal et al., 2013). A implantação da tecnologia do etanol de bagaço de cana no Brasil é favorecida porque o processo de produção pode ser anexado às unidades já existentes de indústrias de açúcar e álcool, o que exige menores investimentos, infra-estrutura, logística e fornecimento de energia. Além disso, o bagaço de cana é gerado nas unidades industriais e, como tal, livre de custos de transporte. Este é um cenário promissor, pois a cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de etanol poderiam ser produzidos, considerando o uso da fração celulósica (Macrelli et al., 2014).

A primeira planta de etanol celulósico em escala comercial foi inaugurada no Brasil, em São Miguel dos Campos no estado de Alagoas, após 20 meses de construção. A produção de etanol iniciou em setembro de 2014, com capacidade de produção atual de aproximadamente 22 milhões de galões por ano. A fábrica da GranBio com financiamento do BNDES, utiliza bagaço e palha residual de cana de açúcar para produção do etanol 2G. Acredita-se que o uso da palha e do bagaço permitirá a produtividade industrial de etanol para atingir cerca de 10 mil litros por hectare, o que corresponde a um aumento de até 45 por cento em relação aos níveis atuais. A GranBio pretende construir uma nova usina de etanol por ano até 2020, com um investimento previsto de US \$ 1,7 bilhão (Cellulosic Ethanol (CE), 2015). A segunda planta comercial de etanol celulósico implementada no Brasil, pela Raizen, foi realizada nas instalações da usina de cana Costa Pinto em Piracicaba, São Paulo, e iniciou a produção de etanol 2G em dezembro de 2014, com capacidade de produção de 40 milhões de litros por ano. A planta utiliza tecnologia desenvolvida pela logen Energy, uma parceria entre a Raizen e logen Corp, para converter o bagaço em etanol. Enzimas são fornecidos pela Novozymes. A empresa planeja produzir até 1 bilhão de litros de biocombustível celulósico a partir do bagaço e da palha da cana até 2024 (Cellulosic Ethanol (CE), 2015).

Além dessas plantas já em funcionamento, novos projetos para implementação da produção de etanol celulósico no Brasil estão em andamento. O Centro de Tecnologia Canavieira em parceria com empresas como Andritz AG, Novozymes, Codexis e Poyry Oyj vem trabalhando na implementação de uma planta para produção de etanol em uma usina já existente em São Manoel, São Paulo. A Edeniq, uma empresa de biocombustíveis dos Estados Unidos, começou a construção de uma planta de etanol celulósico na Usina Vale que produz etanol de

cana-de-açúcar em São Paulo. A empresa pretende utilizar até 20 toneladas por dia de bagaço de cana e o etanol produzido na planta de demonstração será adicionado à produção da Usina Vale em sua fábrica atual. A Inbicon em colaboração com a ETH Bioenergia no Brasil pretende implementar uma planta de demonstração de etanol celulósico no Brasil ainda em 2015, com uma capacidade prevista para produzir milhões de litros de etanol por ano (Commercial Cellulosic Ethanol Projects, 2015).

1.3. Produção de etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração é definido como o etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica, podendo também ser chamado de etanol lignocelulósico (Tomás-Pejó et al., 2009). As tecnologias de etanol de segunda geração não é um processo simples e sua eficiência pode ser influenciada por vários fatores, tais como o tipo de matéria-prima lignocelulósica, métodos de pré-tratamento, a utilização ou a omissão de um passo de desintoxicação, o tipo e quantidade de enzimas celulolíticas, os micro-organismos utilizados e da sua robustez (incluindo a compatibilidade com cocktails enzimáticas em processos simultâneos), condições de cultivo (configuração, temperatura, pH, concentração de sólidos, tipo e quantidade de nutrientes, etc.) e tipo de biorreator (princípio da mistura, tipo de operação) (Eggert e Greaker, 2014; Viikari et al., 2012). Portanto, encontrar uma combinação ótima de todas as variáveis de uma determinada matéria-prima é um desafio (Paulová et al., 2014).

1.3.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é definida como toda matéria orgânica vegetal (terrestre ou aquática) formada pelo processo de fotossíntese, que ocorre na presença de luz solar. Pode-se dizer que a biomassa é uma forma de armazenamento de uma pequena fração da energia solar que incide na superfície da terra, na forma de ligações moleculares orgânicas (energia química) (Mckendry, 2002). Assim, segundo Couto e colaboradores (2004), a biomassa constitui a massa total capaz de ser aproveitada como insumo energético e engloba uma variedade de

materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas (palha de trigo, palha de arroz, bagaço de cana, palha de milho, casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, casca de soja), biomassa herbácea (feno de alfafa, gramíneas, capim-amarelo), madeiras e resíduos sólidos urbanos (Komolwanich et al., 214; Pandey e Sukumaran, 2009; Rodríguez-Zuniga et al., 2015; Sánches e Cardona, 2008; Shi et al., 2015).

O resíduo de lignocelulose é um produto de baixo custo e o mais abundante substrato natural renovável para conversão em biocombustíveis. Os teores de celulose e hemicelulose nesta biomassa representam uma alternativa sustentável, ou seja, uma fonte de energia renovável e economicamente viável para aumentar a produção de biocombustíveis com menor contribuição para o efeito estufa (Bhattarai et al., 2011; Demain, 2009).

A biomassa de origem vegetal é composta principalmente por celulose (40-50%), hemicelulose (25-35%) e lignina (15-20%) (Gray e Zhao, 2006; Demirbas, 2009). A celulose, principal componente da lignocelulose, é um polímero linear composto de inúmeras subunidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ (Lynd, 1996). Devido às ligações $\beta(1-4)$, a celulose é altamente cristalina e compacta, sendo muito resistente à hidrólise e ao ataque biológico (Gray e Zhao, 2006). Além disso, polímeros lineares de celulose ocorrem como cadeias paralelas com extensas ligações de hidrogênio (Lynd, 1996). Essa estrutura conformacional, bem como a associação estreita com lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais a torna altamente resistente à hidrólise (Demirbas, 2009). A hemicelulose é o segundo componente principal da lignocelulose é um heteropolímero complexo altamente ramificado e que contém hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e Ácido D-galacturônico). O grau de ramificação e identidade nos açúcares menores da hemicelulose tende a variar dependendo da fonte vegetal. Contudo devido à natureza amorfa e ramificada desse polímero, ao contrario da celulose, a hemicelulose é facilmente hidrolisada em seus monossacarídeos constituintes (Hamelinck et al., 2005). A lignina, que constitui 15-20% em peso da biomassa seca, é um polímero aromático contendo resíduos fenólicos, tais como álcool trans-p-coumaril, álcool trans-p-coniferil e álcool trans-p-sinapil. A fração lignina, que não contribui como fontes de carbono fermentáveis, é uma fonte

potencial de inibidores da fermentação microbiana (van Maris et al., 2006).

Dentre os vários tipos de materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo abundante da indústria sucroalcooleira brasileira e tem atraído um grande interesse (Hahn-Hägerdal et al., 2006). É estimado que a cada ano sejam produzidas de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a cerca de 30% do total da cana moída (Morais et al., 2007), neste contexto, a utilização do bagaço pode gerar um aumento superior a 30% na atual produção de álcool sem necessidade de expansão da área plantada de cana de açúcar (Leal et al., 2013; Soccol et al., 2010).

1.3.2. Processo de conversão da biomassa a etanol

O processo de produção de etanol de segunda geração ocorre em quatro fases: pré-tratamento, o qual consiste na deslignificação para liberar a celulose e hemicelulose a partir de seu complexo com lignina; hidrólise enzimática, ou seja, despolimerização da celulose e hemicelulose para produzir açúcares livres; fermentação dos açúcares à etanol; e destilação (Tomás-Pejó et al., 2009).

O pré-tratamento visa aumentar a dimensão dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose, sendo necessário para expor as fibras de celulose às enzimas ou, pelo menos, tornar a celulose mais acessível a estas (Fuentes et al., 2010). Diversos métodos de pré-tratamentos termoquímicos vêm sendo estudados para melhorar a digestibilidade deste composto. Esses métodos variam de muito ácido para muito alcalino, de forma que têm efeitos diferentes sobre os principais componentes da biomassa (Hahn-Hägerdal et al., 2006). Muito provavelmente, não haverá um método único ou generalizado, devido ao fato de diferentes tipos de matérias-primas exigirem diferentes pré-tratamentos. Um pré-tratamento eficiente pode reduzir substancialmente o requerimento de enzimas celulolíticas que constitui uma grande parte do custo de produção (Mosier et al., 2005).

A sacarificação, que compreende a segunda etapa do processo, pode ser realizada utilizando ácidos ou enzimas para a liberação de açúcares monoméricos (Hamelinck et al., 2005). A conversão enzimática é substrato específica, sem formação de subprodutos, o que reduz a inibição das etapas seguintes do processo, demonstrando melhores resultados para a posterior fermentação, embora o

processo seja mais lento (Sánchez e Cardona, 2008). Três classes de enzimas integram o complexo celulolítico: endo- β -1,4-glucanase, exoglucanases e β -glicosidase. O mecanismo amplamente aceito para hidrólise enzimática da celulose envolve ações de sinergismo entre estas três classes enzimáticas, como pode ser observado na Figura 1. As endoglucanases hidrolisam aleatoriamente ligações glicosídicas β (1-4) intramoleculares acessíveis em cadeias de celulose para produzir novas extremidades na cadeia; as exoglucanases decompõem processivamente cadeias de celulose nas extremidades para liberar celobiose ou glicose solúveis; e β -glicosidases hidrolisam celobiose à glicose (Zhang et al., 2012).

As celulasas são usadas para diversas aplicações biotecnológicas, tais como na indústria têxtil e de papel, e atualmente apresentam um grande potencial para utilização na emergente indústria de produção de etanol lignocelulósico. Para diminuir o consumo de água e reduzir os custos do processo, a hidrólise deve ser conduzida sob alta concentração de sólidos. Essa abordagem inevitavelmente resulta em altas concentrações dos produtos finais da hidrólise, celobiose e glicose, e tem sido discutido que a inibição dos produtos sob as celulasas é um fator limitante para eficiente hidrólise da celulose nessas condições (Kristensen et al., 2009).

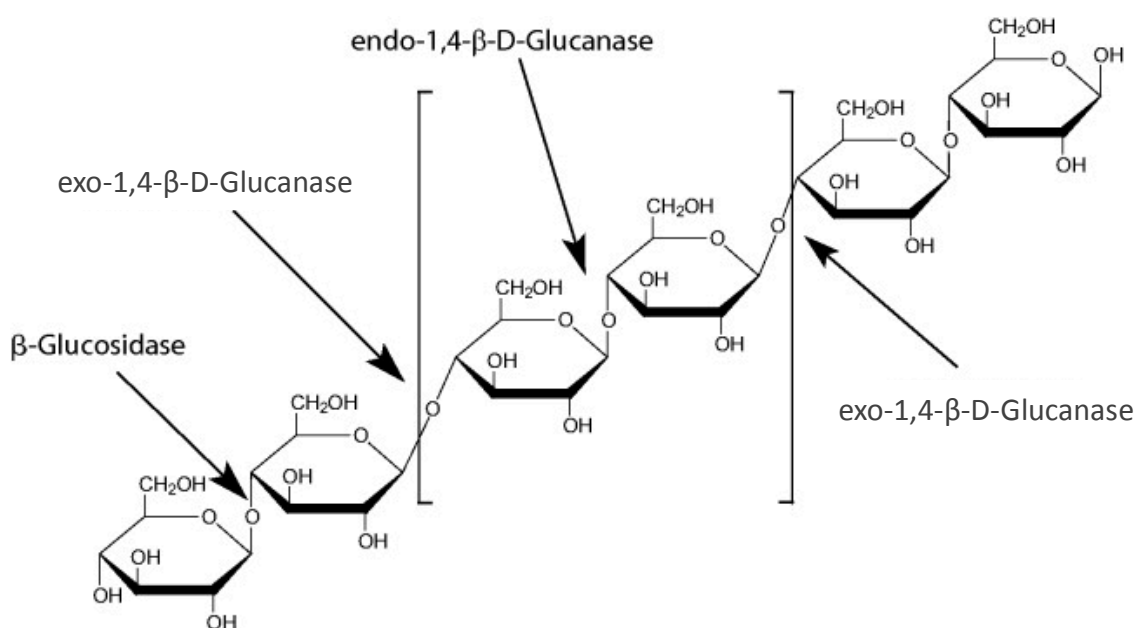


Figura 1. Enzimas celulolíticas responsáveis pela hidrólise da celulose.

A próxima etapa do processo é a fermentação dos açúcares liberados. O processo clássico para a fermentação da biomassa hidrolisada consiste num processo seqüencial, no qual a hidrólise e a fermentação são realizadas em reatores diferentes. Este processo é conhecido como hidrólise e fermentação em separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation* – SHF). Uma alternativa ao SHF é a realização de hidrólise e fermentação em um mesmo reator, processo conhecido como sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* – SSF) (Sánchez e Cardona, 2008). O processo SSF pode ser considerado mais atraente do que a sacarificação e fermentação realizadas separadamente, com maior rendimento de etanol e menor consumo energético (Paulová et al., 2014; Tomás-Pejó et al., 2009). Neste caso, as celulasas e os micro-organismos são adicionados ao mesmo processo, o que permite que as unidades de glicose formadas durante a hidrólise enzimática da celulose sejam imediatamente consumidas pelos micro-organismos, que as convertem em etanol. Desse modo, é mantida uma concentração de glicose baixa no meio, sendo esta uma boa estratégia para aumentar a taxa global de conversão de celulose em etanol (Lee et al., 2013; Liu et al., 2012; Paulová et al., 2014; Stenberg et al., 2000). No entanto, este processo não funciona em condições ideais para a hidrólise e exige maior dosagem da enzima, o que influencia positivamente na conversão do substrato, mas negativamente nos custos do processo. Considerando que as enzimas representam uma parte importante dos custos de produção, é necessário encontrar métodos para reduzir a quantidade de celulasas a ser utilizada (Chandel et al., 2012; Paulová et al., 2014; Sánchez e Cardona, 2008).

1.3.3. Celulasas

As enzimas celulolíticas são significativamente inibidas por celobiose e glicose, produtos da hidrólise da celulose. Esta inibição retarda a taxa global de conversão de celulose a glicose (Gan et al., 2002). Celobiose, o produto das exoglucanases e em parte da ação de endoglucanases, inibe diretamente estas duas classes de enzimas; enquanto que, glicose inibe diretamente as três enzimas, β -glicosidases, exoglucanases e endoglucanases (Figura 2). Na prática, entretanto, a principal inibição pela glicose nas duas últimas enzimas é uma inibição indireta,

pois a inibição por glicose da β -glicosidase pode resultar em acúmulo de celobiose (Andrić et al., 2010; Teugjas e Våljamäe, 2013a).

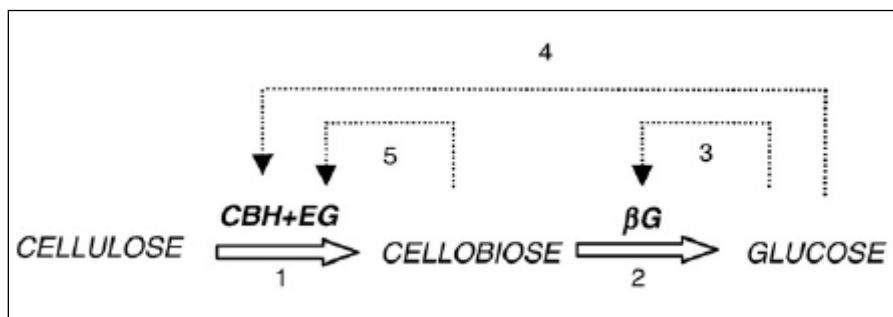


Figura 2. Inibição das enzimas celulolíticas pelos produtos, celobiose e glicose. As setas pontilhadas representam a inibição. **CBH**: celobiohidrolase (exoglucanase). **EG**: endoglucanase. **β G**: β -glicosidase. **(1, 2)**: reações principais de hidrólise da celulose. **(3,4)**: inibição por glicose. **(5)**: inibição por celobiose. (Andrić et al., 2010).

Uma vez que a atividade de endoglucanases e exoglucanases é fortemente inibida por celobiose, as β -glicosidases, neste sentido, não só produzem glicose a partir de celobiose, mas também reduzem o efeito inibitório desse dissacarídeo, permitindo a maior eficiência tanto das endo quanto das exoglucanases. A hidrólise eficiente da celobiose em glicose é, desta forma, crítica para a completa digestão da celulose, e as β -glicosidases têm importante função no mecanismo de regulação da degradação enzimática desse polímero, podendo ser consideradas como limitantes para a hidrólise microbiana da celulose (Singhania et al., 2013; Teugjas e Våljamäe, 2013b).

Diversos fungos celulolíticos produzem celulases deficientes em β -glicosidases, como por exemplo *Trichoderma reesei* (Kawai et al., 2013), *Paecilomyces variotii* (Zerva et al., 2014) e *Flammulina velutipes* (Maehara et al., 2013). Sendo assim, no caso de celulases comerciais com esta deficiência serem utilizadas em reatores de hidrólise, possivelmente ocorrerá o acúmulo de celobiose, com a conseqüente diminuição da eficiência do processo. Neste sentido, a adição (ou suplementação) de β -glicosidases pode atuar diminuindo a inibição provocada pela celobiose nas demais celulases e, assim, aumentar a taxa de conversão de celulose em glicose, uma vez que diminui a inibição provocada pela celobiose nas demais celulases (Wang et al., 2013a).

1.4. Leveduras fermentadoras de celobiose

As leveduras são fungos predominantemente unicelulares amplamente distribuídos na natureza. Estes micro-organismos, principalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido os mais utilizados pelo homem no desenvolvimento de novas tecnologias microbianas. Atualmente são conhecidas cerca de 1.500 espécies de leveduras (Kurtzman et al., 2011a), e as espécies novas descritas a partir de isolados provenientes de ecossistemas brasileiros representam menos do que 3% deste total (Cadete et al., 2009, 2012a, 2012b, 2103, 2014; Gomes et al., 2015; Morais et al., 2006, 2013). As estimativas atuais apontam que menos de 1% das espécies de leveduras, semelhante a outros grupos microbianos, é conhecida (Kurtzman, 2014).

Para a produção de etanol, tanto de primeira quanto de segunda geração, a fermentação é a via mais importante para a obtenção do álcool. A levedura *S. cerevisiae*, utilizada com sucesso na produção industrial de etanol a partir da cana de açúcar e melaço no Brasil, é capaz de fermentar hexoses rápida e eficientemente, exibe alta tolerância ao etanol, e tolerância a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação (Basso et al., 2008). Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar celobiose, um dos produtos da hidrólise da celulose e forte inibidor competitivo de celulasas (Bezerra e Dias, 2005). O uso de leveduras fermentadoras de celobiose constitui uma alternativa interessante para a produção de etanol celulósico, uma vez que essas também fermentam os monômeros de glicose produzidos durante a hidrólise (Lynd et al., 2005). Leveduras capazes de fermentar celobiose produzem a enzima β -glicosidase, responsável pela hidrólise da celobiose à glicose e, uma vez que a celobiose é um forte inibidor das outras enzimas celulolíticas, as β -glicosidasas não só determinam a taxa, mas também a amplitude da hidrólise da celulose (Lynd et al., 2002). Neste contexto, o uso de uma linhagem de levedura com alta atividade β -glicosídica reduziria a quantidade necessária de celulasas adicionais, e ajudaria a alcançar um processo de produção de etanol economicamente viável (Saitoh et al., 2008).

Leveduras com a capacidade de fermentar celobiose vêm sendo descritas ao longo dos anos. Barnett (1976) mostrou que de 308 espécies assimiladoras de celobiose apenas 12 eram conhecidas por fermentar este açúcar. Blondin e

colaboradores (1982) avaliaram a capacidade da levedura *Dekkera intermedia* (= *Dekkera bruxellensis*) em fermentar celobiose, em altas concentrações do açúcar. Freer e Detroy (1983) testaram 22 leveduras quanto a capacidade de fermentar celobiose a etanol, e as leveduras *C. wickerhamii* (clado *Nakazawaea*), *Clavispora lusitaniae* e algumas espécies *Brettanomyces* spp. foram capazes de fermentar celobiose. Morikawa e colaboradores (1985) descreveram ainda uma nova espécie, *Kluyveromyces celobiovorus*, capaz de fermentar celobiose e xilose. Estes autores testaram 213 espécies, mas somente esta nova espécie produziu etanol a partir destes açúcares. A capacidade de *C. wickerhamii*, *C. lusitaniae* e *D. intermedia* em fermentar celobiose foi avaliada novamente em um estudo posterior e, além dessas, as leveduras *Torulopsis molischiana* (= *Kuraishia molischiana*), *Pichia guilliermondii* (= *Meyerozyma guilliermondii*), *Debaryomyces polymorphus* (clado *Schwanniomyces*), *Kluyveromyces lactis*, *K. dobzhanskii* e *Brettanomyces claussenii* (= *Dekkera anomala*) também apresentaram a habilidade de fermentar este açúcar (Freer, 1991). Além dessas, a levedura *Scheffersomyces stipitis*, conhecida pela fermentação de xilose, também foi estudada quanto a capacidade em fermentar celobiose (Hahn-Hägerdal et al., 1994; Jeffries et al., 2009; Singh et al., 2014). Neste contexto, Ryabova e colaboradores (2003) avaliaram a capacidade da levedura *Hansenula polymorpha* em fermentar glicose, celobiose e xilose, sob temperatura de 37 °C. Novas espécies de leveduras, isoladas de madeira em decomposição em ecossistemas brasileiros, fermentadoras de celobiose foram descritas, *Scheffersomyces queiroziae* e *Sc. amazonensis*, sendo que para a primeira foi demonstrada a produção da enzima β -glicosidase intracelular, responsável pela hidrólise da celobiose (Cadete et al., 2012a; Santos et al., 2011). Uma nova espécie *Clavispora* sp. também apresentou a capacidade de fermentar celobiose, e esta possui atividade β -glicosidase, além de exibir tolerância a inibidores decorrentes do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como furfural e hidroximetilfurfural (Liu et al., 2013a). Mais recentemente, a espécie nova *Candida funiuensis* sp. nov., pertencente ao clado de *Candida kruisii*, foi isolada de madeira em decomposição na China e descrita como fermentadora de celobiose (Wang et al., 2015).

Vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de permitir a eficiente fermentação de celobiose por linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, por meio da expressão heteróloga de β -glicosidase e/ou transportadores de celobiose. A co-

expressão dos transportadores de celobiose *cdt-1* e/ou *cdt-2* e da β -glicosidase intracelular *gh1-1* do fungo celulolítico *Neurospora crassa* em linhagens de *S. cerevisiae* é amplamente estudada. O foco destes estudos variam entre a fermentação de celobiose em linhagens de laboratório e industriais (Galazka et al., 2010; Ha et al., 2013a, 2103b), a co-fermentação de açúcares celobiose e xilose (Li et al., 2010; Zha et.al, 2013), até a ensaios de sacarificação e fermentação simultâneas (Lee et al., 2013). Além disso, em trabalhos mais recentes, leveduras recombinantes, que expressam os genes de *N. crassa*, foram utilizadas em estudos de evolução dirigida a fim de otimizar a via metabólica de utilização de celobiose nos transformantes (Lian et al., 2014; Wei et al., 2015). O gene BGL1, que codifica uma β -glicosidase em *Saccharomycopsis fibuligera*, também tem sido estudado em leveduras recombinantes de *S. cerevisiae* é (Tang et al., 2013; van Rooyen et al., 2005). Em um estudo mais completo, Guo e colaboradores (2011) avaliou a expressão intracelular, secretada ou associada à parede celular da enzima de *S. fibuligera*. O recombinante expressando a enzima associada à parede apresentou os melhores resultados, uma vez que *S. cerevisiae* não é capaz de transportar celobiose para dentro da célula e a enzima extracelular apresentou baixos rendimentos; mesmo assim, no geral a taxa de consumo de celobiose ainda foi baixa (Guo et al., 2011). β -glicosidases de diferentes fungos já foram aplicadas nestes estudos de expressão gênica, visando a fermentação de celobiose, como por exemplo *Aspergillus kawachii*, *A. acullatus*, *A. niger*, *Trichoderma reesei*, *Scytalidium thermophilum*, *Penicillium chrysogenum* e *Thielavia terrestris* (Bae et al., 2014; Saitoh et al., 2008; Tang et al., 2013; van Rooyen et al., 2005; Wang et al., 2013a, 2013b; Wilde et al., 2012). Estudos de evolução adaptativa a fim de otimizar a via metabólica de utilização de celobiose também vêm sendo desenvolvidos; ao combinar metodologias de engenharia metabólica e evolução dirigida, estes estudos visam aumentar a taxa de consumo de celobiose e o rendimento e produtividade de etanol em leveduras geneticamente modificadas (Eriksen et al., 2013; Yuan e Zhao, 2013). Todos estes trabalhos visam o melhoramento de leveduras para aplicação em processos industriais de produção de etanol lignocelulósico, contudo uma linhagem eficiente e bem adaptada ao processo ainda não foi encontrada.

A busca por novos micro-organismos na natureza é constante, e a madeira em decomposição encontrada em ecossistemas florestais brasileiros tem sido um

substrato promissor para isolamento de leveduras. Além das leveduras *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis*, citadas acima, diversas novas espécies vêm sendo encontradas neste substrato. Dentre elas *Candida materiae* (Barbora et al., 2009), *Spathaspora arborariae* (Cadete et al., 2009), *Sp. brasiliensis*, *Sp. suhii*, *Sp. roraimanensis* e *Sp. xylofermentans* (Cadete et al., 2013); estas leveduras pertencem ao clado *Spathaspora*, o qual abriga leveduras fermentadoras de xilose e de grande importância biotecnológica neste contexto de produção de etanol de segunda geração. A levedura *Sugiyamaella xylanicola* também foi isolada a partir deste substrato juntamente com outras leveduras e foram descritas como produtoras de enzimas xilanolíticas, característica também de grande importância no âmbito dos biocombustíveis lignocelulósicos (Lara et al., 2014; Morais et al., 2013). Sendo assim, a exploração da madeira em decomposição de ecossistemas brasileiros como substrato na busca por novas leveduras fermentadoras de celobiose é de grande interesse. O objetivo é a obtenção de novas leveduras que possam ser estudadas quanto à fermentação eficiente deste açúcar e aplicadas como alternativas em processos de produção de etanol de segunda geração; além disso, essas leveduras podem representar possíveis fontes de novos genes de enzimas β -glicosidase e transportadores de celobiose.

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a escassez de combustíveis fósseis e a poluição ambiental proveniente de seu uso têm despertado interesse na busca por fontes renováveis de energia. Neste âmbito, o etanol ganha especial atenção, principalmente no que se refere a sua obtenção a partir de materiais lignocelulósicos. O etanol lignocelulósico ou de segunda geração pode ser produzido a partir de produtos ou resíduos agrícolas de baixo valor, além de resíduos agroindustriais e florestais, como palha, bagaço, madeira ou capim. A utilização de tecnologias que empregam esses materiais lignocelulósicos como matéria-prima apresenta como vantagens o baixo custo, abundância, impactos positivos na conservação do ambiente e biodiversidade, além de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis. Neste contexto, o interesse em otimizar o processo de fermentação para a obtenção de etanol em larga escala tem sido o foco de diversos estudos.

A biomassa lignocelulósica é composta por cerca de 10 a 25% de lignina, 20 a 40% de hemicelulose e 40 a 60% de celulose, e consiste na maior fonte conhecida renovável de carbono. O processo de produção de bioetanol celulósico envolve três grandes passos: o pré-tratamento, um passo inicial que melhora o acesso das enzimas à celulose; a sacarificação, passo de hidrólise da celulose; e a fermentação dos açúcares liberados pelos micro-organismos especializados. Todas as etapas ainda necessitam de aprimoramento para que seja economicamente viável. A sacarificação é uma etapa crítica do processo, na qual a celulose é hidrolisada a glicose pela ação das celulasas. Três classes de enzimas integram o complexo celulolítico: endo- β -1,4-glucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. A atividade de endoglucanases e exoglucanases é fortemente inibida pela celobiose, neste sentido, as β -glicosidases não só liberam moléculas de glicose a partir de celobiose, mas também reduzem o efeito inibitório desse dissacarídeo, permitindo a maior eficiência tanto das endo quanto das exoglucanases. A hidrólise eficiente da celobiose em glicose, desta forma, é crítica para a completa digestão da celulose.

O uso de leveduras capazes de fermentar celobiose constitui, portanto, uma alternativa desejável para a produção de bioetanol. Tais leveduras também fermentam os monômeros de glicose liberados durante a hidrólise da celulose.

Considerando a diversidade de ecossistemas, e a possibilidade do Brasil abrigar uma porção representativa da biodiversidade do planeta, o estudo da biodiversidade de leveduras no país é de grande interesse. Vários substratos têm sido explorados e amostrados no Brasil fornecendo uma grande quantidade de novas espécies de leveduras, e linhagens com aplicações biotecnológicas. Os ecossistemas tropicais apresentam uma enorme variedade de substratos para serem amostrados, e com a biodiversidade microbiana praticamente desconhecida. Recentemente, duas novas espécies de leveduras fermentadoras de celobiose isoladas de madeira em decomposição de ecossistemas brasileiros foram descritas. As leveduras são consideradas os principais micro-organismos em biotecnologia, sendo que o uso de linhagens nativas brasileiras em processos industriais ainda é incipiente. Portanto, coletas em diferentes ecossistemas brasileiros poderão levar à obtenção de novas espécies de leveduras fermentadoras de celobiose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a comunidade de leveduras assimiladoras de celobiose associadas à madeira em decomposição de ecossistemas florestais brasileiros, assim como avaliar a capacidade das mesmas em fermentar este açúcar e, ainda, buscar e identificar no genoma de leveduras *Scheffersomyces* spp. genes envolvidos no metabolismo de celobiose.

3.2. Objetivos Especificos

- Isolar e identificar leveduras assimiladoras de celobiose, associadas à madeira em decomposição de ecossistemas florestais de Mata Atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica;
- Selecionar, dentre os micro-organismos isolados, leveduras capazes de fermentar celobiose;
- Determinar a atividade β -glicosídica e verificar a fermentação de celobiose em ensaios fermentativos em escala de bancada das leveduras selecionadas;
- Fazer o sequenciamento e montagem do genoma das leveduras *Scheffersomyces queiroziae* e *Sc. amazonensis*;
- Buscar os genes de interesse nos genomas obtidos, utilizando como base genes já depositados no banco de dados GenBank;
- Amplificar e clonar os genes em plasmídeos para expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar a funcionalidade dos genes nos transformantes obtidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coletas

Cinquenta amostras de madeira em decomposição foram coletadas em cada um dos locais de amostragem. As amostras foram conservadas em sacos plásticos estéreis devidamente identificados e conduzidas sob refrigeração para processamento em laboratório no período máximo de 24 horas em relação à coleta. As coletas foram realizadas em março de 2011 no Parque Nacional do Caraça (MG), em abril de 2011 na Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra Bonita (BA), em setembro de 2011 nas Reservas ambientais na região do Taquaruçu e no Centro de Pesquisa Canguçu (TO), e em novembro de 2011 nas Reservas florestais dos municípios de São João da Baliza e Mucajaí (RR).

4.1.1. Áreas de coleta

4.1.1.1. Parque Nacional do Caraça

A Serra do Caraça está localizada ao sul da Cadeia do Espinhaço, no extremo leste do Quadrilátero Ferrífero, nos Municípios de Catas Altas, Santa Bárbara e Mariana, tendo como área principal de preservação a Reserva do Patrimônio Particular Natural (RPPN) do Santuário do Caraça criada em 1994. A RPPN do Caraça juntamente com as áreas de manejo sustentável (Chácara Santa Rita, Fazenda Engenho e Fazenda Capivari) perfazem um total de 11.233 ha de área preservada. O clima da região caracteriza-se por verões amenos e chuvosos e com precipitação média anual acima de 1500 mm. Temperaturas amenas são predominantes durante todo o ano (18 a 19 °C), com a máxima raramente ultrapassando os 30 °C e a mínima podendo alcançar valores negativos, principalmente nas maiores altitudes. A Serra do Caraça possui altitudes variando de 750 a 2.072 metros sobre o mar (m.s.m.), e forma uma espécie de anfiteatro alongado constituído por vários picos, em cuja boca, voltada para o norte, fica o Santuário do Caraça com aproximadamente 1.300 m.s.m. Este último é a sede da RPPN do Santuário do Caraça. Os picos recebem denominações locais como Pico

do Sol (2.072 m.s.m.), Pico do Inficionado (2.068 m.s.m.), Pico da Carapuça (1.995 m.s.m.), entre outros. O nome “Caraça” deve-se à configuração que uma serra apresenta, semelhante ao perfil de uma enorme máscara ou caraça (Silveira, 1924).

A Serra do Caraça está incluída no bioma Mata Atlântica e possui, predominantemente, formações campestres rodeadas e encravadas por formações florestais típicas deste bioma. A vegetação é caracterizada por um mosaico de espécies vegetais de porte herbáceo ou arbustivo que crescem sobre as rochas ou nas suas fendas. O solo contido neste lugar é geralmente arenoso e escuro. Neste ecossistema é possível encontrar os seguintes tipos de vegetação florestais:

1. Mata ciliar e mata de galeria: são aquelas que acompanham cursos d’água perenes ou sazonais. As matas ciliares possuem dossel descontínuo nas duas margens do curso d’água, já a mata de galeria possui dossel contínuo. Nos locais onde pequenos afluentes deságuam no ribeirão Caraça, a composição florística da mata ciliar pode misturar-se à composição florística da mata de galeria, fazendo com que a delimitação fisionômica entre os dois tipos seja dificultada. Há na região diversos riachos que cortam afloramentos rochosos ou campos, que possuem nas suas margens somente arbustos e/ou ervas.
2. Mata nebulosa: são aquelas que estão geralmente acima de 1.900 m.s.m., dependem da alta umidade atmosférica para a sua sobrevivência e possuem um grau de caducifolia bem menor que a mata semidecídua. As matas nebulosas ocupam um espaço menor e são mais baixas que as demais formações florestais da região.
3. Mata semidecídua: são aquelas que não estão associadas a cursos d’água e que possuem um grau de caducifolia maior que as matas de galeria. Geralmente as matas semidecíduas estão nas encostas da serra e/ou associadas aos campos rupestres.

4.1.1.2. Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra Bonita

A Serra Bonita, localizada nos municípios de Camacan e Pau-Brasil ao sul da Bahia, é um dos últimos fragmentos remanescentes de Mata Atlântica de altitude do Corredor Central da Mata Atlântica. Abrange uma área de 7.500 hectares, localizada no coração da região cacauífera; a 130 km de Ilhéus e 526 km da capital da Bahia,

Salvador. A grande variação de umidade e temperatura da região se expressa em sua vegetação, que compreende desde Florestas Ombrófilas Densas com elementos de Florestas Estacionais Semidecíduais, nas partes mais baixas, até Florestas Úmidas Submontanas (matas de neblina) no alto da serra. Cerca de 50% da área é coberta por matas primárias, de grande importância biológica. O restante é formado por um mosaico de vegetação em diversos estágios de sucessão, incluindo matas secundárias com mais de 30 anos de idade e alguns fragmentos de pastos.

Localizado no centro da Serra Bonita, o Complexo RPPNs Serra Bonita é formado por quatro RPPNs: Serra Bonita, Serra Bonita I, Serra Bonita II e Serra Bonita III (2008), que no conjunto protegem uma área total de 1.800 hectares, dos quais 1.200 estão legalmente registrados junto ao IBAMA, constituindo a segunda maior área de RPPN do Corredor Central da Mata Atlântica e sendo uma referência para a proteção dos remanescentes de Mata Atlântica de altitude na região.

4.1.1.3. Reservas ambientais na região do Taquaruçu e no Centro de Pesquisa Canguçu

O Taquaruçu situa-se na região serrana do município de Palmas, no estado do Tocantins. Essa região faz parte da área rural de Palmas e está situado na Área de Proteção Ambiental (APA) Serra do Lajeado, com uma área de aproximadamente 1.500 km². Observa-se a presença de dois períodos bem distintos, o chuvoso (de outubro a março) que concentra 85% da precipitação anual total, e o período seco (de abril a setembro), com 15% da precipitação anual (THEMAG, 1996). As temperaturas médias anuais nesta região do Tocantins diminuem com o aumento da latitude, variando de 26°C ao norte até 21°C nos limites com o Estado de Goiás. Essa área também é considerada como pólo ecoturístico pelas suas belezas naturais e algumas áreas são abertas para visitas, atraindo vários turistas para o local (www.opengreenmap.org).

O Centro de Pesquisa Canguçu localiza-se no município de Pium, sudoeste do Estado do Tocantins, a 220 Km de Palmas, entre duas importantes Unidades de Conservação: o Parque Nacional do Araguaia e o Parque Estadual do Cantão. Este foi inaugurado em 05 de agosto de 1999 pelo Instituto Ecológica (ONG/Palmas) e a construção da sede foi feita por meio do sistema de palafitas devido às enchentes

sazonais, uma vez que se situa às margens do Rio Javaés, que circunda o lado leste da Ilha do Bananal. Esta área é caracterizada como região ecotonal, por apresentar características de cerrado e Floresta Amazônica. Nesta região há um grande interesse científico, tecnológico, econômico e social. Em 2003, o Instituto Ecológica estabeleceu uma parceria com a Universidade Federal de Tocantins (UFT) para gerenciamento do Centro, como meio de dar uma maior dimensão ao CPC. Atualmente se desenvolve diversas atividades voltadas ao desenvolvimento sustentável na região, por intermédio de pesquisas científicas e educação ambiental (www.site.uft.edu.br).

4.1.1.4. Reservas florestais dos municípios de São João da Baliza e Mucajaí

Os municípios de São João da Baliza (00° 56' 58''N e 59° 54' 41''W) e Mucajaí (2° 25' 48''N e 60° 55' 11''W) estão localizados no estado de Roraima, ao norte do Brasil, e possuem áreas de reservas florestais legais utilizadas em pesquisas mantidas pela EMBRAPA-Roraima. A formação vegetal dessa reservas é caracterizada por pertencer ao bioma Floresta Amazônica. Esse bioma estende-se do oceano Atlântico às encostas orientais da Cordilheira dos Andes, até aproximadamente 600 m de altitude, e está presente em nove países da América do Sul, sendo 69% de sua área pertencente ao Brasil (Ab'Saber, 1977), abrangendo os estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Acre, Amapá, Rondônia e Roraima e totalizando 4.871.000 km² de área (INPE, 2004). O clima é quente e úmido, com precipitação anual de 1.355 a 2.839 mm. A temperatura média oscila de 25,6 a 27,6 °C, com umidade relativa do ar variando de 84 a 90% ao longo do ano (Oliveira e Amaral, 2004).

A Amazônia é composta por uma série contínua de formações vegetais que são floristicamente bastante distintas. Pires (1972) aponta a ocorrência de nove tipos principais de vegetação na Amazônia, sendo que as chamadas Matas de Terra Firme ocupam cerca de 70% dessa região e são caracterizadas principalmente pela elevada riqueza e diversidade de espécies, representando o ecossistema mais conspícuo e o de maior interesse científico (Oliveira e Mori, 1999). A Floresta Amazônica de Terra Firme está implantada sobre solos bastante diversos, de fertilidade muito variável. No geral, as árvores deste ecossistema são bastante

elevadas, com copas sobrepostas, que determinam um sombreamento permanente do solo; a ciclagem da matéria orgânica e dos nutrientes é rápida e os processos de sucessão e regeneração da mata são fortemente influenciados pela capacidade das plantas de se desenvolverem na sombra; o número de espécies por área é elevado, contudo, a dominância de determinadas espécies não é, via de regra, elevada, destacando-se um grande número de espécies raras (Pires, 1972).

4.2. Obtenção das leveduras

4.2.1. Isolamento de leveduras assimiladoras de celobiose

Para o isolamento das leveduras, um grama de cada amostra de madeira em decomposição foi adicionado a tubos Falcon contendo 20 mL do meio YNB-D-celobiose [celobiose 0,5% (p/v), *Yeast Nitrogen Base* (YNB-Difco) 0,67% (p/v), cloranfenicol 0,02% (p/v) e etanol 2% (v/v)] e 20 mL do meio YNB-CMC [carboximetilcelulose 1% (p/v), celobiose 0,05% (p/v), *Yeast Nitrogen Base* 0,67% (p/v), cloranfenicol 0,02% (p/v) e etanol 2% (v/v)]. O antibiótico cloranfenicol foi usado para evitar o crescimento de bactérias, enquanto etanol foi utilizado com finalidade de selecionar leveduras fermentadoras e com certa resistência ao etanol, uma vez que essas não são o foco de estudo do trabalho. Os frascos foram incubados em agitador horizontal (modelo New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) a 150 rpm e 25 °C por 3 a 15 dias. A partir dos frascos que apresentaram crescimento positivo, caracterizado pela turvação do meio, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida a tubos contendo 5 mL dos meios utilizados anteriormente. Os tubos foram incubados sob as mesmas condições anteriores e daqueles que apresentaram crescimento, uma alçada foi semeada em placas de Petri contendo o meio ágar-YM [glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,3% (p/v), extrato de malte 0,3% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v), ágar 2% (p/v)], acrescido de 0,02% (p/v) de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C até a observação do crescimento de colônias (Santos et al., 2011, com modificações).

4.2.2. Purificação e manutenção das leveduras

Das placas que apresentaram crescimento de leveduras, uma colônia de cada morfotipo foi descrita quanto às características macroscópicas, purificada em meio ágar YM e preservada em caldo GYMP [glicose 2% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), extrato de malte 1% (p/v), Na₂PO₄ 0,2% (p/v)] com 20% (v/v) de glicerol a -80 °C. As leveduras isoladas durante o estudo foram depositadas na Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2.3. Identificação das leveduras

As leveduras obtidas foram preliminarmente agrupadas de acordo com suas características morfológicas e testes fisiológicos e bioquímicos segundo procedimento padrão (Kurtzman et al., 2011b). As leveduras com perfis fisiológicos idênticos foram submetidas à análise molecular, por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se os iniciadores EI-1 para a realização do agrupamento em perfis moleculares distintos.

4.2.3.1. Extração do DNA

Para extração do DNA total, os isolados foram crescidos em ágar YM por 24 horas à 25 °C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise [Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1% (p/v)] e incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Decorrida essa etapa do processo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado (v/v) de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao *pellet* formado foram acrescentados 200 µL de etanol 70% (v/v). Efetuou-se novamente uma centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e os tubos foram incubados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi

ressuspendido em 100 µL de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e estocado a -20 °C.

4.2.3.2. PCR fingerprinting

Para confirmação do agrupamento fisiológico das leveduras, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR utilizando-se o iniciador E11 (5'- CTGGCTTGGTGTATG-3'), segundo de Barros Lopes e colaboradores (1996, 1998). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 M (Fermentas), 1,0 µL de dNTP 10 mM, 2,0 µL do iniciador E11 a 10 pmol/µL (MWG Biotech), 100 a 250 ng de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Fermentas) e o volume final foi completado com água deionizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 45 °C por 2 minutos e extensão a 74 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5 X (54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0). Os amplicons foram previamente corados com solução de GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, ckça).

4.2.3.3. Amplificação de regiões do gene do rRNA

Das leveduras que apresentaram perfis fisiológicos e moleculares distintos um isolado foi selecionado para o seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossomal, utilizando os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão 10X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 1,5M (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM , 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol-1 (MWG Biotech), 100 a 250 ng de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Fermentas) e o volume final foi completado com água deionizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando-

se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94 °C, 25 segundos de anelamento a 54 °C e 20 segundos de extensão a 68 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 68 °C.

