

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Priscila Nogueira Boggione Guimarães

**Isolamento e Identificação de Leveduras Fermentadoras de D-xilose
Associadas à Madeira em Decomposição do Cerrado e Floresta
Amazônica**

Belo Horizonte

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Priscila Nogueira Boggione Guimarães

**Isolamento e Identificação de Leveduras Fermentadoras de D-xilose
Associadas à Madeira em Decomposição do Cerrado e Floresta
Amazônica**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Susana Johann

Co-orientadora: Msc. Mariana Rocha
Lopes

Belo Horizonte

2013

Sumário

Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras.....	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O mundo e a energia.....	3
2.2 O Brasil e o Etanol.....	3
2.3 Bioetanol	5
2.4 Etanol de primeira geração	5
2.5 Bioetanol de segunda geração	6
2.6 Conversão da biomassa em etanol	7
2.7 Fermentação de D-xilose	8
2.8 Biodiversidade de leveduras	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1.Objetivo Geral	11
3.2.Objetivos Específicos	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1.Áreas de Coleta.....	12
4.1.1 Centro de Pesquisa Canguçu – Tocantins	12
4.2 Coleta e processamento das amostras	13
4.2.1 Isolamento das leveduras.....	13
4.2.2 Purificação e Manutenção das Leveduras.....	14
4.2.3 Seleção das Leveduras Fermentadoras de D-xilose.....	14
4.2.4 Identificação das Leveduras	15
4.2.5 Extração do DNA.....	15

4.2.6 PCR com o iniciador EI1	16
4.2.7 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4, ITS1 e ITS4	17
4.2.8 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento	18
4.2.9 Análise das sequências.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Isolamento de Leveduras	20
5.2 Teste de Fermentação	20
5.3 Identificação das leveduras fermentadoras de D-xilose	23
6. CONCLUSÕES.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

Lista de Tabelas

Tabela 1: Leveduras fermentadoras de D-xilose, a maior concentração de etanol em g/L produzida, o número total de isolados obtidos e o número de linhagens que fermentaram D-xilose.....21

Tabela 2: Leveduras sequenciadas e o número de linhagens encontradas.....25

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras.....	9
---	---

Resumo

A busca por fontes renováveis de energia tem crescido devido à exaustão gradativa dos combustíveis fósseis e ao forte impacto ambiental causado pela queima desses combustíveis. No Brasil, o bagaço da cana de açúcar é o principal resíduo lignocelulósico, e vem sendo foco de pesquisas para o desenvolvimento do etanol de segunda geração. O bagaço, fonte de celulose e hemicelulose que geram hexoses e pentoses para os processos fermentativos, é uma matéria prima de baixo custo e de ampla disponibilidade, já que está alocado nas destilarias. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada em processos fermentativos, é capaz de fermentar hexoses como a glicose, porém é incapaz de fermentar pentoses como a xilose. Assim, há a necessidade de novos estudos na busca por leveduras capazes de fermentar as pentoses liberadas na hidrólise da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar. Esse trabalho teve como objetivo o isolamento e identificação das leveduras associadas a madeira em decomposição, capazes de fermentar xilose, produzindo etanol. No presente estudo foi isolado um total de 236 leveduras a partir de 100 amostras de madeira em decomposição em dois ecossistemas brasileiros. Para o teste de fermentação foi utilizada a metodologia que emprega a reação das enzimas peroxidase e álcool oxidase para a dosagem do etanol produzido. A partir do total de 236 leveduras isoladas, 28 isolados (12%), foram capazes de produzir etanol fermentando xilose. A maioria dos isolados produtores de etanol foi de *Cryptococcus laurentii*, com nove isolados, seguida por *Meyerozyma guilliermondii* (cinco isolados), *Scheffersomyces stipitis* (quatro isolados), *Asterotremella humicola* (dois isolados), *Cyberlindnera saturnus* (dois isolados), *Candida tropicalis* com dois isolados e *Rhodotorula mucilaginosa* com apenas um isolado. Três possíveis novas espécies foram encontradas no presente estudo, duas das quais pertencentes ao clado *Candida* e uma pertencente ao gênero *Geotrichum*. Os resultados deste trabalho mostram o potencial biotecnológico de micro-organismos isolados a partir de madeira em decomposição em ecossistemas brasileiros e o isolamento de novas espécies representa uma oportunidade única para o estudo taxonômico de leveduras.

Abstract

The search for alternative energy sources has been increased due to the gradual decrease of fossil fuels as well as the environmental impact caused by burning these fuels. In Brazil, sugar cane bagasse represents the main lignocellulosic waste, which has been the focus of research for the development of second generation ethanol. Sugar cane bagasse represent a promising source of cellulose and hemicelluloses, which consist of hexoses and pentoses that can be converted to ethanol by fermentation processes. Also bagasses are raw materials widely available with low cost, and already allocated in distilleries. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, used in fermentation processes, is able to ferment hexoses such as glucose, but is unable to ferment pentoses, such as xylose. According to above, new studies of yeasts able to ferment pentoses released from the hydrolysis of the hemicellulose fraction of sugar cane bagasse. The aim of the present study was the isolation, identification and characterization of yeasts associated with rotting wood able to ferment xylose ethanol. Two-hundred thirty-six yeasts isolates from 100 different rotting wood samples from two Brazilian ecosystems were obtained. In fermentation assays the reactions of peroxidase and alcohol oxidase here used to quantity ethanol. Of the 236 yeast isolates, 28 (12%) were able to produce ethanol by fermenting xylose. Among them, most ethanol producers were *Cryptococcus laurentii* (9 isolates), followed by *Meyerozyma guilliermondii* (5 isolates), *Scheffersomyces stipitis* (4 isolates), *Asterotremella humicola* (2 isolates), *Cyberlindnera saturnus* (2 isolates), *Candida tropicalis* (2 isolates) and *Rhodotorula mucilaginosa* (1 isolate). Two possible new species were found in this study, identified as *Candida* and *Geotrichum*. The results of this study indicate the importance of the biotechnological potential from Brazilian ecosystems of yeasts to be use in applications such as the production of bioethanol from lignocellulosic biomass.