As amostras que não puderam ser devidamente identificadas utilizando-se somente a amplificação com os iniciadores NL-1 e NL-4 e as amostras de possíveis espécies novas, tiveram a região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA amplificada. Para isso foram utilizados os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão 10X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 1,5M (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL dos iniciadores ITS1 e ITS4 a 10 pmol-1 (MWG Biotech), 100 a 250 ng de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Fermentas) e o volume final foi completado com água deionizada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X. Os amplicons foram corados pela adição de GelRed (Biotium, USA) e os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.2.3.4. Purificação dos produtos de PCR e reação de seqüenciamento

Para purificação dos amplicons gerados pela reação de PCR foram adicionados aos tubos 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para a precipitação do DNA. Posteriormente os tubos foram centrifugados por 25 minutos a uma rotação de 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 120 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados para lavagem do sedimento. A mistura foi homogeneizada por inversão. Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado novamente. Os tubos

foram incubados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. O DNA foi então ressuspendido em 10 µL de água Milli-Q. O produto obtido foi quantificado por espectrometria, utilizando NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As reações de sequenciamento foram realizadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

4.2.3.5. Análise das seqüências

As seqüências de DNA foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI desenvolvido pelo National Center for Biotechnology (Altschul et al., 1997). As seqüências obtidas foram comparadas às seqüências já depositadas no GenBank, e as seqüências similares foram alinhadas usando o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis-MEGA-6 (Tamura et al., 2013). Isolados apresentando similaridade na seqüência analisada de 99% ou mais em relação a outro já depositado no GenBank foram considerados como pertencentes àquela espécie conhecida. Os isolados que apresentaram quatro ou mais diferenças nucleotídicas não-contíguas (similaridade menor ou igual a 98%) quando comparados às espécies mais proximamente relacionadas foram considerados potenciais novas espécies. O poder discriminatório das seqüências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA é considerado suficiente para descrever novas espécies de leveduras, pois isolados da mesma espécie apresentam de zero a no máximo de três bases diferentes não-contíguas em uma seqüência de cerca de 600 nucleotídeos (Kurtzman e Robnett, 1998a). As amostras de possíveis novas espécies foram submetidas ao sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA.

4.3. Seleção das leveduras fermentadoras de celobiose

As leveduras isoladas foram submetidas a testes de fermentação de celobiose. Para tanto, uma alçada da cultura pura e recente (24 a 48h de crescimento) da levedura cultivada em meio ágar YM foi diluída em água destilada estéril. Uma alíquota de 100 µL dessa solução de células foi inoculada

separadamente em tubos contendo 2 mL do meio YPC [celobiose 2% (p/v), peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v)]. O meio YPD [glicose 2% (p/v), peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v)] foi utilizado como controle positivo de fermentação. Os tubos foram incubados em agitador horizontal (modelo New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) sob agitação a 150 rpm e 25 °C. Alíquotas de 100 µl foram retiradas nos períodos de 24, 48 e 72 horas, e após 7 dias, centrifugadas a 13.800 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e estocado a -20 °C até a análise. O etanol produzido foi quantificado por método colorimétrico utilizando as enzimas álcool oxidase (AOD, de *Pichia pastoris*, Sigma) e peroxidase, (POD tipo I, de raiz forte, Sigma) (Alves Jr et al., 2007). O ensaio foi realizado em placas de Elisa contendo 10 µL da amostra e 200 µL do reagente enzimático (AOD 0,5 U/mL, POD 4,0 U/mL, 4-aminoantipirina 14 mM e fenol 60 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após este período foi determinada a absorbância a 505 nm utilizando o leitor de placas (Tecan Infinite M 2000). A figura 3 ilustra a reação estequiométrica da conversão de etanol para o produto quinonimina, facilmente quantificado a 505 nm, pela ação das enzimas álcool oxidase e peroxidase (Herberts, 2006). A concentração de etanol foi determinada pela correlação das absorbâncias das amostras com as absorbâncias da curva padrão contendo 0, 1, 2, 4, 5, 7, 8, e 10 g/L de etanol, construída em todas as placas analisadas.

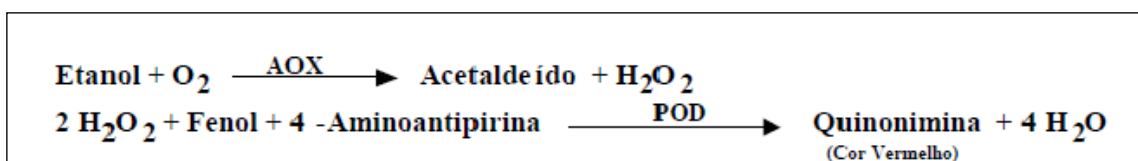


Figura 3. Método colorimétrico de detecção de etanol. **AOX:** enzima álcool oxidase, catalisa a reação de uma molécula de etanol com o oxigênio formando acetaldeído e peróxido de hidrogênio; **POD:** enzima peroxidase, catalisa a reação do e peróxido de hidrogênio com fenol e aminoantipirina, levando a formação do quinonimina, composto de cor vermelha (Herberts, 2006).

4.4. Caracterização do metabolismo fermentativo de celobiose das leveduras selecionadas

4.4.1. Determinação da atividade β -glicosídica

As leveduras selecionadas na triagem por fermentação de celobiose foram submetidas a ensaios de atividade enzimática para determinação da atividade β -glicosídica periplasmática e intracelular. A linhagem tipo da levedura *Sc. queiroziae* (UFMG-CLM5.1) foi usada como controle positivo nos testes, uma vez que essa foi descrita pela produção da enzima intracelular (Santos et al., 2011). As leveduras foram cultivadas em meio YPC (celobiose 20 g/L) à 25 °C e 150 rpm por 24 horas. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos, lavadas com água destilada a 4 °C três vezes e, posteriormente, foi feita uma suspensão celular de 20 ± 1 mg/mL em água destilada a 4 °C. O controle negativo foi feito com células previamente fervidas.

Para determinação da atividade periplasmática a suspensão celular foi incubada com o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo 2 mM (pNP β G, Sigma-Aldrich) em tampão Tris-Succinato 150 mM pH 5,0 a 30 °C por 1 minuto. Após incubação, foi adicionado aos tubos Na₂CO₃ 0,5M, de modo a parar a reação e formar p-nitrofenol, a partir do p-nitrofenil liberado na hidrólise. Este absorve luz na região do UV, na faixa de comprimento de onda $\lambda = 390 - 430$ nm (Zhang et. al., 2006).

Para determinar a atividade intracelular, as células foram previamente permeabilizadas, para permitir que o substrato seja internalizado pela célula, conforme descrito por Stambuk (1999), onde a suspensão celular foi centrifugada e ressuspendida em tampão A (Mops-NaOH 50 mM pH 6,8, Glicerol 20% (v/v), EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM), ao qual foi adicionada a solução de permeabilização [Tolueno P.A.: Etanol P.A.: Triton-X-100 10% (v/v) - 1:4:1] e homogeneizado por 1 minuto em vortex. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas em tampão A e ressuspendidas em tampão Mops-NaOH 50 mM pH 6,8. Esta suspensão de células permeabilizadas foi incubada com o substrato pNP β G 2 mM (Sigma-Aldrich) a 30 °C por 1 minuto. Após incubação, a reação foi parada por fervura a 100 °C por 5 minutos.

A reação catalisada pela enzima β -glicosidase com o substrato sintético pNP β G está representada na figura 4. A concentração de p-nitrofenol liberado em ambos os testes foi determinada a 410 nm usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{\text{pH } 9,2}=18.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{\text{pH } 7,0}=8.770 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática foi expressa em U/mL, onde uma unidade (U) da enzima corresponde a 1 μmol de pNP liberado por minuto de reação.

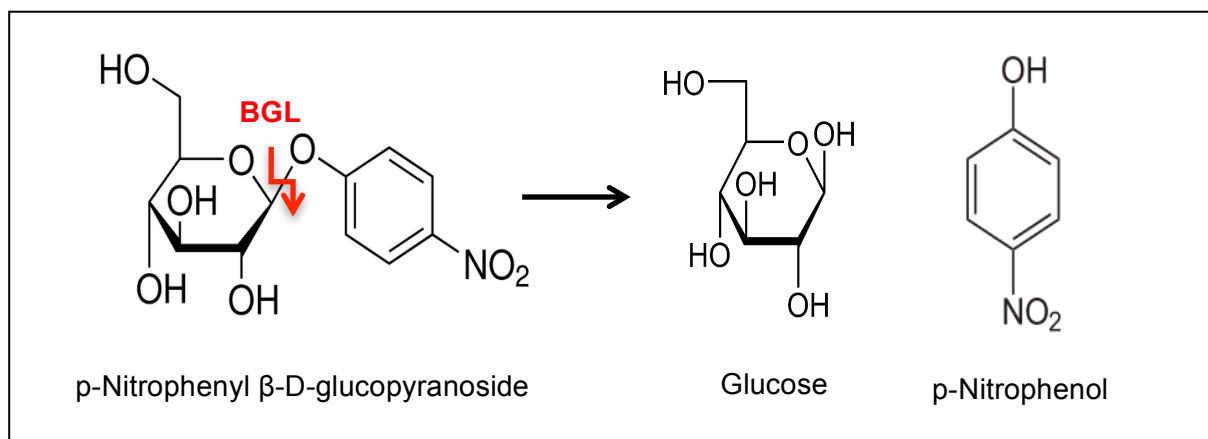


Figura 4. Ensaio enzimático de β -glicosidase com pNP β G. O substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G) é hidrolisado pela enzima β -glicosidase, representada pela abreviação **BGL**.

4.4.2. Ensaios de fermentação em escala de bancada

As leveduras que apresentaram resultado positivo no teste de fermentação e as maiores produção de etanol a partir de celobiose foram submetidas a ensaios fermentativos em escala de bancada em meio sintético.

As leveduras foram previamente cultivadas em 50 mL de meio YP contendo 20 g/L de celobiose, e incubadas em agitador horizontal (modelo New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) a 200 rpm e 30 °C por 18-24 h. Para a obtenção do inóculo, as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados destas alíquotas foram utilizados como inóculo de modo a se obter uma concentração celular inicial de 1,0 g/L. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, em frascos de 125 mL contendo 50 mL do meio YP, acrescido de celobiose 50 g/L. Os frascos foram incubados nas mesmas condições anteriores. Os ensaios foram

monitorados por meio da retirada de alíquotas das amostras a cada 12 h até 72 h de ensaio. As amostras coletadas foram utilizadas para determinação do crescimento celular, e posteriormente centrifugadas a 13.800 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo devidamente identificado e estocados a -20 °C para análises posteriores do consumo de celobiose e a produção de etanol.

4.4.3. Métodos analíticos

4.4.3.1. Determinação da concentração celular

A concentração de células dos experimentos foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm, em espectrofotômetro (*Biospectro* SP-22), correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente construída. Para construção da curva, as leveduras foram previamente crescidas, em duplicata, em meio YM sob agitação de 150 rpm a 25 °C por 24 horas. Após crescimento procedeu-se a diluição seriada das culturas, em triplicata, sendo que para cada diluição foi medida a respectiva $DO_{(600nm)}$. A determinação da massa seca de células (g/L), um volume de 10 mL das culturas, em triplicata, foi filtrado utilizando membranas de celulose-nitrato 75-80% e acetato 0,45 µm (MiliPore), e posteriormente as membranas foram submetidas a secagem em micro-ondas e pesadas em balança analítica UniBloc (Shimadzu) até obtenção de peso constante.

4.4.3.2. Determinação da concentração de açúcares e etanol

As concentrações de celobiose e etanol presentes nas alíquotas dos ensaios de fermentação foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão). As amostras foram filtradas em membrana de acetato celulose 0,22 µm e D13 mm (Sartorius). As amostras foram diluídas e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna SUPELCOGEL™ C-610H HPLC Column 30 cm x 7,8 mm (Sigma-Aldrich), mantida à

temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 10-A; fase móvel H₂SO₄ 5 mM como eluente e com fluxo de 0,6 mL/min.

4.4.3.3. Cálculo dos parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos Y_p/s (g/g, fator de conversão de celobiose em etanol), Q_p (g/L.h, produtividade volumétrica em etanol), η (%), eficiência de fermentação) e o consumo de celobiose (%) foram calculados como respostas aos ensaios experimentais. O fator de conversão de celobiose em etanol [Y_p/s (g/g)] foi calculado de acordo com Schmidell e colaboradores (2001), que correlaciona ΔP etanol produzido com ΔS substrato consumido (substrato consumido com produto obtido). A inclinação da linha através da origem fornece o valor estimado de Y_p/s . A produtividade em etanol [Q_p (g/L.h)] foi determinada pela razão entre a concentração de etanol (g/L) e o tempo de fermentação (h). A eficiência de conversão (η %) foi calculada como porcentagem do rendimento máximo teórico em etanol (0,538 g/g – g de etanol por g de celobiose) e o consumo de celobiose (%) como porcentagem de celobiose consumida a partir da concentração inicial (da Cunha-Pereira et al., 2011).

4.5. Identificação de genes relacionados ao metabolismo de celobiose em leveduras *Scheffersomyces* spp.

As etapas seguintes deste trabalho foram desenvolvidas sob co-orientação do Prof. Chris Todd Hittinger, no Laboratory of Genetics, Genetics/Biotechnology Center, na University of Wisconsin – Madison, Wisconsin, EUA. O trabalho faz parte do programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE) financiado pela CAPES.

4.5.1. Leveduras utilizadas

As linhagens tipo das leveduras *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis*, UFMG-CLM5.1 e UFMG-HMD26.3, respectivamente, foram utilizadas para sequenciamento genômico e obtenção dos genes de interesse.

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a e FM1282, cedidas pelo Prof. Chris T. Hittinger, foram utilizadas para construção dos plasmídeos de expressão, por meio da técnica de *GAP repair*, e para expressão heteróloga dos genes, respectivamente.

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* 5α (C2989 - New England BioLabs) foram utilizadas para propagação dos plasmídeos utilizados neste trabalho.

4.5.2. Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos pBM5155-NatMX e pBM5155-KanMX, cedidos pelo professor Chris T. Hittinger, conferem à levedura resistência aos antibióticos Neosertomicina e Geneticina, respectivamente, e foram utilizados para a clonagem independente dos genes. Ambos possuem marca de resistência a ampicilina para propagação dos mesmos em células bacterianas *E. coli* 5α (Sabina e Johnston, 2009).

4.5.3. Sequenciamento dos genomas

4.5.3.1. Extração de DNA

Para extração do DNA genômico, as leveduras foram inoculadas em 3 mL de meio YPD [glicose 2% (p/v), peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v)] e incubadas sob agitação por 18 horas à 25 °C. Após o crescimento, as células foram recolhidas por 5 minutos de centrifugação de 750 µL da cultura em microtubos de 1,5 mL contendo micro-esferas de vidro. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e foram adicionados às células 200 µL de tampão Tris-HCl 10mM pH 8, 200 µL de tampão de lise (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100) e 200 µL de fenol:clorofórmio (1:1). A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 4 minutos e, em seguida, centrifugada por 5 minutos à velocidade máxima. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro microtubo, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados por inversão (5-10 vezes) e mantidos a -80 °C, por no mínimo 15 minutos, para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados à velocidade máxima por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado

por inversão, e ao *pellet* formado foram acrescentados 700 µL de etanol 70%. Efetuou-se novamente uma centrifugação à velocidade máxima por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado por inversão. Os tubos foram submetidos a um *spin* por 6 segundos e o restante do sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta de 200 µL. Os tubos foram mantidos por 30 minutos à temperatura ambiente para total evaporação do etanol e, após esta etapa, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão Tris-HCl 10mM pH 8 e incubado a 60 °C por 30 minutos para total dissolução do DNA em solução. Os DNAs obtidos foram adicionados 0,5 µL de RNase A 10 mg/mL e incubados a 37 °C por 30 minutos.

4.5.3.2. Biblioteca genômica e sequenciamento por Illumina

Os DNA genômicos foram preparados para posterior sequenciamento por *Illumina Genome Analyzer* pela responsável técnica do Laboratory of Genetics – UW-Madison, Amanda Hulfachor, utilizando a metodologia de *paired-end library*, de acordo com Hittinger e colaboradores (2010). As bibliotecas de pares de leituras (*mate-pair* ou *paired-end*) possuem a vantagem de produzir duas leituras para cada fragmento de DNA, uma em cada extremidade, gerando mais informação e auxiliando o processo de montagem do genoma (Berglund et al., 2011). Na biblioteca *paired-end* foram ligados adaptadores nas extremidades dos fragmentos de DNA, adaptador P1 na região 5' e P2 na região 3'. O primeiro passo do sequenciamento foi realizado através do adaptador P1 para gerar a leitura 5' do par, e P2 para gerar a leitura 3'.

4.5.4. Obtenção dos genomas

4.5.4.1. Aquisição e processamento dos reads obtidos após o sequenciamento

Após o sequenciamento, foram gerados arquivos no format *fasta* contendo os *reads forward* e *reverse* de cada amostra. Com o número total de *reads* obtidos foi calculada a cobertura, com base no tamanho total do genoma esperado, utilizando a fórmula:

$$\frac{\text{Número total de reads} \times \text{tamanho dos reads (pb)}}{\text{Tamanho esperado do genoma (pb)}}$$

Foi utilizado como modelo o tamanho do genoma da levedura *Sc. stipitis*, 15 Kb (Jeffries et al., 2007), a qual já possui o genoma sequenciado e pertence ao mesmo gênero das espécies estudadas. A cobertura calculada dá o valor estimado de quantas vezes o genoma está sendo representado pelos *reads* obtidos. Esta é uma medida arbitrária, e é usada somente para se ter uma idéia da qualidade do sequenciamento. Considera-se que para se obter sucesso nas etapas posteriores de montagem do genoma a cobertura deve estar acima de 10 (Schatz et al., 2010).

4.5.4.2. Montagem dos genomas

Para a montagem *ab initio* dos *reads*, uma vez que esta foi a primeira vez que os genomas destas espécies foram sequenciados, o programa Velvet foi utilizado, um software para montagem de genomas utilizando sequências curtas (Zerbino e Birney, 2008). Foram testados diferentes valores do parâmetro *k-mer* entre 31 e 61 nucleotídeos variando de 10 em 10 (31, 41, 51 e 61), e aquele que gerou *contigs* mais longos e em menor quantidade foi adotado para a montagem do genoma.

4.5.5. Obtenção das sequências dos genes de interesse

4.5.5.1. Análises por tBLASTn

Os *contigs* obtidos da montagem do genoma foram utilizados para construção de um banco de dados local. Para identificar e localizar os genes que codificam para transportadores de celobiose e β -glicosidases nas espécies estudadas, as sequências dos genes HXT2.4 e BGL1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 de *Sc. stipitis*, encontradas no GenBank, foram utilizadas como genes referência. As sequências destes genes foram comparadas através de alinhamento local por tBLASTn com o banco de dados gerado para cada levedura (Altschul et al., 1990). Os resultados foram armazenados em formato tabular e utilizados como informação de entrada para o programa Artemis.

4.5.5.2. Identificação da sequência codificadora

Para anotação de cada gene encontrado por tBLASTn, as janelas abertas de leituras (ORFs – Open reading frame) foram obtidas utilizando o programa Artemis, ferramenta de navegação e anotação de genoma desenvolvida pelo Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). O programa utiliza sequências armazenadas em texto nos formatos EMBL e GENBANK ou FASTA (Rutherford et al., 2000) e foi utilizado para revisar as anotações automáticas, ao identificar os códons de início e de parada na sequência analisada.

Os genes obtidos foram ainda analisados por BLASTx, através da ferramenta on-line disponível no portal NCBI, para confirmação de que as sequências obtidas realmente codificam as proteínas de interesse, por meio de reconhecimento de motivos e domínios conservados da proteína (Altschul et al., 1997).

4.5.6. Clonagem dos genes

4.5.6.1. Amplificação dos genes

As sequências dos genes obtidos foram utilizadas para desenho manual dos iniciadores específicos para amplificação de cada gene. Os iniciadores desenhados foram analisados através da ferramenta NEB Tm calculator, disponível para utilização on-line. Às extremidades de cada iniciador foram adicionadas sequências homólogas ao sítio de clonagem do plasmídeo pBM5155 (Sabina e Johnston, 2009).

Para amplificação dos genes o DNA genômico de *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis* foram utilizados como *template* na reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µL contendo 1 unidade da enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* em tampão 1X *Phusion HF* (New England Biolabs), 200 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 250 ng de DNA. O programa utilizado para amplificação do gene HXT2.4 consiste de uma desnaturação inicial a 98 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 10 segundos de desnaturação a 98 °C, 15 segundos de anelamento a 42 °C e 2 minutos e 30 segundos de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a

72 °C. Para amplificação do gene BGL5 o mesmo programa foi utilizado e somente a temperatura de anelamento foi modificada para 49,5 °C.

4.5.6.2. Construção dos plasmídeos pela técnica “GAP repair”

A técnica *GAP repair* é utilizada para inserção de um fragmento de DNA de interesse no plasmídeo de expressão. A reação acontece por meio de recombinação homóloga catalisada pela própria maquinaria celular da levedura. O plasmídeo e o fragmento gênico devem conter regiões de homologia, assim como a levedura utilizada deve ser capaz de reconhecer essas regiões homólogas (Polish et al., 2005).

Para transformação das leveduras, a linhagem de *S. cerevisiae* W303-1a foi inoculada em 3 mL de meio YPD e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 18 horas. Após o crescimento, 1,5 mL da cultura foi inoculada em 50 mL de meio YPD em frascos Erlenmeyer de 250 mL, e incubado à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm. Após aproximadamente 4 horas foi mensurada a DO 595 nm para confirmar se estava entre 0,75 e 1,0. As células foram então recolhidas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas em 25 mL de água destilada estéril e centrifugadas novamente nas condições anteriores. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 950 µL de acetato de lítio 100 mM. Alíquotas de 100 µL da suspensão celular foram separadas em microtubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados à velocidade máxima por 1 minuto e o sobrenadante foi removido. Foi adicionado às células, 240 µL de PEG-4000 50%, 35 µL de Acetato de lítio 1M, 68 µL do amplicon direto da reação de PCR, 2 µL do plasmídeo pBM5155 previamente clivado com a enzima de restrição NotI, e 5 µL de sssDNA (DNA carreador, esperma de salmão). A mistura de transformação foi homogeneizada lentamente com auxílio de uma pipeta, incubada à 30 °C por 30 minutos e, em seguida, incubada à 42 °C por 25 minutos. Imediatamente após esta etapa, foram adicionados 600 µL de meio YPD, e os tubos foram incubados à 30 °C durante 3 horas para regeneração da integridade celular. Após a regeneração 200 µL da mistura de transformação foram plaqueados em meio seletivo YPD contendo o antibiótico correspondente, neosertromicina ou geneticina, de acordo com o

plasmídeo utilizado. As placas foram incubadas de 2 a 3 dias para observação das colônias transformantes. O plasmídeo pBM5155-NatMX foi utilizado para clonagem do gene HXT2.4, que codifica o transportador de celobiose, enquanto o plasmídeo PBM5155-KanMX foi usado na clonagem do gene BGL5, que codifica a enzima β -glicosidases.

4.5.6.3. Propagação dos plasmídeos

Os plasmídeos construídos, contendo os genes de interesse, foram recuperados por meio da extração do DNA total das leveduras transformantes obtidas pelo processo de *GAP repair*. O procedimento para extração do DNA foi realizado conforme descrito no item 4.5.3.1.

Os DNAs recuperados foram utilizados na transformação de *E. coli* 5 α por eletroporação. Alíquotas de 40 μ l das células eletrocompetentes foram misturadas a 1 μ l de cada plasmídeo recuperado. A eletroporação foi realizada em cubetas apropriadas a 1.80 kV e aproximadamente 5 ms (milissegundos). Imediatamente após, foi adicionado 1 mL de meio LB para recuperação da integridade celular, e as células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. O vetor pUC19 (New England BioLabs) foi usado como controle positivo. Os transformantes foram selecionados em meio LB ágar contendo ampicilina, e o DNA plasmídeo dos transformantes foi extraído com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

4.5.7. Expressão gênica

4.5.7.1. Obtenção dos transformantes

A linhagem de *S. cerevisiae* FM1282 foi utilizada para inserção dos plasmídeos de expressão. A transformação das leveduras foi realizada conforme procedimento descrito no item 4.5.6.2. Contudo, 68 μ l de água destilada estéril e 2 μ l do plasmídeo construído foram utilizados no lugar da reação de PCR e do plasmídeo clivado, respectivamente, conforme descrito no item anterior.

4.5.7.2. Avaliação da expressão por atividade enzimática

Para indução da expressão gênica os transformantes foram crescidos em meio YPC contendo doxicilina 0,5 µg/mL (Sabina e Johnston, 2009) e, dependendo do transformante, foi adicionado ainda ao meio os antibióticos neosertromicina e/ou geneticina, para manutenção dos plasmídeos na levedura transformante, uma vez que a não adição do antibiótico ao meio faz com que a levedura expulse o DNA plasmideal para o meio extracelular.

Para avaliação da atividade enzimática intracelular, os transformantes foram crescidos no meio correspondente contendo doxicilina. Após o crescimento, as células foram previamente permeabilizadas, para permitir que o substrato seja internalizado pela célula, conforme descrito por Stambuk (1999), onde a suspensão celular foi centrifugada e ressuspendida em tampão A (Mops-NaOH 50 mM pH 6,8, Glicerol 20% (v/v), EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM), ao qual foi adicionada a solução de permeabilização [Tolueno P.A.: Etanol P.A.: Triton-X-100 10% (v/v) - 1:4:1] e homogeneizado por 1 minuto em vortex. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas em tampão A e ressuspendidas em tampão Mops-NaOH 50 mM pH 6,8. Esta suspensão de células permeabilizadas foi incubada com o substrato pNPβG 2 mM (Sigma-Aldrich) a 30 °C. Após incubação, a reação foi parada por fervura a 100 °C por 5 minutos. A concentração de p-nitrofenol liberado foi determinada a 410 nm usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{\text{pH } 7,0} = 8.770 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática foi expressa em U/mL, onde uma unidade (U) da enzima corresponde a 1 µmol de pNP liberado por minuto de reação.

4.5.7.3. Avaliação da capacidade fermentativa dos transformantes

Os transformantes foram submetidos a ensaios de fermentação de celobiose. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em tubos falcon de 50 mL contendo 20 mL do meio SC (YNB w/o AA w/o AS (1,7 g/L), glutamato monossódico (1 g/L) e Mix de aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas (1,0 g/L)), acrescido de celobiose (20 g/L), doxicilina (0,5 µg/mL) e dos antibióticos correspondentes.

As leveduras foram previamente cultivadas em 3 mL de meio YPD contendo os antibióticos correspondentes e incubadas sob agitação a 30 °C por 48 h. Para a

obtenção do inóculo, as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados destas alíquotas foram utilizados como inóculo de modo a se obter uma DO inicial de 0,5. Os tubos foram incubados em agitador horizontal à 30 °C e 150 rpm. Os ensaios foram monitorados durante 9 dias, por meio da retirada de alíquotas de 1 mL das amostras a cada 24 h de ensaio. As amostras coletadas foram utilizadas para monitoramento do crescimento celular, por meio da DO 595 nm, e posteriormente centrifugadas a 13.800 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo devidamente identificado e estocado a -20 °C para análises posteriores do consumo de celobiose e a produção de etanol. As amostras foram enviadas para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no Great Lakes Bioenergy Research Center na University of Wisconsin, para determinação das concentrações de celobiose e etanol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e identificação das leveduras

Um total de 647 isolados de leveduras foi obtido a partir das 200 amostras de madeira em decomposição. Deste total, 73 foram isoladas das amostras coletadas no Parque do Caraça em Minas Gerais, 195 das amostras de Serra Bonita na Bahia, 196 das amostras da região do Taquaruçu e do Centro de Pesquisa Canguçu, em Tocantins, e 183 isolados das amostras coletadas nos municípios de Mucajaí e São João da Baliza, em Roraima. De acordo com o meio de isolamento utilizado, 336 isolados foram obtidos a partir do meio celobiose e 311 do meio CMC.

A tabela 1 mostra os resultados de identificação das espécies encontradas no presente trabalho, a ocorrência das espécies (número de isolados de cada espécie) e os locais de isolamento. Foram encontradas 85 espécies de leveduras já descritas pela literatura, com o predomínio das espécies *Candida boidinii* (clado *Ogataea*) com 67 isolados, *Cyberlindnera subsufficiens* com 62 isolados, *Meyerozyma guilliermondii* com 58 isolados, *Schwanniomyces polymorphus* com 32 isolados, *Candida natalensis* (clado *Kurtzmaniella*) com 28 isolados e *Debaryomyces hansenii* com 27 isolados. Considerando o local de isolamento *C. boidinii* também foi a espécie mais frequente em Serra Bonita (BA) e nos municípios de São João da Baliza e Mucajaí (RR), com 33 e 32 isolados, respectivamente; todavia, a frequência de isolamento desta espécie nas outras duas regiões foi consideravelmente menor, dois isolados no Parque do Caraça (MG) e nenhum isolado nas regiões do Taquaruçu e Canguçu (TO). A espécie *Cy. subsufficiens* só não foi encontrada no Parque do Caraça e, em contrapartida, foi a espécie encontrada com maior frequência nas regiões do Taquaruçu e Canguçu. *Debaryomyces hansenii* foi a espécie encontrada com maior frequência no Parque do Caraça, 22 dos 27 isolados no total. *Meyerozyma guilliermondii* teve um grande número de representantes nas regiões do Tocantins e de Roraima, com 25 e 29 isolados, respectivamente; sendo que, a frequência de isolamento desta espécie nas regiões de Mata Atlântica foi consideravelmente menor, quatro isolados no Parque do Caraça e nenhum isolado em Serra Bonita. *Schwanniomyces polymorphus* e *C. natalensis* foram as únicas espécies encontradas em todas as áreas amostradas ainda que predominantes de

um único local, uma vez que 26 dos 32 isolados de *Sch. polymorphus* foram encontrados nas regiões do Taquaruçu e Canguçu (TO); e 21 dos 28 isolados de *C. natalensis* foram predominante de Serra Bonita (BA).

Candida boidinii, *C. natalensis*, *Cy. subsufficiens*, *D. hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Sch. polymorphus* são espécies comumente encontradas associadas a substratos vegetais e em estado de decomposição. Linhagens de *C. boidinii* têm sido encontradas a partir da seiva de várias espécies de árvores e tecidos vegetais em decomposição (Lachance et al., 2011); *Cy. subsufficiens* já foram isoladas de solo, insetos associados a madeira em decomposição e árvores (Kurtzman, 2011b); a espécie *M. guilliermondii* já foi isolada a partir de insetos associados a madeira em decomposição, fermentações alcoólicas, flores e frutas (Kurtzman, 2011a); já linhagens de *Sch. polymorphus* e *C. natalensis* são comumente isoladas a partir de amostras de solo (Lachance et al., 2011; Suzuki e Kurtzman, 2011); enquanto *D. hansenii* é amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada em diversos substratos, como solo, folhas, ambientes marinhos e associadas a alimentos (Suzuki et al., 2011). Dentre essas espécies, com exceção de *C. boidinii*, todas são descritas como assimiladoras de celobiose (Kurtzman et al., 2011a). *Candida boidinii*, apesar de não assimilar celobiose, possui a capacidade de assimilar etanol (Lachance et al., 2011), de modo que o isolamento desta espécie pode ser explicado, uma vez que o meio utilizado para o isolamento contém etanol na sua composição (descrito no item 4.2.1); além disso, o grande número de micro-organismos presentes no substrato de isolamento capazes de metabolizar celobiose, liberando glicose no meio com o tempo de incubação, aliado à alta ocorrência dessa espécie no substrato utilizado, explicam o isolamento desta espécie no presente trabalho.

De acordo com Kurtzman e Robnett (1998a), isolados da mesma espécie apresentam somente de zero a duas diferenças na sequência de bases da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Assim, as leveduras que apresentaram três ou mais diferenças nucleotídicas não contíguas nos domínios D1/D2 quando comparadas à espécie conhecida mais proximamente relacionada podem representar novas espécies de leveduras. Nesse contexto, 48 possíveis novas espécies foram encontradas. Na tabela 2 estão representadas as espécies

novas, a espécie referência, a identidade (%) das sequências nas regiões D1/D2 e ITS com a espécie mais próxima e os números de pares de base analisados.

Três novas espécies pertencentes ao clado *Yamadazyma* foram encontradas. *Yamadazyma riverae* sp. nov. representada por quatro isolados e, filogeneticamente relacionada às espécies *C. conglobata*, *C. pseudoaaseri*, *C. andamanensis*, *Y. mexicana*, *Y. terventina*, *C. aaseri* e *C. insectorum*, foi recentemente descrita (Lopes et al., 2015). A nova espécie denominada *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. possui três isolados, filogeneticamente relacionados à *Candida pseudoaaseri*, diferindo por duas substituições no domínio D1/D2 e 21 substituições (4 *gaps*) na região ITS, e *Candida andamanensis*, com duas substituições (1 *gap*) no domínio D1/D2 e 29 substituições (8 *gaps*) na região ITS, e está em processo de descrição (Lopes et al., manuscrito em preparação). E, por último, *Yamadazyma* sp., com somente um isolado, está próxima às espécies *C. gorgasii*, *C. vrieseae*, *C. lessepsii*, *C. cerambycidarum* e *C. michaelii*, com substituições variando de 0 a duas no domínio D1/D2 e de 11 a 18 na região ITS. O gênero *Yamadazyma* foi descrito por Billon-Grand (1989), sendo que mais recente Daniel e colaboradores (2014) sugeriram, baseado em análises de sequências, que aproximadamente 40 espécies *Candida* pertencem ao clado *Yamadazyma*, podendo este representar o maior gênero dentro da família Debaryomycetaceae. Espécies do clado *Yamadazyma* têm sido isoladas de uma ampla variedade de substratos vegetais e insetos associados a plantas em decomposição (Kurtzman, 2011c).

Duas novas espécies pertencentes ao gênero *Spathaspora* foram encontradas neste trabalho. *Spathaspora hagerdaliae* sp. nov. é filogeneticamente relacionada a *C. lyxosophila* (clado *Spathaspora*) e foi descrita pela sua capacidade de fermentar xilose (Lopes et al., 2016); enquanto a segunda espécie *Spathaspora* sp. está mais próxima de *Sp. arborariae*, diferindo por 14 substituições na região D1/D2 e 36 substituições (20 *gaps*) na região ITS. O clado *Spathaspora* inclui leveduras com capacidade de fermentar xilose e com grande potencial biotecnológico no contexto de produção de xilitol e/ou etanol hemicelulósico (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Wohlbach et al., 2011). A espécie tipo *Sp. passalidarum* é considerada a melhor levedura produtora de etanol a partir de xilose, sendo considerada de grande potencial biotecnológico para produção de etanol lignocelulósico (Cadete et al., 2014). Novas espécies do gênero tem sido descritas

associadas à madeira em composição de habitats florestais brasileiros (Barbora et al., 2009; Cadete et al., 2009; 2012a, 2012b; 2013; Lopes et al., 2016). As florestas brasileiras, portanto, podem ser consideradas um habitat natural dessas leveduras e uma importante região de estudo com potencial para descrição de novas espécies do gênero.

Seis novas espécies pertencentes ao clado *Sugiyamaella* foram encontradas. As quais cinco espécies foram recentemente descritas como leveduras fermentadoras de xilose e produtoras de xilanases. As novas leveduras foram nomeadas *Sugiyamaella ayubii* sp. nov., *Su. bonitensis* sp. nov., *Su. carassanensis* sp. nov., *Su. valenteae* sp. nov. e *Su. xylolytica* sp. nov., e todas pertencem ao clado 9 proposto pela “análise de cinco genes” por Kurtzman e Robnett (2013) (Sena et al., 2017). Além dessas, mais uma nova espécie foi encontrada no presente trabalho, *Sugiyamaella* sp., filogeneticamente próxima à *Su. valdiviana* a qual difere por 12 e 15 substituições no domínio D1/D2 e na região ITS, respectivamente. O gênero *Sugiyamaella* foi proposto por Kurtzman e Robnett (2007) a partir de análises filogenéticas multigênicas. Kurtzman (2007) descreveu onze novas espécies pertencentes ao clado *Sugiyamaella* isoladas de habitats florestais, associadas a uma variedade de árvores em estados de deteriorização, dentre elas *Pinus*, *Carvalho* e *Araucaria*. Portanto, a madeira em decomposição pode ser considerada habitat natural de leveduras *Sugiyamaella* spp.. As leveduras *Su. xylanicola* (Morais et al., 2013), *Su. bahiana* sp. nov. e *Su. ligni* sp. nov. (Sena et al. 2017) também foram isoladas de madeira em decomposição e descritas com a capacidade em produzir enzimas xilanases, mostrando o potencial destas para degradação de hemicelulose, um dos componentes da biomassa lignocelulósica.

Outro grupo predominante entre as espécies novas foi o clado *Wickerhamomyces*, do qual seis novas espécies foram encontradas. A espécie *Wickerhamomyces* sp.1, com 10 isolados, é mais próxima a *C. quercuum*, com 29 substituições (6 *gaps*) no domínio D1/D2 e idêntica à linhagem *Candida* sp. NRRL Y-27127 já depositada no GenBank (EF550293). *Candida* sp. NRRL Y-27127 fez parte das análises utilizadas para descrição do gênero *Wickerhamomyces* (Kurtzman et al., 2008), porém essa espécie ainda não foi descrita formalmente. *Wickerhamomyces* sp.2, com dois isolados, difere por 10 substituições no domínio D1/D2 de *W. chaumierensis*. Já as espécies *Wickerhamomyces* sp.3 e

Wickerhamomyces sp.6 são ambas mais próximas à espécie *C. quercuum* com 31 e 52 substituições no domínio D1/D2, respectivamente. *Wickerhamomyces* sp.4 e *Wickerhamomyces* sp.5 diferem de *W. rabaulensis* e *W. anomalus* com 18 e seis substituições no domínio D1/D2, respectivamente. As quatro últimas novas espécies de *Wickerhamomyces* tiveram um isolado cada. Embora as espécies *Wickerhamomyces* sp.1, *Wickerhamomyces* sp.3 e *Wickerhamomyces* sp.6 sejam todas mais próximas à mesma espécie, *C. quercuum*, estas diferem entre si molecularmente. *Wickerhamomyces* sp.1 é diferente por sete e 40 substituições no domínio D1/D2 de *Wickerhamomyces* sp.3 e *Wickerhamomyces* sp.6, respectivamente; e as duas últimas diferem entre si por 42 substituições (7 gaps) no domínio D1/D2. O gênero *Wickerhamomyces* foi descrito por Kurtzman e colaboradores (2008) quando um grupo de espécies, anteriormente descritas como *Pichia*, foi transferido para este gênero. Espécies do gênero *Wickerhamomyces* são frequentemente isoladas de árvores em geral, porém algumas espécies estão relacionadas a uma ampla variedade de substratos (Kurtzman, 2011d).

Seis espécies novas do gênero *Galactomyces* foram identificadas. As espécies *Galactomyces* sp.1, com três isolados, *Galactomyces* sp.2 e *Galactomyces* sp.3, com um isolado cada, são mais próximas à espécie *Gal. pseudocandidum* e diferem desta por 14, 10 e oito pares de base no domínio D1/D2, respectivamente; já as espécies *Galactomyces* sp.4, com três isolados, e *Galactomyces* sp.5, com dois isolados, são mais próximas à *Gal. geotrichum* diferindo desta por 13 e 11 pares de base no domínio D1/D2, respectivamente; enquanto *Galactomyces* sp.6, com dois isolados, difere por 12 pares de base no domínio D1/D2 da espécie *Geotrichum europaeum*. Todas as seis espécies novas diferem entre si molecularmente. Espécies do gênero *Galactomyces* têm sido isoladas de ampla variedade de substratos, como solo, plantas em decomposição, madeira, frutos, produtos lácteos, intestino de insetos, entre outros (de Hoog e Smith, 2011).

Novas espécies de leveduras pertencentes ao clado *Clavispora* também foram encontradas. Sete novas espécies e todas com um isolado cada foram identificadas. *Clavispora* sp.1 é mais próxima a *C. inulinophila* e difere por 19 substituições no domínio D1/D2; *Clavispora* sp.2 apresenta 64 substituições no domínio D1/D2 em relação a espécie mais próxima, *C. ubatubensis*; *Clavispora* sp.3 é diferente em 54 pares de base do domínio D1/D2 de *C. sharkensis*; *Clavispora*

sp.4 possui 46 substituições em relação ao domínio D1/D2 de *C. flosculorum*; *Clavispora* sp.5 é mais próxima a *C. inulinophila* diferindo em 51 substituições no domínio D1/D2; *Clavispora* sp.6 difere em 26 pares de base no domínio D1/D2 de *C. bromeliacearum* e, por fim, *Clavispora* sp.7 é mais próxima a *Cl. lusitanae* com 32 substituições no domínio D1/D2 e idêntica à linhagem *Candida* sp. NRRL Y-17678 já depositada no GenBank (AF017237), mas que ainda não foi descrita formalmente. O gênero *Clavispora* foi descrito por de Miranda (1979) e pertence à família Metschnikowiaceae. Diversas espécies de *Candida* previamente consideradas pertencentes ao clado *Metschnikowia/Clavispora* foram reclassificadas por meio de análises filogenéticas e identificadas como membros do clado *Clavispora* (Daniel et al., 2014). As duas espécies conhecidas do gênero são associadas com material vegetal e insetos. No entanto, *Cl. lusitanae* tem também importância clínica, sendo considerada uma espécie oportunista (Lachance, 2011).

Duas novas espécies pertencentes ao gênero *Kazachstania* foram encontradas. A nova espécie nomeada *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov., com quatro isolados, é filogeneticamente relacionada à *K. exigua* e foi recentemente descrita junto com outras duas novas espécies do clado, isoladas de fermento francês e amostras de solo da África do Sul (Jacques et al., 2016). Enquanto a nova espécie *Kazachstania* sp., com um único isolado, é filogeneticamente relacionada à *K. unispora* com 4 substituições no domínio D1/D2 e 34 substituições na região ITS. Duas novas espécies *Pichia* também foram identificadas, com um isolado cada, denominadas *Pichia* sp.1 e *Pichia* sp.2, são mais próximas às espécies *P. norvegensis* e *C. californica*, e diferem em 32 e 9 pares de base no domínio D1/D2, respectivamente; sendo que a espécie *Pichia* sp.2 é idêntica à linhagem *Pichia* sp. UWO(PS)99-305.1 já depositada no GenBank (AF322059), mas que ainda não foi descrita formalmente. Novas espécies ainda encontradas foram *Kurtzmaniella* sp., com cinco isolados, relacionada à *C. natalensis* com 11 substituições no domínio D1/D2 e 30 substituições na região ITS; *Spencermartinsiella* sp., com três isolados, relacionada à *Spen. europaea* com 17 substituições no domínio D1/D2; e *Saturnispora* sp., com dois isolados, relacionada à *C. sekii* com 10 substituições no domínio D1/D2 e idêntica à linhagem *Saturnispora* sp. UFMG-IA38.2, já depositada no GenBank (KC832480).

Todas as outras espécies novas identificadas neste trabalho são representadas por apenas um isolado. *Cyberlindnera tropicalis* f.a., sp. nov., próxima a *Cy. mengyuniae*, foi recentemente descrita junto a uma segunda linhagem isolada de amostra de solo da Tailândia (Boontham et al. 2017). *Scheffersomyces stambukii* sp. nov. está em fase de descrição, é filogeneticamente relacionada a *Sc. stipitis* diferindo em 20 pares de base no domínio D1/D2 (Lopes et al., manuscrito em preparação). As demais são *Blastobotrys* sp. diferente de *B. mokoennai* em 9 pares de base no domínio D1/D2; *Hyphopichia* sp. que difere por 46 substituições no domínio D1/D2 da espécie *C. homilentoma*; *Lodderomyces* sp. diferente de *C. albicans* em 48 pares de base no domínio D1/D2; *Metschnikowia* sp. próxima à *M. shivogae* com 53 substituições no domínio D1/D2; *Phaffomyces* sp. próxima à *C. orba* com 44 substituições no domínio D1/D2; *Starmera* sp. que difere por 14 pares de base de *C. berthetii*; *Wickerhamiella* sp. diferente por 35 substituições de *C. sorbophila*; e por último, *Candida* sp.1 e *Candida* sp.2 que são filogeneticamente relacionadas as espécies *C. cylindracea* e *C. bentonensis*, diferindo por nove e 17 pares de base, respectivamente. Sendo que a última é igual à linhagem *Candida* sp. UWO(PS)00-168.1, já depositada no GenBank (AF530620) mas que ainda não foi descrita formalmente.

A alta taxa de isolamento de espécies novas neste trabalho ressaltam o potencial da madeira em decomposição como substrato de isolamento, bem como a importância de estudos científicos que envolvam trabalhos de pesquisas nos ecossistemas brasileiros, os quais abrigam uma enorme diversidade biológica.

Tabela 1. Identificação e ocorrência das espécies de leveduras isoladas nos ecossistemas brasileiros estudados.

Espécie	Local de isolamento				Total
	Caraça (n=50)	Serra Bonita (n=50)	Tocantins (n=50)	Roraima (n=50)	
<i>Ambrosiozyma ambrosiae</i>			1		1
<i>Ambrosiozyma monospora</i>			1		1
<i>Barnettozyma californica</i>		4			4
<i>Blastobotrys</i> sp. ¹	1				1
<i>Candida akabanensis</i> (clado <i>Clavispora</i>)				2	2
<i>Candida blattae</i> (clado <i>Clavispora</i>)	1			14	15
<i>Candida intermedia</i> (clado <i>Clavispora</i>)		1	1	4	6
<i>Candida pseudointermedia</i> (clado <i>Clavispora</i>)				1	1
<i>Candida homilentoma</i> (clado <i>Hyphopichia</i>)			2	1	3
<i>Candida natalensis</i> (clado <i>Kurtzmaniella</i>)	1	21	5	1	28
<i>Candida quercitrusa</i> (clado <i>Kurtzmaniella</i>)			2	1	3
<i>Candida albicans</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)		3	1	1	5
<i>Candida orthopsilosis</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)	2			12	14
<i>Candida sanyaensis</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)				2	2
<i>Candida sojae</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)		9		1	10
<i>Candida tropicalis</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)			2	7	9
<i>Candida melibiosica</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)	6	4	1		11
<i>Candida picinguabensis</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)		1			1
<i>Candida edaphicus</i> (clado <i>Nakaseomyces</i>)	1				1
<i>Candida heliconiae</i> (clado <i>Nakazawaea</i>)		7			7
<i>Candida boidinii</i> (clado <i>Ogataea</i>)	2	33		32	67
<i>Candida diversa</i> (clado <i>Saturnispora</i>)		1			1
<i>Candida silvae</i> (clado <i>Saturnispora</i>)		10		2	12
<i>Candida berthetii</i> (clado <i>Starmera</i>)		1			1
<i>Candida peoriensis</i> (clado <i>Wickerhamomyces</i>)			1		1
<i>Candida gorgasii</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)		2	1		3
<i>Candida jaroonii</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)	1			3	4
<i>Candida michaelii</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)			2	4	6
<i>Candida tallmaniae</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)				1	1
<i>Candida tammaniensis</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)	1		1		2
<i>Candida asiatica</i> (basal ao clado <i>Saturnispora</i>)			4		4
<i>Candida catenulata</i> (basal ao clado <i>Kodamaea</i>)			1		1
<i>Candida cylindracea</i> (basal ao clado <i>Ogataea</i>)			4		4
<i>Candida ghanaensis</i> (basal ao clado <i>Zygoascus</i>)				1	1
<i>Candida palmioleophila</i> (clado <i>Candida glabrosa</i>)		7			7

Tabela 1. (Continuação)

Espécie	Local de isolamento				Total
	Caraça (n=50)	Serra Bonita (n=50)	Tocantins (n=50)	Roraima (n=50)	
<i>Candida</i> sp.1 ¹ (basal clado <i>Ogataea</i>)		1			1
<i>Candida</i> sp.2 ¹ (basal clado <i>Yarrowia</i>)			1		1
<i>Clavispora</i> sp.1 ¹		1			1
<i>Clavispora</i> sp.2 ¹		1			1
<i>Clavispora</i> sp.3 ¹		1			1
<i>Clavispora</i> sp.4 ¹				1	1
<i>Clavispora</i> sp.5 ¹		1			1
<i>Clavispora</i> sp.6 ¹				1	1
<i>Clavispora</i> sp.7 ¹		1			1
<i>Cryptococcus humicola</i>			4		4
<i>Cryptococcus laurentii</i>			6		6
<i>Cryptococcus ramirezgomezianus</i>		2			2
<i>Cyberlindnera subsufficiens</i>		18	28	16	62
<i>Cyberlindnera tropicalis</i> f.a., sp. nov. ¹				1	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	22		5		27
<i>Debaryomyces nepalensis</i>		2			2
<i>Galactomyces candidus</i>		1	3	1	5
<i>Galactomyces</i> sp.1 ¹			3		3
<i>Galactomyces</i> sp.2 ¹		1			1
<i>Galactomyces</i> sp.3 ¹				1	1
<i>Galactomyces</i> sp.4 ¹			1	2	3
<i>Galactomyces</i> sp.5 ¹			2		2
<i>Galactomyces</i> sp.6 ¹		2			2
<i>Geotrichum klebahnii</i>		2			2
<i>Geotrichum silvicola</i>				1	1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>			3		3
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1	7		2	10
<i>Hyphopichia</i> sp. ¹			1		1
<i>Kazachstania exigua</i>	1	2			3
<i>Kazachstania serrabonitensis</i> sp. nov. ¹		3		1	4
<i>Kazachstania</i> sp. ¹		1			1
<i>Kazachstania unispora</i>	2				2
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1		3	1	5
<i>Kuraishia piskuri</i>	1		7		8
<i>Kurtzmaniella</i> sp. ¹			5		5
<i>Kwoniella mangroviensis</i>			3		3

Tabela 1. (Continuação)

Espécie	Local de isolamento				Total
	Caraça (n=50)	Serra Bonita (n=50)	Tocantins (n=50)	Roraima (n=50)	
<i>Lodderomyces</i> sp. ¹			1		1
<i>Metschnikowia</i> sp. ¹			1		1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	4		25	29	58
<i>Millerozyma acaciae</i>			1		1
<i>Nakazawaea siamensis</i>				1	1
<i>Ogataea wangdongensis</i>			2		2
<i>Phaffomyces</i> sp. ¹		1			1
<i>Pichia kluyveri</i>		1			1
<i>Pichia manshurica</i>	3	2		10	15
<i>Pichia membranifaciens</i>				1	1
<i>Pichia occidentalis</i>	1			1	2
<i>Pichia</i> sp. ¹				1	1
<i>Pichia</i> sp. ²				1	1
<i>Pichia sporocuriosa</i>				4	4
<i>Pichia terricola</i>			1		1
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i>			1		1
<i>Rhodosporidium toruloides</i>			3		3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				1	1
<i>Saturnispora dispersa</i>		1			1
<i>Saturnispora</i> sp. ¹				2	2
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>			1	1	2
<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	1	1			2
<i>Scheffersomyces shehatae</i>		2	1		3
<i>Scheffersomyces stambukii</i> sp. nov. ¹				1	1
<i>Scheffersomyces stipitis</i>		11	2		13
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	2	3	26	1	32
<i>Spathaspora materiae-similar</i>			1		1
<i>Spathaspora hagerdaliae</i> f.a., sp. nov. ¹	1				1
<i>Spathaspora</i> sp. ¹			1		1
<i>Spencermartinsiella ligniputridi</i>	1	1			2
<i>Spencermartinsiella</i> sp. ¹	1	1		1	3
<i>Starmera</i> sp. ¹	1				1
<i>Sugiyamaella ayubii</i> f.a., sp. nov. ¹	2				2
<i>Sugiyamaella bonitensis</i> f.a., sp. nov. ¹		1			1
<i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i>	1				1
<i>Sugiyamaella carassanensis</i> f.a., sp. nov. ¹	1				1

Tabela 1. (Continuação)

Espécie	Local de isolamento				Total
	Caraça (n=50)	Serra Bonita (n=50)	Tocantins (n=50)	Roraima (n=50)	
<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1		1		2
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	1		1		2
<i>Sugiyamaella</i> sp. ¹		1			1
<i>Sugiyamaella valenteae</i> f.a., sp. nov. ¹			1		1
<i>Sugiyamaella xylanicola</i>	4				4
<i>Sugiyamaella xylolytica</i> f.a., sp. nov. ¹	1			1	2
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1		1		2
<i>Torulaspota globosa</i>				1	1
<i>Trichosporon asahii</i>			3		3
<i>Trichosporon chiarellii</i>			1		1
<i>Trichosporon laibachii</i>		1	1		2
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>			1	1	2
<i>Trichosporon siamense</i>			1		1
<i>Wickerhamiella</i> sp. ¹		1			1
<i>Wickerhamomyces pijperi</i>		12			12
<i>Wickerhamomyces</i> sp.1 ¹	1	1	8		10
<i>Wickerhamomyces</i> sp.2 ¹		2			2
<i>Wickerhamomyces</i> sp.3 ¹			1		1
<i>Wickerhamomyces</i> sp.4 ¹			1		1
<i>Wickerhamomyces</i> sp.5 ¹				1	1
<i>Wickerhamomyces</i> sp.6 ¹		1			1
<i>Wickerhamomyces strasburgensis</i>	1				1
<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>			1		1
<i>Yamadazyma riverae</i> sp. nov. ¹			4		4
<i>Yamadazyma cellobiosica</i> sp. nov. ¹				3	3
<i>Yamadazyma</i> sp. ¹			1		1

¹Novas espécies de leveduras

Tabela 2. Identificação das novas espécies encontradas.

Espécie	Linhagens (UFMG-CM-)	Espécie mais próxima (GenBank D1D2/ITS)	Identidade das sequências %		Acesso no GenBank	Referência
<i>Blastobotrys</i> sp.	Y2707	<i>Blastobotrys mokoena</i> (DQ442694/DQ898171)	D1/D2	564/573 (98%)	KT377030	
			ITS	445/480 (93%)	KT377031	
<i>Candida</i> sp.1	Y2956	<i>Candida cylindracea</i> (U45823)	D1/D2	555/564 (98%)	-	
<i>Candida</i> sp.2	Y2876	<i>Candida bentonensis</i> (FN428870)	D1/D2	322/339 (95%)	-	
<i>Clavispora</i> sp.1	Y3100	<i>Candida inulinophila</i> (AB550104)	D1/D2	319/338 (94%)	-	
<i>Clavispora</i> sp.2	Y3120	<i>Candida ubatubensis</i> (AY695395/HM156532)	D1/D2	451/515 (88%)	-	
			ITS	177/190 (93%)		
<i>Clavispora</i> sp.3	Y2963	<i>Candida sharkensis</i> (GU592922)	D1/D2	502/556 (90%)	-	
<i>Clavispora</i> sp.4	Y3235	<i>Candida floscolorum</i> (EF137918)	D1/D2	403/449 (90%)	-	
			ITS	662/777 (85%)		
<i>Clavispora</i> sp.5	Y2950	<i>Candida inulinophila</i> (AB550104)	D1/D2	430/481 (89%)	-	
<i>Clavispora</i> sp.6	Y3243	<i>Candida bromeliacearum</i> (AY695394)	D1/D2	335/361 (93%)	-	
<i>Clavispora</i> sp.7	Y3128	<i>Clavispora lusitaniae</i> (U44817/AY174089)	D1/D2	335/367 (91%)	-	
			ITS	351/384 (91%)		
<i>Cyberlindnera tropicalis</i> f.a., sp. nov.	Y3283	<i>Cyberlindnera mengyuniae</i> (AB741072/	D1/D2	579/591(98%)	KT377032	Boontham et al. 2017
			ITS		KT377033	

Tabela 2. (Continuação)

Espécie	Linhagem (UFMG-CM-)	Espécie mais próxima (GenBank D1D2/ITS)	Identidade das sequências %	Acesso no GenBank	Referencia
<i>Galactomyces</i> sp.1	Y2787, Y2800, Y2855	<i>Galactomyces pseudocandidum</i> (JN974277/JN974291)	D1/D2 544/558 (97%)	-	
			ITS 431/445 (97%)		
<i>Galactomyces</i> sp.2	Y3119	<i>Galactomyces pseudocandidum</i> (JN974277/JN974291)	D1/D2 550/560 (98%)	-	
			ITS 360/380 (95%)		
<i>Galactomyces</i> sp.3	Y3177	<i>Galactomyces pseudocandidum</i> (JN974277/JN974291)	D1/D2 583/591 (99%)	-	
			ITS 456/471 (97%)		
<i>Galactomyces</i> sp.4	Y2816, Y3248, Y3261	<i>Galactomyces geotrichum</i> (U40118/GQ458034)	D1/D2 533/546 (98%)	-	
			ITS 640/677 (95%)		
<i>Galactomyces</i> sp.5	Y2895, Y2926	<i>Galactomyces geotrichum</i> (U40118/GQ458034)	D1/D2 487/498 (98%)	-	
			ITS 463/482 (96%)		
<i>Galactomyces</i> sp.6	Y2982, Y3021	<i>Geotrichum europaeum</i> (JN974275)	D1/D2 525/537 (98%)	-	
<i>Hyphopichia</i> sp.	Y2901	<i>Candida homilentoma</i> (U45716)	D1/D2 308/354 (87%)	-	
<i>Kazachstania serrabonitensis</i> sp. nov.	Y273, Y451, Y452, Y3305	<i>Kazachstania exigua</i> (U68553/NR_111256)	D1/D2 565/569 (99%)	KF582608	Jacques et al. 2016
			ITS 563/692 (81%)	KF582610	
<i>Kazachstania</i> sp.	Y2951	<i>Kazachstania unispora</i> (U68554/AJ229065)	D1/D2 565/569 (99%)	KT377034	
			ITS 614/648 (95%)	KT377035	
<i>Kurtzmaniella</i> sp.	Y272, Y447, Y448, Y449, Y450	<i>Candida natalensis</i> (U45818/KC542314)	D1/D2 521/532 (98%)	KF582609	
			ITS 508/538 (94%)	KF582611	

Tabela 2. (Continuação)

Espécie	Linhagens (UFMG-CM-)	Espécie mais próxima (GenBank D1D2/ITS)	Identidade das sequências %	Acesso no GenBank	Referencia
<i>Lodderomyces</i> sp.	Y2822	<i>Candida albicans</i> (U45776/L28817)	D1/D2 526/574 (92%)	-	
			ITS 414/477 (87%)		
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y2835	<i>Metschnikowia shivogae</i> (DQ266431)	D1/D2 343/396 (87%)	-	
<i>Phaffomyces</i> sp.	Y3149	<i>Candida orba</i> (AF229034)	D1/D2 310/354 (88%)	-	
<i>Pichia</i> sp.1	Y3217	<i>Pichia norvegensis</i> (U75730)	D1/D2 395/427 (93%)	-	
<i>Pichia</i> sp.2	Y335	<i>Candida californica</i> (DQ104729/JX188104)	D1/D2 518/527 (98%)	KT377036	
			ITS 440/493 (89%)		
<i>Saturnispora</i> sp.	Y440, Y3215	<i>Candida sekii</i> (DQ404448)	D1/D2 522/532 (98%)	-	
<i>Scheffersomyces stambukii</i> sp. nov.	Y427	<i>Scheffersomyces stipitis</i> (U45741/CP000497)	D1/D2 521/541 (96%)	KT033720	
			ITS 580/658 (88%)		
<i>Spathaspora hagerdaliae</i> f.a., sp. nov.	Y424	<i>Candida lyxosophila</i> (U45801)	D1/D2 546/565 (97%)	KR184129	Lopes et al. 2016
<i>Spathaspora</i> sp.	Y425	<i>Spathaspora arborariae</i> (HQ263369/NR_111592)	D1/D2 466/475 (98%)	KR184130	
			ITS 374/410 (91%)		
<i>Spencermartinsiella</i> sp.	Y453, Y454, Y3197	<i>Spencermartinsiella europaea</i> (GU597325/NR_111481)	D1/D2 563/580 (97%)	KT377037	
			ITS 472/568 (83%)		
<i>Starmera</i> sp.	Y2723	<i>Candida berthetii</i> (U62298/NR_077118)	D1/D2 394/408 (97%)	-	
			ITS 293/304 (87%)		

Tabela 2. (Continuação)

Espécie	Linagens (UFMG-CM-)	Espécie mais próxima (GenBank D1D2/ITS)	Identidade das sequências %		Acesso no GenBank	Referencia
<i>Sugiyamaella ayubii</i> f.a., sp. nov.	Y434, Y607	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i> (DQ438198/NR_119622)	D1D2	508/574 (89%)	KR184132	Sena et al. 2017
			ITS	250/300 (83%)	KR184133	
<i>Sugiyamaella bonitensis</i> f.a., sp. nov.	Y608	<i>Sugiyamaella bullrunensis</i> (HM208601/NR_111543)	D1D2	542/578 (94%)	KT006004	Sena et al. 2017
			ITS	403/458 (88%)	KT006005	
<i>Sugiyamaella carassanensis</i> f.a., sp. nov.	Y606	<i>Sugiyamaella americana</i> (DQ438193/HM208605)	D1D2	529/565 (94%)	KX550111	Sena et al. 2017
			ITS	237/244 (97%)		
<i>Sugiyamaella valenteae</i> f.a., sp. nov.	Y609	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i> (DQ438198/NR_119622)	D1D2	471/519 (91%)	KT005999	Sena et al. 2017
			ITS	246/293 (84%)	KT006000	
<i>Sugiyamaella xylolytica</i> f.a., sp. nov.	Y432, Y433	<i>Sugiyamaella novakii</i> (AY618511/NR_111235)	D1D2	557/565 (99%)	KF889433	Sena et al. 2017
			ITS	420/465 (90%)	KU214874	
<i>Sugiyamaella</i> sp.	Y610	<i>Sugiyamaella valdiviana</i> (U45835/NR_111544)	D1D2	501/513 (98%)	KT006002	
			ITS	386/401 (96%)	KT006003	
<i>Wickerhamiella</i> sp.	Y3041	<i>Candida sorbophila</i> (U45852/ DQ911460)	D1D2	451/486 (93%)		
			ITS	228/256 (89%)		
<i>Wickerhamomyces</i> sp.1	Y2677, Y2752, Y2759, Y2786, Y2805, Y2826, Y2828, Y2900, Y2923, Y3095	<i>Candida quercuum</i> (U70184)		430/459 (94%)		
<i>Wickerhamomyces</i> sp.2	Y3071, Y3151	<i>Wickerhamomyces chaumierensis</i> (HM156533)	D1D2	426/436 (98%)		

Tabela 2. (Continuação)

Espécie	Linhagens (UFMG-CM-)	Espécie mais próxima (GenBank D1D2/ITS)	Identidade das sequências %	Acesso no GenBank	Referência
<i>Wickerhamomyces</i> sp.3	Y2930	<i>Candida quercuum</i> (U70184)	D1/D2 374/405 (92%)	-	
<i>Wickerhamomyces</i> sp.4	Y2889	<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i> (U75423/AY790541)	D1/D2 448/466 (96%) ITS 317/349 (91%)	-	
<i>Wickerhamomyces</i> sp.5	Y3312	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (U74592/ AY046221)	D1/D2 564/570 (99%) ITS 478/534 (90%)	-	
<i>Wickerhamomyces</i> sp.6	Y3039	<i>Candida quercuum</i> (U70184)	D1/D2 480/532 (90%)	-	
<i>Yamadazyma riverae</i> sp. nov.	Y442, Y443, Y444, Y445	<i>Yamadazyma mexicana</i> (U45797/AB054110)	D1/D2 523/531 (98%) ITS 448/501 (89%)	KP900043 KP900044	Lopes et al. 2015
<i>Yamadazyma cellobiosica</i> sp. nov.	Y3169, Y3233, Y3250	<i>Candida pseudoaaseri</i> (JN241689/JN241686)	D1/D2 503/505 (99%) ITS 478/499 (96%)	-	
<i>Yamadazyma</i> sp.	Y2853	<i>Candida gorgasii</i> (AY520300/AY964670)	D1/D2 384/384 (100%) ITS 522/535 (98%)	-	

5.2. Leveduras fermentadoras de celobiose

Dentre os 647 isolados testados quanto à fermentação de celobiose, 53 produziram etanol. Os isolados fermentadores correspondem a 17 espécies diferentes, sendo 14 espécies já conhecidas e três espécies novas. A tabela 3 mostra as leveduras fermentadoras, a média e o tempo de produção de etanol e o número de isolados fermentadores para cada espécie. Os ensaios foram realizados somente uma vez, portanto sem repetição biológica, sendo assim, as médias e os desvios padrão listados na tabela 3 representam a variação de produção de etanol dentre os isolados fermentadores da mesma espécie. As espécies que apresentaram os melhores desempenhos em fermentar celobiose, ao produzirem as maiores concentrações de etanol, foram *Sc. queiroziae* ($6,68 \pm 0,55$ g/L), *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. ($5,93 \pm 1,67$ g/L), *Sc. amazonensis* ($5,16 \pm 0,95$ g/L), *H. opuntiae* ($4,09 \pm 0,68$ g/L), *C. jaroonii* ($3,88 \pm 1,23$ g/L) e *C. tammaniensis* ($3,80 \pm 1,30$ g/L). Sendo assim, estas seis espécies foram selecionadas para os ensaios posteriores. As leveduras *W. strasburgensis* e *C. sojae* também produziram etanol, porém em menor concentração, $1,88$ e $0,99 \pm 0,25$ g/L de etanol, respectivamente; contudo, somente um isolado de *W. strasburgensis* e somente três dos dez isolados de *C. sojae* encontrados foram capazes de produzir etanol. Ainda após 72 horas, a produção de etanol foi observada para *H. uvarum* ($2,73 \pm 1,00$ g/L), *D. hansenii* ($2,53 \pm 2,18$ g/L), *Ku. piskuri* ($1,96 \pm 0,54$ g/L), *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. ($1,32 \pm 0,21$ g/L), *W. pijperi* ($1,15 \pm 0,10$ g/L) e *M. guilliermondii* ($1,04 \pm 0,21$ g/L). O alto desvio padrão observado na produção de etanol por *D. hansenii* ($2,53 \pm 2,18$ g/L) se deve à variação na capacidade fermentativa dentre os isolados desta espécie, dos 27 isolados somente nove produziram etanol e dentre estes nove isolados houve uma grande variação na concentração de etanol produzida. Esta mesma discrepância na capacidade fermentativa foi observada para levedura *M. guilliermondii*, uma vez que dos 58 isolados somente seis produziram etanol. Por fim, a produção de etanol pelas leveduras *Su. boreocaroniense* ($1,93$ g/L), *Starmera* sp. ($1,30$ g/L) e *Su. xylanicola* ($1,10 \pm 0,21$ g/L) foi observada somente após 7 dias de ensaio.

As leveduras *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis* foram primeiramente isoladas a partir de madeira em decomposição de ecossistemas florestais brasileiros, e

descritas com a capacidade de fermentar celobiose (Cadete et al., 2012a; Santos et al., 2011). No entanto, nenhum estudo foi realizado avaliando os parâmetros fermentativos de celobiose para estas leveduras. A espécie *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. foi isolada pela primeira vez neste trabalho e é filogeneticamente relacionada às espécies *C. pseudoaaseri* e *C. andamanensis*. As leveduras do clado *Yamadazyma* são assimiladoras de celobiose (Kurtzman, 2011c), incluindo as duas citadas acima (Am-In et al., 2011; Pfüller et al., 2011), mas nada se sabe em relação à fermentação deste açúcar por estas leveduras. Contudo, neste trabalho, foi observada outras duas leveduras pertencentes ao clado *Yamadazyma*, *C. tammaniensis* e *C. jaronii*, capazes de produzir etanol a partir de celobiose. Ambas foram descritas associadas a insetos (Imanishi et al., 2008; Kurtzman e Robnett, 1998b) e nenhum relato da capacidade fermentativa de celobiose por essas leveduras foi encontrado. Os resultados preliminares obtidos nesta triagem indicam um possível potencial de leveduras do clado *Yamadazyma* na fermentação de celobiose e abrem perspectivas para avaliação do potencial fermentativo das mesmas. *Hansenispora opuntiae* assimila celobiose (Kurtzman et al. 2011a), porém nada se sabe sobre a capacidade desta levedura em fermentar este açúcar. Sendo assim, os isolados fermentadores das espécies *Sc. queiroziae*, *Sc. amazonensis*, *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov., *C. jaronii*, *C. tammaniensis* e *H. opuntiae* foram selecionadas para os estudos posteriores de avaliação do metabolismo fermentativo de celobiose, uma vez que pouco se sabe sobre o potencial biotecnológico das mesmas e que estas espécies produziram as maiores concentrações de etanol a partir de celobiose.

Tabela 3. Identificação, produção de etanol e número de isolados fermentadores por espécie de levedura.

Espécie	Etanol (g/L)	Tempo (dias)	Isolados fermentadores	Total de isolados
<i>Candida sojae</i>	0,99 ± 0,25	2	3	10
<i>Candida jaronii</i>	3,88 ± 1,23	2	3	4
<i>Candida tammaniensis</i>	3,80 ± 1,30	2	1	2
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2,53 ± 2,18	3	9	27
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	4,09 ± 0,68	3	3	3
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2,73 ± 1,00	3	8	10
<i>Kazachstania serrabonitensis</i> sp. nov. ¹	1,32 ± 0,21	3	2	4
<i>Kuraishia piskuri</i>	1,96 ± 0,54	3	4	8
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,04 ± 0,21	3	6	58
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	5,16 ± 0,95	2	2	2
<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	6,68 ± 0,55	2	2	2
<i>Starmera</i> sp. ¹	1,30	7	1	1
<i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i>	1,93	7	1	1
<i>Sugiyamaella xylanicola</i>	1,10 ± 0,21	7	2	4
<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	1,15 ± 0,10	3	2	12
<i>Wickerhamomyces strasburgensis</i>	1,88	2	1	1
<i>Yamadazyma cellobiosica</i> sp. nov. ¹	5,93 ± 1,67	2	3	3

¹Novas espécies de leveduras

5.3. Ensaio de fermentação em escala de bancada

Para avaliar a capacidade fermentativa de celobiose, quatorze isolados pertencentes às seis espécies selecionadas foram submetidos ao ensaio de fermentação em meio sintético YP contendo celobiose 50 g/L. Os resultados dos parâmetros fermentativos $Y_{p/s}$ (g/g, fator de conversão de celobiose em etanol), Q_p (g/L.h, produtividade em etanol), η (% , eficiência de fermentação), o consumo de celobiose (%) e a produção de células (g/L) estão sumarizados na tabela 5. Esses resultados foram calculados de acordo com o tempo de fermentação (tempo de máxima produção de etanol) para cada isolado ou tempo de término do ensaio (72 h).

Como pode ser observado na tabela 5, todas as leveduras testadas foram capazes de consumir celobiose, com porcentagens de consumo variando entre 16,3% para *C. tammaniensis* a 100,0% para *Sc. queiroziae*. As linhagens de *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis* exibiram os maiores e mais rápidos valores de consumo de celobiose, alcançando 98,3 e 100% de consumo, respectivamente, em 24 h. *Candida tammaniensis* teve o pior desempenho ao consumir somente 16,3% do açúcar após 24 h; e, após 72h, quando a maior produção de etanol foi observada, esta levedura apresentou 27,7% de consumo de celobiose. As linhagens de *H. opuntiae*, *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. e *C. jaronii* apresentaram valores intermediários de consumo deste açúcar, variando entre 27,4 e 79,4% de consumo.

A produção de etanol foi observada por todas as leveduras durante o ensaio de fermentação, confirmando a habilidade de fermentar celobiose a etanol pelas espécies testadas. O mesmo padrão observado no consumo de celobiose foi encontrado para produção de etanol, pelas leveduras. As maiores concentrações de etanol foram produzidas pelos isolados de *Sc. queiroziae* (23,72 e 24,38 g/L) e *Sc. amazonensis* (22,71 e 22,31 g/L), os quais alcançaram altos valores de rendimento, com valores entre 74,9 e 81,9% de eficiência de fermentação, após 24 h de experimento. Além disso, as linhagens de ambas as espécies mostraram os maiores valores de produtividade observados, entre 0,929 e 1,016 g/L.h.. As linhagens de *C. jaronii* e *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. também produziram altas concentrações de etanol (entre 13,08 e 18,48 g/L), mostrando altos rendimentos e valores entre 76,58 e 94,41% de eficiência de fermentação, após 36 e 48 h de

experimento, respectivamente. Sendo assim, os valores de produtividade foram menores (entre 0,273 e 0,513 g/L.h.) quando comparados aos observados pelas leveduras *Scheffersomyces* spp.. Por fim, os isolados de *C. tammaniensis* e *H. opuntiae* também produziram etanol, porém em quantidades menores (entre 1,69 e 5,96 g/L); estes valores foram observados com 24 h de experimento, sendo que após este tempo as concentrações de etanol foram diminuindo, desta forma os resultados de rendimento, eficiência e produtividade observados por estas duas últimas leveduras foram menores quando comparados às outras espécies avaliadas neste trabalho.

Os resultados observados neste trabalho são promissores e importantes no contexto de fermentação de celobiose e produção de etanol de segunda geração. No geral, as leveduras apresentaram índices elevados e rápidos de consumo de celobiose e produção de etanol, com exceção de *C. tammaniensis* que teve um metabolismo bem mais lento comparada às outras leveduras estudadas. Os altos valores dos parâmetros fermentativos obtidos pelos isolados em 24, 36 e 48 h é o que suporta essa afirmação. Estudos anteriores mostraram resultados semelhantes aos observados neste trabalho para as leveduras *Kl. cellobiovorus* e *Clavispora* sp. NRRL Y- 50464, as quais apresentaram rendimentos de 0,450 e 0,445 g/g, com 84 e 83% de eficiência, e 0,375 e 0,70 g/L.h de produtividade, em 48 e 32 h, respectivamente (Liu et al., 2013a; Morikawa et al., 1985). Elevados índices de rendimento e eficiência de fermentação já foram observados anteriormente para outras leveduras, contudo em tempos maiores de ensaio. Por exemplo, *D. bruxellensis* em condições aeróbicas de fermentação de celobiose, e em 24 horas, apresentou rendimento em etanol de 0,181 g/g com eficiência de fermentação de 33,71% e produtividade de 0,155 g/L.h (Reis et al., 2014). Esses índices foram consideravelmente maiores sob condições de anaerobiose e altas concentrações do açúcar, contudo um tempo muito maior de ensaio foi necessário, para alcançar a eficiência de 85% de fermentação a levedura demorou 160 h, o rendimento foi de 0,458 g/g e a produtividade 0,344 g/L.h (Blondin et al., 1982). A fermentação de celobiose foi avaliada ainda em várias leveduras por Spindler e colaboradores (1992) e as espécies mais promissoras foram *D. bruxellensis*, *K. molischiana*, *O. glucozyma* e *N. holstii*, porém os melhores resultados foram observados somente após 120 h de ensaio onde a eficiência de fermentação variou de 47,7 a 75% entre

estas espécies. A levedura *O. polymorpha* também avaliada quanto a fermentação deste açúcar não apresentou resultados muito promissores, com eficiência de fermentação de 49% após 96 h de ensaio (Ryabova et al., 2003).

As espécies *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis* já foram reportadas anteriormente como leveduras fermentadoras de celobiose (Cadete et al., 2012a; Santos et al., 2011). Santos e colaboradores (2011) mostraram que celobiose é eficientemente fermentada por linhagens de *Sc. queiroziae*, embora tenham encontrado um menor rendimento (0,32 g/g) comparado aos valores observados no presente trabalho (0,44 e 0,41 g/g). Já a levedura *Sc. amazonensis* foi descrita como fermentadora de celobiose baseado somente na caracterização fisiológica, usando a metodologia de tubos de Durhan, um ensaio qualitativo (Cadete et al., 2012a). Sendo assim, o presente estudo demonstrou pela primeira vez os parâmetros fermentativos para fermentação de celobiose e o potencial biotecnológico desta levedura. Além disso, Cadete e colaboradores (2016) mostraram que *Sc. amazonensis* é eficiente também na produção de xilitol a partir de xilose, outra importante característica abordada em estudos biotecnológicos para uso de resíduos lignocelulósicos. As espécies *C. jaroonii* e *C. tammaniensis* pertencem ao clado *Yamadazyma* (Kurtzman, 2011c), bem como a espécie nova *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov., isolada pela primeira vez neste trabalho, e filogeneticamente relacionada a *C. pseudoaaseri* e *C. andamanensis*. Espécie do clado *Yamadazyma* assimilam celobiose, incluindo as mencionadas acima (Am-In et al., 2011; Kurtzman et al., 2011a; Pfüller et al., 2011), entretanto a capacidade de fermentar este açúcar ainda não foi reportada anteriormente por nenhuma espécie do gênero até o momento. Os resultados observados no presente trabalho indicam que leveduras do clado *Yamadazyma* podem ser espécies com potencial para serem exploradas em estudos de fermentação de celobiose. Sabe-se que *H. opuntiae* assimila celobiose (Kurtzman et al. 2011a), entretanto a capacidade desta levedura em fermentar este açúcar foi também demonstrada pela primeira vez no presente trabalho.

Tabela 4. Parâmetros fermentativos do ensaio de fermentação pelas leveduras selecionadas.

Espécie	Linhagem (UFMG-CM-)	Biomassa (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Consumo de celobiose (%) ¹	Y _{p/s} (g/g) ²	Q _p (g/L.h) ³	η (%) ⁴	Tempo (h) ⁵
<i>Candida jarrowii</i>	Y420	8.30 ± 0.01	18.48 ± 0.08	79.4 ± 0.40	0.470	0.513	87.4	36
	Y421	8.21 ± 0.20	14.72 ± 0.45	70.5 ± 1.45	0.412	0.409	76.6	36
	Y3226	7.73 ± 0.20	15.26 ± 1.48	71.9 ± 1.12	0.445	0.424	82.7	36
<i>Candida tammaniensis</i>	Y2720	7.31 ± 0.12	1.69 ± 0.00	16.3 ± 1.47	0.191	0.070	35.6	24
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Y2798	6.19 ± 0.24	4.58 ± 0.18	36.0 ± 0.52	0.283	0.191	52.6	24
	Y2884	5.72 ± 0.33	4.41 ± 0.04	49.1 ± 4.61	0.181	0.184	33.7	24
	Y2898	6.88 ± 0.05	5.96 ± 0.11	27.4 ± 0.11	0.253	0.248	47.1	24
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	Y417	11.36 ± 0.24	22.31 ± 0.49	98.3 ± 0.06	0.403	0.929	74.9	24
	Y418	10.94 ± 0.47	22.48 ± 0.56	98.3 ± 0.03	0.412	0.936	76.5	24
<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Y415	8.70 ± 0.29	24.38 ± 0.33	99.7 ± 0.02	0.441	1.016	82.0	24
	Y416	9.16 ± 0.11	23.72 ± 1.04	100.0 ± 0.00	0.411	0.988	76.5	24
<i>Yamadazyma cellobiosica</i> sp. nov.	Y3196	8.69 ± 0.05	17.63 ± 0.49	74.7 ± 1.32	0.508	0.367	94.4	48
	Y3233	8.48 ± 0.10	13.08 ± 0.33	64.8 ± 1.29	0.467	0.273	86.8	48
	Y3250	8.42 ± 0.14	13.26 ± 0.14	62.5 ± 1.88	0.477	0.276	88.6	48

¹Consumo de Celobiose (%) – porcentagem de celobiose consumida a partir da concentração inicial

²Y_{p/s} (g/g) – fator de conversão de celobiose em etanol: correlação entre a concentração de etanol produzido com a concentração de celobiose consumida

³Q_p (g/L.h) – produtividade em etanol: razão entre concentração de etanol (g/L) e tempo de fermentação (h)

⁴η (%) – eficiência de fermentação: porcentagem do rendimento máximo em etanol (Y_{p/s} teórico = 0,538 g etanol /g celobiose)

⁵Tempo (h) – tempo de máxima produção de etanol

5.4. Determinação da atividade β -glicosídica

Os quatorze isolados pertencentes às seis espécies selecionadas também foram avaliados quanto a produção da enzima β -glicosidase, ensaios de atividades periplasmática e intracelular foram realizados. A linhagem tipo de *Sc. queiroziae* (CLM5.1) foi usada como controle positivo, uma vez que já foi observada atividade de β -glicosidase intracelular nesta levedura (Santos et al., 2011). Todas as leveduras apresentaram atividade de β -glicosidase intracelular e praticamente não foi observada atividade periplasmática. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 4. A levedura utilizada como controle, linhagem CLM5.1 de *Sc. queiroziae*, produziu 7,42 U/mL (1 U corresponde a 1 μ mol de pNP produzido por minuto). Os maiores valores de atividade intracelular, e mais próximos ao controle positivo, foram observados para os isolados de *Sc. queiroziae* (6,64 e 6,25 U/mL) e *Sc. amazonensis* (7,46 e 5,76 U/mL). As outras espécies testadas também apresentaram valores de atividade significativos. A linhagem de *C. tammaniensis* apresentou atividade de 3,80 U.mL⁻¹; os isolados da espécie *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. produziram entre 1,88 e 2,34 U/mL; e os isolados de *C. jaronii* produziram entre 2,06 e 2,79 U/mL.

Esses valores são superiores ou equivalentes às atividades β -glicosídicas encontrados na literatura. Por exemplo, a produção de β -glicosidase foi avaliada pela levedura *Candida wickerhamii*, a atividade predominante foi encontrada associada à célula na qual foram produzidos cerca de 3 μ mol de pNP.min⁻¹.mL⁻¹ (Freer e Detroy, 1983; Skory et al., 1996). Liu e colaboradores (2013a) avaliaram a atividade β -glicosídica de *Clavispora* sp. NRRL Y-50464 e encontraram uma produção intracelular de 1,3 μ mol de pNP.min⁻¹.mL⁻¹. A atividade intracelular de β -glicosidase também foi observada na levedura *D. bruxellensis*, porém com valor bem inferior aos observados para as outras leveduras, 0,100 μ mol de pNP.min⁻¹.mL⁻¹ (Reis et al., 2014). A atividade β -glicosídica também tem sido avaliada em estudos de expressão heteróloga desta enzima que vêm sendo comumente realizados. Genes de enzimas β -glucosidase de *S. fibuligera* e *A. niger* foram expressos em *S. cerevisiae* e apresentaram atividades de 5,22 e 0,85 μ mol de pNP.min⁻¹.mL⁻¹, respectivamente (Tang et al., 2013). Em outros dois estudos os quais a enzima β -glucosidase de *A. aculeatus* foi expressa em linhagens de *S. cerevisiae* os resultados foram $3,39 \pm 0,15$ e $3,46 \pm 0,23$ μ mol de pNP.min⁻¹.mL⁻¹ (Wang et al., 2013a), e valores entre $1,5 \pm 0,14$ e $3,0 \pm 0,11$ μ mol de pNP.min⁻¹.mL⁻¹ foram

observados por Liu e colaboradores (2013b). Em um estudo mais recente, Munjal e colaboradores (2015) fizeram a expressão das enzimas celulolíticas, endoglucanase e β -glucosidase, da bactéria *Paenibacillus* sp. MTCC 5639 em uma linhagem fermentadora de *Escherichia coli*; as atividades β -glucosídicas obtidas foram de 2,0 a 3,0 $\mu\text{mol de pNP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, variando de acordo com o promotor utilizado.

A alta atividade de β -glicosidase intracelular observada nas leveduras testadas neste trabalho sugere a presença de um transportador com alta afinidade por celobiose. A presença de um transportador de alta afinidade é uma característica interessante e desejável para aplicação da levedura em processos de fermentação e sacarificação simultânea de biomassas para produção de etanol de segunda geração. Este transportador permite a captação e retirada da celobiose do meio, evitando que as enzimas do processo de hidrólise sejam inibidas pelos seus produtos. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados para real avaliação do transporte de celobiose. Além disso, a atividade β -glicosídica observada nessas leveduras faz com que essas sejam promissoras para estudos de fermentação de celobiose. A hidrólise da celobiose em unidades de glicose é a característica chave do metabolismo de celobiose, pois após hidrólise a glicose liberada pode ser metabolizada normalmente pela levedura por meio da via glicolítica.

Tabela 4. Atividade da enzima β -glicosidase intracelular e periplasmática nas leveduras fermentadoras de celobiose selecionadas. Uma unidade (U) da enzima corresponde a 1 μ mol de pNP liberado por minuto.

Espécie	Linhagem (UFMG-CM-)	Atividade β -glicosidase (U/mL)	
		Periplasmática	Intracelular
<i>Scheffersomyces queiroziae</i> (controle positivo)	CLM5.1 (Linhagem tipo)	0,01 \pm 0	7,42 \pm 0,4
	Y420	0 \pm 0,01	2,70 \pm 0,21
<i>Candida jaroonii</i>	Y421	0 \pm 0,01	2,06 \pm 0,41
	Y3226	0 \pm 0,01	2,79 \pm 0,37
<i>Candida tammaniensis</i>	Y2720	0,02 \pm 0,01	3,8 \pm 0,5
	Y417	0,22 \pm 0,02	5,76 \pm 0,9
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	Y418	0,31 \pm 0,03	7,46 \pm 1,67
	Y415	0,01 \pm 0	6,64 \pm 0,39
<i>Scheffersomyces queiroziae</i>	Y416	0 \pm 0,01	6,25 \pm 0,55
	Y3196	0 \pm 0	2,34 \pm 0,49
<i>Yamadazyma cellobiosica</i> sp. nov.	Y3233	0 \pm 0	2,09 \pm 0,3
	Y3250	0 \pm 0,01	1,88 \pm 0,45

5.5. Sequenciamento genômico

As linhagens tipo das leveduras *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis*, UFMG-CLM5.1 e UFMG-HMD26.3, respectivamente, foram submetidas ao sequenciamento genômico. O sequenciamento gerou um total de 8.607.071 *reads* de 100 pares de base de comprimento para *Sc. queiroziae* e 288.158 *reads* também de 100 pares de base de comprimento para *Sc. amazonensis*. Considerando que o tamanho total do genoma esperado é 15 Kb (correspondente a *Sc. stipitis*; Jeffries et al., 2007), foi calculada a cobertura de 114,76 vezes para *Sc. queiroziae* e 3,84 vezes para *Sc. amazonensis*. O pequeno valor observado para a segunda levedura reflete o baixo número de *reads* obtidos pelo sequenciamento do genoma da mesma. Sendo assim, as análises foram prosseguidas somente com o genoma da levedura *Sc. queiroziae*.

O melhor resultado de montagem do genoma de *Sc. queiroziae*, no qual foram gerados *contigs* mais extensos e em menor número, foi obtido usando o valor de k-mer de 61. Foram gerados 2.158 *contigs* de tamanho médio (N50) 305.978 pb, sendo que o maior *contig* apresentou 716.963 pb. A soma dos tamanhos dos *contigs* resultou em 14.397.707 pb para o total do genoma. O tamanho do genoma obtido é consistente com o esperado, uma vez este valor se aproxima do tamanho do genoma da levedura usada como referência, *Sc. stipitis* com cerca de 15.000.000 pb.

5.6. Obtenção das sequências, amplificação e clonagem dos genes de interesse

Através das análises por tBLASTn, e com o auxílio do software Artemis, foram encontradas nove genes hipotéticos codificadores de transportadores de celobiose e de enzimas β -glicosidases. Os resultados obtidos nas análises tBLASTn podem ser observados na tabela 6. Cinco sequências gênicas similares ao gene HXT2.4 de *Sc. stipitis* foram encontradas e apresentaram entre 57 a 87% de identidade. Quatro sequências gênicas de β -glicosidases foram encontradas, o gene denominado SqBGL1 apresentou similaridade com os genes BGL1, 3 e 7 de *Sc. stipitis* com identidades entre 65 e 74%; o gene SqBGL2 apresentou 79% de identidade com o gene BGL2 de *Sc. stipitis*; o gene SqBGL4 é similar ao gene BGL4 de *Sc. stipitis*

com 82% de identidade; e o gene SqBGL5 apresentou 76 e 74% de identidade com os genes BGL5 e 6 de *Sc. stipitis*, respectivamente. As sequências que apresentaram maior identidade de sequência em relação aos genes HXT2.4 e BLG5 de *Sc. stipitis* foram selecionadas para os estudos posteriores de expressão gênica e avaliação da funcionabilidade dos mesmos.

Com a obtenção das sequências dos genes HXT2.4 e BGL5 de *Sc. queiroziae*, iniciadores foram desenhados para amplificação dos mesmos. O DNA genômico de *Sc. queiroziae* foi utilizado como *template* para amplificação dos genes. Conforme pode ser observado na figura 7, ambos os genes foram amplificados e nomeados: SqHXT2.4 e SqBLG5. O gene do transportador de celobiose foi clonado no plasmídeo pBM5155-NatMX que confere resistência a neosertromicina e o gene da enzima β -glicosidase foi clonado no plasmídeo pBM5155-KanMX que confere resistência a geneticina, gerando os plasmídeos pBM5155-NatMX-SqHXT2.4 e pBM5155-KanMX-SqBGL5.

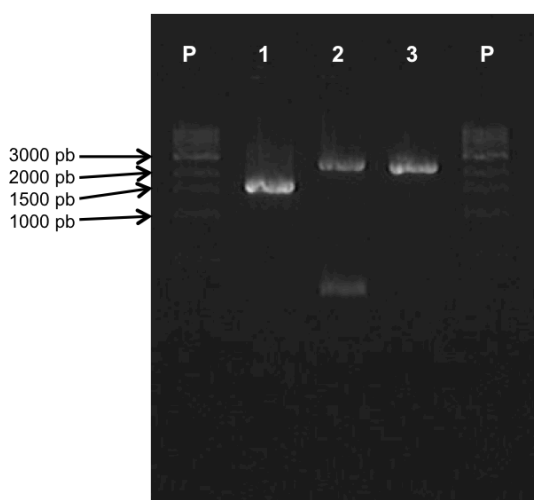


Figura 5. Fracionamento em gel de agarose 1,0% dos produtos de amplificação a partir do DNA genômico de *Sc. queiroziae*. **P:** Padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder; **1:** Fragmento do gene SqHXT2.4 (1500 pb); **2:** Fragmento do gene SqBGL5 (2500 pb), anelamento a 42 °C; **3:** Fragmento do gene SqBGL5 (2500 pb), anelamento a 49,5 °C.

Tabela 5. Resultados das análises tBLASTn no genoma de *Sc. queiroziae*. Genes encontrados, localização dos genes, score e identidade da sequência em relação aos genes referência.

Proteína	Genes encontrados em <i>Sc. queiroziae</i>	Localização	Gene referência	Identidade (%)	Score
Transportador de celobiose	SqHXT2.4	CONTIG 594_26209-27849		472/547 (86%)	963 bits (2489)
	SqHXT2.4_b	CONTIG 962_75170-76801		333/548 (61%)	686 bits (1769)
	SqHXT2.4_c	CONTIG 1336_101278-99662	Ss_HXT2.4	320/545 (59%)	654 bits (1686)
	SqHXT2.4_d	CONTIG 1668_10053-8464		303/533 (57%)	635 bits (1639)
	SqHXT2.4_e	CONTIG 324_5576-3957		309/542 (57%)	620 bits (1599)
β-glicosidase		CONTIG 2110_341038-343263	Ss_BGL1	482/743 (65%)	1006 bits (2601)
	SqBGL1	CONTIG 2110_341038-343263	Ss_BGL3	485/744 (65%)	1007 bits (2604)
		CONTIG 2110_341050-343551	Ss_BGL7	613/834 (74%)	1284 bits (3322)
	SqBGL2	CONTIG 324_7427-9964	Ss_BGL2	675/851 (79%)	1400 bits (3624)
	SqBGL4	CONTIG 89_84780-82336	Ss_BGL4	670/815 (82%)	1358 bits (3515)
	SqBGL5	CONTIG 1668_12670-15195	Ss_BGL5	642/842 (76%)	1313 bits (3397)
		CONTIG 1668_12670-15195	Ss_BGL6	656/842 (74%)	1282 bits (3317)

5.7. Obtenção dos transformantes

Os plasmídeos pBM5155-NatMX-SqHXT2.4 e pBM5155-KanMX-SqBGL5A foram utilizados para transformação da levedura *S. cerevisiae* FM1282, os quais foram inseridos separados ou em conjunto nas células. Os transformantes estão sumarizados na tabela 7. Um transformante contendo apenas o gene do transportador de celobiose foi obtido (yHML002), além de um transformante contendo apenas o gene da enzima β -glicosidase (yHML003) e dois transformantes contendo ambos os genes, considerados duplo-mutantes (yHML004 e yHML005). A levedura selvagem FM1282, utilizada como controle foi nomeada yHML001.

Tabela 6. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* transformantes. Linhagem, genótipo e os antibióticos necessários para crescimento e indução da expressão gênica.

Código da levedura	Linhagem	Genótipo	Antibiótico para Seleção	Indução
yHML001	FM1282	wt – não transformante	-	-
yHML002	FM1282	pBM5155-NatMX-SqHXT2.4	Neosertromicina	Doxiciclina
yHML003	FM1282	pBM5155-KanMX-SqBGL5	Geneticina	Doxiciclina
yHML004	FM1282	pBM5155-NatMX-SqHXT2.4 + pBM5155-KanMX-SqBGL5 (1)	Neosertromicina e Geneticina	Doxiciclina
yHML005	FM1282	pBM5155-NatMX-SqHXT2.4 + pBM5155-KanMX-SqBGL5 (2)	Neosertromicina e Geneticina	Doxiciclina

5.7.1. Avaliação da expressão gênica pelos transformantes

A expressão do gene da enzima β -glicosidase intracelular foi avaliada nas leveduras transformantes por meio de ensaios enzimáticos em células previamente permeabilizadas. A levedura selvagem foi utilizada como controle negativo. Todas as leveduras transformantes que contêm o gene SqBGL5, yHML003, yHML004 e yHML005, apresentaram atividade β -glicosídica intracelular e, conforme o esperado não foi observada atividade na levedura selvagem (yHML001), e no transformante que contém apenas o gene do transportador de celobiose (yHML002). Os resultados

de atividade podem ser observados na tabela 8 e na figura 8. Os valores observados foram 0,668 U.mL⁻¹ para o transformante yHML003 expressando somente a enzima e, 0,685 e 0,474 U.mL⁻¹ para os transformantes expressando ambos os genes, yHML004 e yHML005, respectivamente. Esses valores são cerca de 10 ou 15 vezes menor ao observado para *Sc. queiroziae*, que possui o gene nativo e produziu 7,42 U/mL da enzima (resultado descrito no item 5.4). Contudo, é um resultado esperado uma vez que a levedura naturalmente produtora da enzima possui outros três genes codificadores de β-glicosidases e que provavelmente contribuem para a atividade total observada pela mesma. Além disso, é normal ser observada baixa atividade de um gene que está sendo expresso sob indução de antibiótico, pois a concentração do indutor deve ser controlada para provocar o efeito indutor sem prejudicar drasticamente o metabolismo celular. Além do antibiótico indutor, outros dois antibióticos também foram utilizados no cultivo celular para garantir a manutenção dos plasmídeos nas células transformantes, comprometendo também o metabolismo das leveduras. Sendo assim, é difícil comparar, de forma exata, a produção da enzima pelos transformantes em relação à levedura *Sc. queiroziae*. Por outro lado, este resultado é extremamente significativo uma vez que é possível constatar a funcionabilidade do gene SqBGL5 de *Sc. queiroziae*, identificado neste trabalho, e até o momento desconhecido na literatura. Além de constatar que o gene descrito neste trabalho é um gene funcionalmente ativo, o fato do gene ter sido expresso com sucesso em *S. cerevisiae*, mesmo sob indução, é de grande importância do ponto de vista biotecnológico e abrem novas perspectivas de trabalhos de expressão gênica que visam o melhoramento de leveduras para aplicação em processos de produção de etanol celulósico.

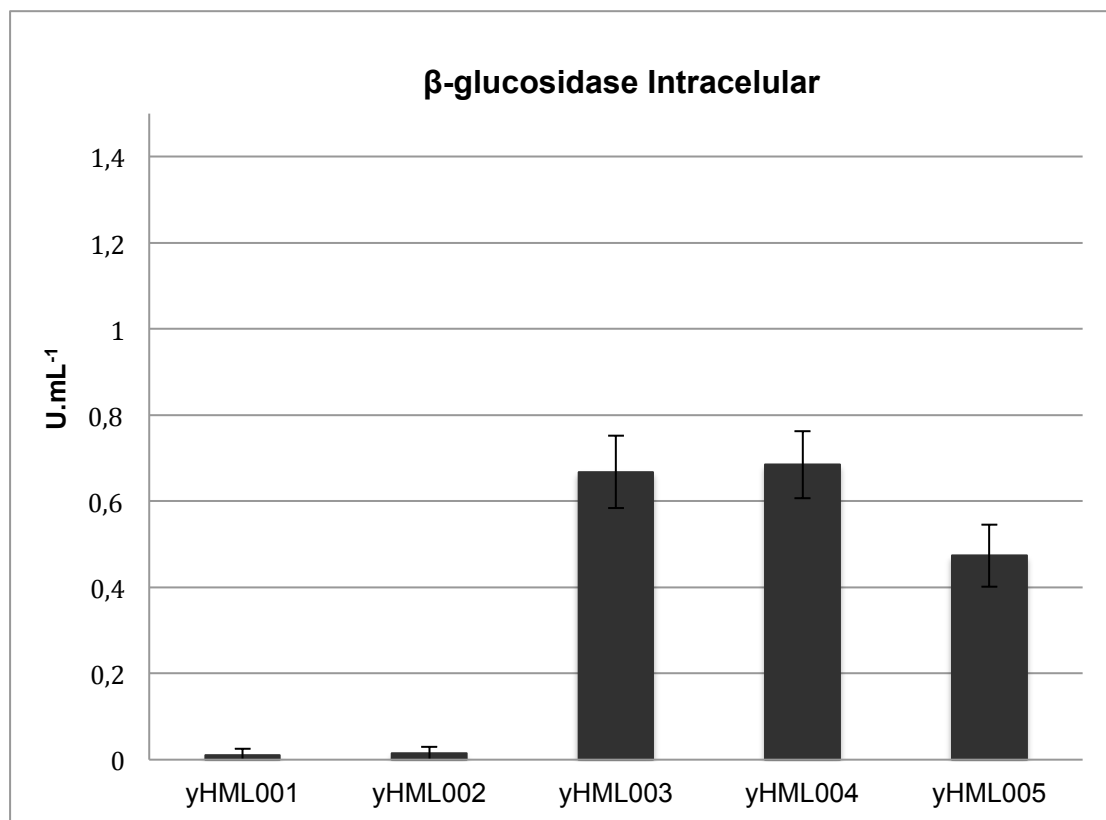


Figura 6. Atividade β -glicosídica intracelular nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* transformantes. **yHML001**: controle negativo, levedura selvagem; **yHML002**: transformante expressando gene SqHXT2.4; **yHML003**: transformante expressando gene SqBGL5; **yHML004**: duplo mutante 1, expressando ambos os genes; **yHML005**: duplo mutante 2, expressando ambos os genes. Uma unidade (U) da enzima corresponde a 1 μmol de pNP liberado por minuto.

Tabela 7. Atividade β -glicosídica intracelular nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* transformantes. Uma unidade (U) da enzima corresponde a 1 μmol de pNP liberado por minuto.

Código da levedura	Genes expressos	Atividade β -glicosidase Intracelular (U.mL ⁻¹)
yHML001	wt	0,011 ± 0,014
yHML002	SqHXT2.4	0,014 ± 0,015
yHML003	SqBGL5	0,668 ± 0,084
yHML004	SqHXT2.4 + SqBGL5 (1)	0,685 ± 0,078
yHML005	SqHXT2.4 + SqBGL5 (2)	0,474 ± 0,072

5.7.2. Avaliação da fermentação de celobiose pelas leveduras transformantes

As leveduras transformantes foram submetidas a ensaios de fermentação de celobiose. Os resultados dos parâmetros fermentativos $Y_{p/s}$ (g/g, fator de conversão de celobiose em etanol), η (%), eficiência de fermentação), o consumo de celobiose (%) e a produção de etanol (g/L) estão sumarizados na tabela 9. Nenhum dos transformantes consumiu toda a celobiose do meio após os nove dias de ensaio. A levedura selvagem yHML001 e o transformante yHML002, contendo apenas o gene do transportador de celobiose, não foram capazes de consumir a celobiose do meio após os 9 dias de ensaio. Porém, de forma inesperada, o transformante yHML003 expressando somente o gene da enzima β -glicosidase consumiu açúcar do meio e ainda foi capaz de produzir etanol a partir deste, em valores semelhantes aos duplos mutantes yHML004 e yHML005, os quais expressam ambos os genes. O consumo dos três últimos variou entre 24 e 31% de celobiose consumida, enquanto os valores de rendimento foram de 0,26 a 0,30 g de etanol produzido por g de açúcar consumido, com eficiência de fermentação variando entre 51 e 58%. Apesar da quantidade de açúcar consumido ter sido baixa, as leveduras fermentaram produzindo etanol a partir deste, e por isso a eficiência de fermentação foi em torno de 50%. Estes resultados mostram a eficiência do gene SqBGL5 da enzima β -glicosidase de *Sc. queiroziae* em conferir à levedura transformante a capacidade de fermentar celobiose, uma vez que a levedura selvagem *S. cerevisiae* não possui essa capacidade. A presença ou ausência do gene SqHXT2.4 do transportador de celobiose de *Sc. queiroziae* parece não fazer diferença para o metabolismo fermentativo da levedura transformante. Duas hipóteses podem explicar tais resultados, o açúcar celobiose pode estar sendo transportado para o interior da célula por outro transportador nativo da própria levedura *S. cerevisiae*. Outra hipótese é que a enzima β -glicosidase expressa pelo gene SqBGL5 pode estar sendo secretada para o meio extracelular ou ancorada à membrana celular. Contudo para afirmar qual hipótese estaria correta, novos ensaios devem ser realizados a fim de avaliar a atividade β -glicosídica extracelular e periplasmática, e ainda atividade de transporte do açúcar para o meio intracelular.

Tabela 8. Parâmetros fermentativos do ensaio de fermentação pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* transformantes.

Código da levedura	Genes expressos	Tempo (dias)	Celobiose ¹ (g/L)	Etanol ² (g/L)	Consumo de Celobiose ³ , %	Y _{p/s} ⁴ (g/g)	η ⁵ (%)																																							
yHML001	wt	0	19,76 ± 0,05	0,08 ± 0,05	2,69 ± 3,03	0	0																																							
		9	19,23 ± 0,62	0,03 ± 0,05				yHML002	SqHXT2.4	0	19,86 ± 0,19	0,06 ± 0,01	0,71 ± 1,16	0	0	9	19,72 ± 0,05	0,00 ± 0,00	yHML003	SqBGL5	0	19,86 ± 0,07	0,05 ± 0,00	31,79 ± 3,30	0,28 ± 0,02	53,99 ± 3,98	9	13,55 ± 0,70	1,80 ± 0,30	yHML004	SqHXT2.4+SqBGL5 (1)	0	19,62 ± 0,38	0,06 ± 0,00	28,52 ± 0,76	0,30 ± 0,04	58,54 ± 7,88	9	14,02 ± 0,17	1,73 ± 0,17	yHML005	SqHXT2.4+SqBGL5 (2)	0	19,78 ± 0,10	0,06 ± 0,02	24,29 ± 5,24
yHML002	SqHXT2.4	0	19,86 ± 0,19	0,06 ± 0,01	0,71 ± 1,16	0	0																																							
		9	19,72 ± 0,05	0,00 ± 0,00				yHML003	SqBGL5	0	19,86 ± 0,07	0,05 ± 0,00	31,79 ± 3,30	0,28 ± 0,02	53,99 ± 3,98	9	13,55 ± 0,70	1,80 ± 0,30	yHML004	SqHXT2.4+SqBGL5 (1)	0	19,62 ± 0,38	0,06 ± 0,00	28,52 ± 0,76	0,30 ± 0,04	58,54 ± 7,88	9	14,02 ± 0,17	1,73 ± 0,17	yHML005	SqHXT2.4+SqBGL5 (2)	0	19,78 ± 0,10	0,06 ± 0,02	24,29 ± 5,24	0,26 ± 0,03	51,13 ± 6,75	9	14,98 ± 1,08	1,33 ± 0,41						
yHML003	SqBGL5	0	19,86 ± 0,07	0,05 ± 0,00	31,79 ± 3,30	0,28 ± 0,02	53,99 ± 3,98																																							
		9	13,55 ± 0,70	1,80 ± 0,30				yHML004	SqHXT2.4+SqBGL5 (1)	0	19,62 ± 0,38	0,06 ± 0,00	28,52 ± 0,76	0,30 ± 0,04	58,54 ± 7,88	9	14,02 ± 0,17	1,73 ± 0,17	yHML005	SqHXT2.4+SqBGL5 (2)	0	19,78 ± 0,10	0,06 ± 0,02	24,29 ± 5,24	0,26 ± 0,03	51,13 ± 6,75	9	14,98 ± 1,08	1,33 ± 0,41																	
yHML004	SqHXT2.4+SqBGL5 (1)	0	19,62 ± 0,38	0,06 ± 0,00	28,52 ± 0,76	0,30 ± 0,04	58,54 ± 7,88																																							
		9	14,02 ± 0,17	1,73 ± 0,17				yHML005	SqHXT2.4+SqBGL5 (2)	0	19,78 ± 0,10	0,06 ± 0,02	24,29 ± 5,24	0,26 ± 0,03	51,13 ± 6,75	9	14,98 ± 1,08	1,33 ± 0,41																												
yHML005	SqHXT2.4+SqBGL5 (2)	0	19,78 ± 0,10	0,06 ± 0,02	24,29 ± 5,24	0,26 ± 0,03	51,13 ± 6,75																																							
		9	14,98 ± 1,08	1,33 ± 0,41																																										

¹Celobiose (g/L) – concentrações de celobiose no tempo zero e após 9 dias de ensaio

²Etanol (g/L) - concentrações de etanol no tempo zero e após 9 dias de ensaio

³Consumo de celobiose (%) – porcentagem de celobiose consumida a partir da concentração inicial

⁴Y_{p/s} (g/g) – fator de conversão de celobiose em etanol: correlação entre a concentração de etanol produzido com a concentração de celobiose consumida

⁵η (%) – eficiência de fermentação: porcentagem do rendimento máximo em etanol (Y_{p/s} teórico = 0,538 g etanol/ g celobiose)

6. CONCLUSÕES

Cento e trinta e três espécies de leveduras isoladas de madeira em decomposição foram identificadas, sendo que quarenta e oito representam novas espécies para ciência. A alta taxa de isolamento de espécies novas, 36% das leveduras encontradas, é uma importante comprovação do potencial da madeira em decomposição como substrato de isolamento de leveduras. Além disso, estes resultados mostram a importância de estudos científicos que envolvam trabalhos de pesquisas nos ecossistemas brasileiros, os quais abrigam uma enorme diversidade biológica.

As leveduras pertencentes ao gênero *Scheffersomyces*, *Sc. queiroziae* e *Sc. amazonensis*, apresentaram os melhores resultados de atividade β -glicosidase intracelular e de parâmetros fermentativos comparadas às demais leveduras analisadas no presente trabalho. Estes resultados são promissores e mostram o potencial dessas leveduras para novos estudos de fermentação de celobiose visando o emprego em pesquisas voltadas para a produção de etanol de segunda geração. A levedura *Candida jaroonii* e a espécie nova *Yamadazyma cellobiosica* sp. nov. também apresentaram resultados promissores de produção de etanol a partir de celobiose, e podem ser empregadas em posteriores estudos de fermentação de celobiose, uma vez que ambas não foram estudadas ainda quanto ao potencial biotecnológico. Os resultados observados neste trabalho abrem, portanto, uma perspectiva de novos trabalhos que visem entender e melhorar o metabolismo fermentativo de celobiose destas leveduras.

O sequenciamento do genoma de *Sc. queiroziae* permitiu a identificação de novos relacionados ao metabolismo fermentativo de celobiose. Dos genes identificados, cinco possivelmente codificam para proteínas transportadoras de açúcares, e podem estar relacionados ao transporte de celobiose, uma vez que estes genes apresentam similaridade com a sequência do gene HXT2.4, que codifica o transportador de celobiose em *Sc. stipitis*. Foram ainda identificados quatro novos genes com similaridade entre as sequências dos mesmos e dos genes BGLs, codificadores de enzimas β -glicosidases em *Sc. stipitis*. Sendo que um dos genes, denominado SqBGL5, apresentou maior similaridade ao gene BGL5 de *Sc. stipitis*, descrito em conjunto com o gene HXT2.4 como essenciais para o

metabolismo de celobiose na levedura. O gene SqBGL5, utilizado para expressão heteróloga em *S. cerevisiae* e avaliação da sua funcionabilidade, foi suficiente para conferir à levedura *S. cerevisiae* a capacidade de metabolizar celobiose a etanol, independente do gene SqHXT2.4 do transportador de celobiose estar sendo expresso ou não. Contudo esta capacidade ainda precisa ser avaliada com novos testes para se entender melhor como está sendo realizado o processo de metabolização deste açúcar pela levedura transformante.

O acesso ao genoma da levedura *Sc. queiroziae*, a qual apresenta uma eficiente capacidade em fermentar celobiose, é um grande avanço para a ciência, e permitirá o desenvolvimento de novos estudos com o objetivo de se entender melhor o metabolismo desta levedura e podendo ainda ajudar na compreensão e no desenvolvimento de novas linhagens de leveduras com capacidade de aplicação em processos fermentativos visando a produção de etanol de segunda geração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ab'Saber, A. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. *Geomorfologia*. v. 52, p. 1-21, 1977.

Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*. v. 30, p. 1515-1524, 2008.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. v. 21, n. 3, p. 403-410, 1990.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. v. 25, p. 3389-3402, 1997.

Alves Jr, S.L., Herberts, R.A., Hollats, C., Millet, L.C., Stambuk, B.U. Maltose and Maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of American Society of Brewing Chemists*. v. 65, p. 99-104, 2007.

Am-In, S., Limtong, S., Yongmanitchai, W., Jindamorakot, S. *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov. and *Candida ranongensis* sp. nov., anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a Thai mangrove forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 61, p. 454-461, 2011.

Andrić, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocelluloses hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances*. v. 28, p. 308-324, 2010.

Bae, Y.H., Kang, K.H., Jin, Y.S., Seo, J.H. Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases conferring efficient cellobiose

fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. v. 169, p. 34-41, 2014.

Barbosa, A.C., Cadete, R.M., Gomes, F.C., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 59, n. 8, p. 2104-2106, 2009.

Barnett. J.A. The utilization of sugars by yeasts. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. v. 32, p. 125-234, 1976.

Basso, L.C., de Amorim, H.V., de Oliveira, A.J., Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*. v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

Berglund, E.C., Kiialainen, A., Syvanen, A.C. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investigative Genetics*. v. 2, p. 23, 2011.

Bezerra, R.M., Dias, A.A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: inhibition by ethanol and cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 126, p. 49-59, 2005.

Bhattarai, K., Stalick, W.M., McKay, S., Geme, G., Bhattarai, N. Biofuel: an alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. v. 46, p. 1424-1442, 2011.

Billon-Grand, G. A new ascosporogenous yeast genus: *Yamadazyma* gen. nov. *Mycotaxon*. v. 35, n. 2, p. 201-204, 1989.

Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., & Galzy, P. A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 24, n. 9, p. 2031-2037, 1982.

Boontham, W., Limtong, S., Rosa, C.A., Lopes, M.R., Vital, M.J.S., Srisuk, N. *Cyberlindnera tropicalis* f.a., sp. nov., a novel yeast isolated from tropical regions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 67, p. 2569-2573, 2017.

Cadete, R.M., Santos, R.O., Melo, M.A., Mouro, A., Gonçalves, D.L., Stambuk, B.U., Gomes, F.C.O., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Research*. v. 9, p. 1338-1342, 2009.

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.R. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 62, p. 1438-1440, 2012a.

Cadete, R.M., Melo, M.A., Dussán, K.J., Rodrigues, R.C.L.B., Silva, S.S., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Gomes, F.C.O. Lachance, M.A., Rosa, C.A. Diversity and physiological characterization of d-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS ONE*. v. 7, n. 8, p. e43135, 2012b.

Cadete, R.M., Melo, M.A., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Mouro, A., Prompt, A.H., Gomes, F.C.O., Stambuk, B.U., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian Forest. *Antonie Van Leeuwenhoek*. v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

Cadete, R.M., Fonseca, C., Rosa, C.A. Novel yeast strains from brazilian biodiversity: biotechnological applications in lignocellulose conversion into biofuels. In *Biofuels in Brazil*, Springer International Publishing. p. 255-279, 2014.

Cadete, R.M., Melo-Cheab, M.A., Viana, A.L., Oliveira, E.S., Fonseca, C., Rosa, C.A. The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 32, p. 207, 2016.

Cellulosic Ethanol (CE). <http://www.biofuelstp.eu/cellulosic-ethanol.html>. Acesso em 09 de Abril de 2015.

Chandel, A.K., Chandrasekhar, G., Silva, M.B., da Silva, S.S. The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 32, p. 187-202, 2012.

Commercial Cellulosic Ethanol Projects: Brazil and Europe. <http://dglassassociates.wordpress.com/2013/02/25/commercial-cellulosic-ethanol-projects-brazil-and-europe/>. Acesso em 09 de Abril de 2015.

Couto, L.C., Couto, L., Watzlawick, L.F., Câmara, D. Vias de valorização energética da biomassa. *Biomassa e Energia*. v. 1, p. 71-92, 2004.

da Cunha-Pereira, F., Hickert, L.R., Sehnem, N.T., de Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 4218-4225, 2011.

Daniel, H.M., Lachance, M.A., Kurtzman, C.P. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 106, n. 1, p. 67-84, 2014.

de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A., Langridge, P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, p. 4514-4520, 1996.

de Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A., Langridge, P. Differentiation and species identification of yeast using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 48, p. 279-286, 1998.

de Hoog, G.S., Smith., M.Th. *Galactomyces* Redhead & Malloch (1977). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 413-420, 2011.

de Miranda, L.R. *Clavispora*, a new yeast genus of the *Saccharomycetales*. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 45, n. 3, p. 479-483, 1979.

Demain, A.L. Biosolutions to the energy problem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 36, p. 319-332, 2009.

Demirbas, M.F. World Biofuel Scenario. In *Handbook of Plant-Based Biofuels*, editor Ashok Pandey, CRC Press. cap. 2, p. 13-27, 2009.

Eggert, H., Greaker, M. Promoting second generation biofuels: does the first generation pave the road?. *Energies*. v. 7, p. 4430-4445, 2014.

Eriksen, D.T., Hsieh, P.C.H., Lynn, P., Zhao, H. Directed evolution of a cellobiose utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously engineering multiple proteins. *Microbial Cell Factories*. v. 12, p. 61, 2013.

Fairley, P. Next generation biofuels. *Nature*. v. 474, p. S2-S5, 2011.

Freer, S.N. Fermentation and aerobic metabolism of cellodextrins by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 57, n. 3, p. 655-659, 1991.

Freer, S.N., Detroy, R.W. Characterization of cellobiose fermentations to ethanol by yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 25, n. 2, p. 541-557, 1983.

Fuentes, L.L.G., Rabelo, S.C., Filho, R.M., Costa, A.C. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 163, p. 612-625, 2010.

Galazka, J.M., Tian, C., Beeson, W.T., Martinez, B., Glass, N.L., Cate, J.H. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*. v. 330, n. 6000, p. 84-86, 2010.

Gan, Q., Allen, S.J., Taylor, G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. v. 12, p. 223-229, 2002.

Gomes, F.C.O., Safar, S.V.B., Marques, A.R., Medeiros, A.O., Santos, A.R.O., Carvalho, C., Lachance, M.A., Sampaio, J.P., Rosa, C.A. The diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* fa, sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 107, n. 2, p. 597-611, 2015.

Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 10, p. 141-146, 2006.

Guo, Z., Zhang, L., Ding, Z., Gu, Z., Shi, G. Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 49, p. 105-112, 2011.

Ha, S.J., Kim, S.R., Kim, H., Du, J., Cate, J.H., Jin, Y.S. Continuous co-fermentation of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. v. 149, p. 525-531, 2013a.

Ha, S.J., Kim, H., Lin, Y., Jang, M.U., Galazka, J.M., Kim, T.J., Cate, J.H.D., Jina, Y.S. Single amino acid substitutions in HXT2.4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 79, p. 1500-1507, 2013b.

Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., Prior, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 16, p. 933-943, 1994.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*. v. 24, p. 549-556, 2006.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 108, p. 147-177, 2007.

Hamelinck, C.N., Van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. v. 28, p. 384-410, 2005.

Herberts, R.A. Transporte ativo de α -glicosídeos: uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Dover, J., Johnston, M., Rokas, A. Remarkably ancient balanced polymorphisms in a multi-locus gene network. *Nature*. v. 464, p. 54-58, 2010.

Imanishi, Y., Jindamorakot, S., Mikata, K., Nakagiri, A., Limtong, S., Potacharoen, W., Tanticharoen, M., Nakase, T. Two new ascomycetous anamorphic yeast species related to *Candida friedrichii* - *Candida jaronii* sp. nov., and *Candida songkhlaensis* sp. nov. - isolated in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 94, p. 267-276, 2008.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). *Monitoramento da Floresta*. São José dos Campos, 2004.

Jacques, N., Sarilar, V., Urien, C., Lopes, M.R., Morais, C.G., Uetanabaro, A.P.T., Tinsley, C.R., Rosa, C.A., Sicard, D., Casaregola, S. Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 66, p. 5192-5200, 2016.

Jeffries T.W., Headman, J.R. *Pichia stiptis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Research*. v. 9, p. 793-807, 2009.

Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.S., Passoth, V., Richardson, P.M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*. v. 25, n. 3, p. 319-326, 2007.

Kawai, T., Nakazawa, H., Ida, N., Okada, H., Ogasawara, W., Morikawa, Y., Kobayashi, Y. A comprehensive analysis of the effects of the main component enzymes of cellulase derived from *Trichoderma reesei* on biomass saccharification. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 40, p. 805-810, 2013.

Komolwanich, T., Tatijarern, P., Prasertwasu, S., Khumsupan, D., Chaisuwan, T., Luengnaruemitchai, A., Wongkasemjit, S. Comparative potentiality of Kans grass (*Saccharum spontaneum*) and Giant reed (*Arundo donax*) as lignocellulosic feedstocks for the release of monomeric sugars by microwave/chemical pretreatment. *Cellulose*. v. 21, n. 3, p. 1327-1340, 2014.

Kristensen, J.B., Felby, C., Jorgensen, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*. v. 2, p. 11, 2009.

Kurtzman, C.P. Eleven new species of *Sugiyamaella* and *Candida* from forest habitats. *FEMS Yeast Research*. v. 7, n. 6, p. 1046-1063, 2007.

Kurtzman, C.P. *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (2010). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 621-624, 2011a.

Kurtzman, C.P. *Lindnera* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 521-544, 2011b.

Kurtzman, C.P. *Yamadazyma* Billon-Grand (1989). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 919-926, 2011c.

Kurtzman, C.P. *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 899-918, 2011d.

Kurtzman, C.P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 64, p. 325-332, 2014.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 73, p. 331-371, 1998a.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. Three new insect-associated species of the yeast genus *Candida*. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 44, n. 10, p. 965-973, 1998b.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Research*. v. 7, n. 1, p. 141-151, 2007.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Research*. v. 13, p. 23-33, 2013.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., Basehoar-Powers, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*. v. 8, n. 6, p. 939-954, 2008.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.), *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. 2011a.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 1, p. 87-110, 2011b.

Lachance, M.A. *Clavispora* Rodrigues de Miranda (1979). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 349-354, 2011.

Lachance, M.A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J.W., Kurtzman, C.P. *Candida* Berkhout (1923). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 987-1278, 2011.

Lara, C.A., Santos, R.O., Cadete, R.M., Ferreira, C., Marques, S., Gírio, F., Oliveira, E.S., Rosa, C.A., Fonseca, C. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 105, n. 6, p. 1107-1119, 2014.

Leal, M.R.L.V., Galdos, M.V., Scarpere, F.V., Seabra, J.E.A., Walter, A., Oliveira, C.O.F. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: a literature

review. *Biomass and Bioenergy*. v. 53, p. 11-19, 2013.

Lee, W.H., Nan, H., Kim, H.J., Jin, Y.S. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*. v. 167, p. 316-322, 2013.

Li, S., Du, J., Sun, J., Galazka, J.M., Glass, N.L., Cate, J.H.D., Yange, X., Zhao, H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular BioSystems*. v. 6, p. 2129-2132, 2010.

Lian, J., Li, Y., Hamedirad, M., Zhao, H. Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 111, n. 8, p. 1521-1531, 2014.

Liu, Z.L., Weber, S.A., Cotta, M.A., Li, S.Z. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. v. 104, p. 410-416, 2012.

Liu, Z.L., Weber, S.A., Cotta, M.A. Isolation and characterization of a β -glucosidase from a *Clavispora* strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. *BioEnergy Research*. v. 6, n. 1, p. 65-74, 2013a.

Liu, L., Liu, C., Zou, S., Yang, H., Hong, J., Ma, Y., Zhang, M. Expression of cellulase genes in *Saccharomyces cerevisiae* via δ -integration subject to auxotrophic markers. *Biotechnology Letters*. v. 35, n. 8, p. 1303-1307, 2013b.

Lopes, M.R., Ferreira, M.C., Carvalho, T.F.C., Pagnocca, F.C., Chagas, R.A., Morais, P.B., Rosa, L.H., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Yamadazyma riverae* sp. nov., a yeast species isolated from plant materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 65, p. 4469-4473, 2015.

Lopes, M.R., Morais, C.G., Kominek, J., Cadete, R.M., Soares, M.A., Uetanabaro, A.P.T., Fonseca, C., Lachance, M.A., Hittinger, C.T., Rosa, C.A. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov., and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. *FEMS Yeast Research*. v. 16, p. fow044, 2016.

Lynd, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment*. v. 21, p. 403-465, 1996.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Review*. v. 66, p. 506-577, 2002.

Lynd, L.R., Van Zyl, W.H., McBride, L.E., Laser, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 16, p. 577-583, 2005.

Macrelli, S., Galbe, M., Wallberg, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. *Biotechnology for Biofuels*. v. 7, p. 26-41, 2014.

Maehara, T., Ichinose, H., Furukawa, T., Ogasawara, W., Takabatake, K., Kaneko, S. Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. *Fungal Biology*. v. 117, p. 220-226, 2013.

McKendry, P. Energy production from biomass (part 1): Overview of biomass. *Bioresource Technology*. v. 83, p. 37-46, 2002.

Morais, P.B., Pagnocca, F.C., Rosa, C.A. Yeast communities in tropical rain forests in Brazil and other South American ecosystems. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Springer Berlin Heidelberg. p. 461-484, 2006.

Morais, V.L., Gomes, W.C., Alsina, O.L.S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. v. 2, p. 27-32, 2007.

Morais, C.G., Lara, C.A., Marques, S., Fonseca, C., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Sugiyamaella xylanicola* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 63, p. 2356-2360, 2013.

Morikawa, Y., Takasawa, S., Masunga, I., Takayama, K. Ethanol production from D-xylose and cellobiose by *Kluyveromyces cellobiovorus*. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 27, p. 509-513, 1985.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapfle, M., Ladisch, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v. 96, p. 673-686, 2005.

Munjal, N., Jawed, K., Wajid, S., Yazdani, S.S. A constitutive expression system for cellulase secretion in *Escherichia coli* and its use in bioethanol production. *PloS one*. v. 10, n. 3, p. e0119917, 2015.

Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 14, p. 578-597, 2010.

Oliveira, A.A., Mori, S.A. A central Amazonian terra firme forest. I. High tree species richness on poor soils. *Biodiversity and Conservation*. v. 8, p. 1219-1244, 1999.

Oliveira, A.N., Amaral, I.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*. v. 34, p. 21-34, 2004.

Pandey, A., Sukumaran, R.K. Plant-Based Biofuels An Introduction. In *Handbook of Plant-Based Biofuels*, editor Ashok Pandey, CRC Press. cap. 10, p. 141-158, 2009.

Paulová, L., Patáková, P., Branská, B., Rychtera, M., & Melzoch, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.002. 2014.

Pfüller, R., Gräser, Y., Erhard, M., Groenewald, M. A novel flucytosine-resistant yeast species, *Candida pseudoaaseri*, causes disease in a cancer patient. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 49, p. 4195-4202, 2011.

Pires, J.M. Estudos dos principais tipos de vegetação do estuário amazônico. Tese de Doutorado. ESALQ, Piracicaba. 183p, 1972.

Polish, J.A., Kim, J.H., Johnston, M. How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics*. v. 169, n. 2, p. 583-594, 2005.

Premjet, S., Pumira, B., Premjet, D. Determining the potential of inedible weed biomass for bio-energy and ethanol production. *BioResources*. v. 8, n. 1, p. 701-716, 2013.

Reis, A.L.S., de Souza, R.D.F.R., Torres, R.R.N.B., Leite, F.C.B., Paiva, P.M.G., Vidal, E.E., de Moraes, M.A. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *SpringerPlus*. v. 3, n. 1, p. 38, 2014.

Renewable Fuels Association (RFA). World fuel ethanol production. <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Acesso em 09 de Abril de 2015.

Rodríguez-Zuniga, U.F., Cannella, D., de Campos Giordano, R., Giordano, R.D.L.C., Jorgensen, H., Felby, C. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO. *Green Chemistry*. doi: 10.1039/C4GC02179G. 2015.

Rovere, E.L.L., Pereira, A.S., Simões, A.F. Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil. *World Development*. v. 39, n. 6, p. 1026-1036, 2011.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

Ryabova, O.B., Chmil, O.M., Sibirny, A.A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*. v. 4, n. 2, p. 157-164, 2003.

Sabina, J., Johnston, M. Asymmetric signal transduction through paralogs that comprise a genetic switch for sugar sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 284, n. 43, p. 29635-29643, 2009.

Saitoh, S., Tanaka, T., Kondo, A. Breeding of industrial diploid yeast strain with chromosomal integration of multiple β -glucosidase genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 106, p. 594-597, 2008.

Sánchez, O.J., Cardona, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 5270-5295, 2008.

Santos, R.O., Cadete, R.M., Badotti, F., Mouro, A., Wallheim, D.O., Gomes, F.C.O., Stambuk, B.U., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 99, p. 635-642, 2011.

Schatz, M.C., Delcher, A.L., Salzberg, S.L. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. *Genome Research*. v. 20, n. 9, p. 1165-1173, 2010.

Schmidell, W., Lima, U.D.A., Aquarone, E., Borzani, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, p.123-178, 2001.

Sena, L.M.F., Morais, C.G., Lopes, M.R., Santos, R.O., Uetanabaro, A.P.T., Morais, P.B., Vital, M.J.S., Morais Jr, M.A., Lachance, M.A., Rosa, C.A. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 110, p. 53-67, 2017.

Shi, J., George, K.W., Sun, N., He, W., Li, C., Stavila, V., Keasling, J.D., Simmons, B.A., Lee, T.S., Singh, S. Impact of pretreatment technologies on saccharification and isopentenol fermentation of mixed lignocellulosic feedstocks. *BioEnergy Research*, p. 1-10, 2015.

Silveira, A.A. Narrativas e memórias. Na região do Caraça. *Imprensa Oficial*, Belo Horizonte. v. 2, p. 445-474, 1924.

Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N.R. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel*. v. 116, p. 699-702, 2014.

Singhania, R.R., Parameswaran, B., Pandey, A. Plant-Based Biofuels An Introduction. In *Handbook of Plant-Based Biofuels*, editor Ashok Pandey, CRC Press. cap. 1, p. 3-12, 2009.

Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C., Pandey, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*. v. 127, p. 500-507, 2013.

Skory, C.D., Freer, S.N., Bothast, R.J. Properties of an intracellular β -glucosidase purified from the cellobiose-fermenting yeast *Candida wickerhamii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 46, n. 4, p. 353-359, 1996.

Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bom, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araújo, A., Torres, F.A.G. Bioethanol from

lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 4820-4825, 2010.

Spindler, D.D., Wyman, C.E., Grohmann, K., Philippidis, G.P. Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnology Letters*. v. 14, n. 5, p. 403-407, 1992.

Stambuk, B.U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. *Biochemical Education*. v. 27, p. 177-180, 1999.

Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 68, p. 205-210, 2000.

Suzuki, M., Kurtzman, C.P. *Schwanniomyces* Klockner emend. M. Suzuki & Kurtzman (2010). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 785-794, 2011.

Suzuki, M., Prasad, G.S., Kurtzman, C.P. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij (1952). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v. 2, p. 361-372, 2011.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

Tang, H.T., Hou, J., Shen, Y., Xu, L., Yang, H., Fang, X., Bao, X. High β -Glucosidase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of cellulase hydrolysis and ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 23, n. 11, p. 1576-1584, 2013.

Teugjas, H., Väljamäe, P. Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels*. v. 6, p. 104, 2013a.

Teugjas, H., Väljamäe, P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnology for Biofuels*. v. 6, p. 105, 2013b.

THEMAG Engenharia e Gerenciamento Ltda. Usina Hidrelétrica Lajeado. Estudo de Impacto Ambiental. Diagnóstico Ambiental. Socioeconomia. Vol II. Tomo C. Palmas, 1996.

Tomás-Pejó, E., García-Aparicio, M., Negro, M.J., Oliva, J.M., Ballesteros, M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 890-895, 2009.

van Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., Van, D.B.J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., Van, D.J.P., Pronk, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 90, p. 391-418, 2006.

van Rooyen, R., Hahn-Hägerdal, B., La Grange, D.C., Van Zyl, W.H. Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Biotechnology*. v. 120, n. 3, p. 284-295, 2005.

Viikari, L., Vehmaanpera, J., Koivula, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. *Biomass and Bioenergy*. v. 46, p. 13-24, 2012.

Wang, G., Liu, C., Hong, J., Ma, Y., Zhang, K., Huang, X., Zou, S., Zhang, M. Comparison of process configurations for ethanol production from acid- and alkali-pretreated corncob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without β -glucosidase expression. *Bioresource Technology*. v. 142, p. 154-161, 2013a.

Wang, X., Ike, M., Shiroma, R., Tokuyasu, K., Sakakibara, Y. Expression of neutral β -glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 116, n. 3, p. 362-365, 2013b.

Wang, Y., Ren, Y. C., Zhang, Z. T., Wu, F. H., Ke, T., & Hui, F. L. *Candida funiuensis* sp. nov., a novel cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotten wood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. ijs-0.000169. 2015.

Wei, N., Oh, E.J., Million, G., Cate, J.H., Jin, Y.S. Simultaneous utilization of cellobiose, xylose, and acetic acid from lignocellulosic biomass for biofuel production by an engineered yeast platform. *ACS Synthetic Biology*. 2015.

Wilde, C., Gold, N.D., Bawa, N., Tambor, J.H.M., Mougharbel, L., Storms, R., Martin, V.J.J. Expression of a library of fungal β -glucosidases in *Saccharomyces cerevisiae* for the development of a biomass fermenting strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 95, p. 647-659, 2012.

Wohlbach, D.J., Kuo, A., Sato, T.K., Potts, K.M., Salamov, A.A., Labutti, K.M., Sun, H., Clum, A., Pangilinan, J.L., Lindquist, E.A., Lucas, S., Lapidus, A., Jin, M., Gunawan, C., Balan, V., Dale, B.E., Jeffries, T.W., Zinkel, R., Barry, K.W., Grigoriev, I.V., Gasch, A.P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.

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

Zerbino, D.R., Birney, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. v. 18, p. 821-829, 2008.

Zerva, A., Savvides, A.L., Katsifas, E.A., Karagouni, A.D., Hatzinikolaou, D.G. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*. v. 162, p. 294-299, 2014.

Zha, J., Li, B-Z., Shen, M-H., Hu, M-L., Song, H., Yuan, Y-J. Optimization of CDT-1 and XYL1 expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*. v. 8, p. 1-8, 2013.

Zhang, Y-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. v. 24, p. 452-481, 2006.

Zhang, Z., Donaldson, A.A., Ma, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. *Biotechnology Advances*. v. 30, p. 913-919, 2012.