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O setor industrial e o de transporte dependem de energias fósseis como derivados do petróleo, carvão e gás. Porém, essas fontes de energia são finitas, e estudos mostram que irão acabar em poucas décadas (Ortiz, 2010). Esses combustíveis são responsáveis pela emissão de CO₂ e outros gases que contribuem para o efeito estufa. Segundo Ricardo (Abramovay 2009), a utilização do etanol em substituição à gasolina reduz 90% da emissão de gases do efeito estufa. Por esse motivo, inúmeras pesquisas sobre combustíveis alternativos e fontes renováveis e sustentáveis de energia vêm sendo desenvolvidas (Ortiz,2010).

O bioetanol é um combustível obtido por meio da fermentação de açúcares, seguida da destilação, passando por um processo físico-químico até se transformar em combustível. Quando produzido a partir de resíduos vegetais, ou seja, por fontes lignocelulósicas, é chamado de bioetanol de segunda geração (Ortiz,2010). O bioetanol é uma boa alternativa devido ao seu valor competitivo bem como o curto prazo para sua produção (Mouro,2012).

No Brasil, o principal resíduo lignocelulósico é a cana-de-açúcar, uma fonte de celulose e hemicelulose constituídas por açúcares que podem ser utilizadas em processos fermentativos e produção de etanol (Mouro,2012). Segundo Pandey e Soccol (2000), o bagasso de cana de açúcar é muito utilizada por ter pouca lignina, alta concentração de carboidratos, por ser de fácil utilização e por ter um valor baixo na colheita, transporte e armazenamento.

A lignocelulose é composta por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é o mais abundante polímero do planeta e também a maior constituinte das plantas, sendo um polímero linear de glicose conectado por ligações β -1,4-glicosídicas. O segundo maior componente da biomassa lignocelulósica é a hemicelulose, um polímero heterogêneo de pentoses como xilose e arabinose e hexoses como manose e em menor quantidade glicose e galactose. O terceiro maior polímero heterogêneo da lignocelulose é a lignina composta por três álcoois aromáticos atuando como uma

barreira física por se ligar tanto à celulose quanto à hemicelulose (Anderson e Akin, 2008).

Para a produção do bioetanol lignocelulósico são necessárias três etapas: o pré tratamento, a hidrólise enzimática e a fermentação (Shen *et al.*, 2011). O pré-tratamento é importante para quebrar a estrutura da biomassa, deixando a celulose e a hemicelulose liberadas para que as enzimas possam converter carboidratos em açúcares permitindo assim a fermentação (Porzio *et al.*, 2011). A hidrólise enzimática é substrato específica, não ocorrendo a formação de subprodutos, o que reduz a inibição das seguintes etapas do processo, demonstrando melhores resultados para a posterior fermentação. A próxima etapa do processo é a fermentação dos açúcares liberados (Sánchez e Cardona, 2008).

Para produzir etanol a partir da matéria lignocelulósica, é essencial ter uma levedura capaz de fermentar hexoses e pentoses sob as condições adversas do ambiente industrial. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada com sucesso na indústria de etanol no Brasil, é capaz de fermentar hexoses de maneira rápida e eficientemente, exibe alta tolerância ao etanol, e tolerância a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação. Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar celobiose e pentoses como a xilose, que estão presentes em grandes quantidades em hidrolisados da biomassa lignocelulósica (Stambuket *al.*, 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O mundo e a energia

A desenvolvimento industrial e o social do século dos últimos tempos levou à necessidade de utilização de uma nova fonte de energia mais viável e em concordância com as definições da época, sendo a petroquímica a mais desenvolvida e utilizada (Van Maris *et al*, 2006). No entanto, com o passar do tempo, denotou-se que a citada fonte, ou seja, o petróleo, era mais um poluente para a atmosfera sendo ainda uma fonte não renovável, visto que são necessários milhões de anos para a sua formação. Recentemente ficou constatado que a descoberta e a produção de novas jazidas seriam inferiores à demanda do consumo, principalmente porque as economias globais desenvolvem-se rapidamente. Com isso, houve uma alta do preço do produto (Van Maris, 2006).

Com a chegada do século XXI novos conceitos a respeito da atmosfera global apareceram, nos quais se discute a respeito da poluição atmosférica, bem como a necessidade de uma fonte de energia renovável e, ainda, o aumento do preço do petróleo além da dependência dos países não produtores aos países produtores. Tudo isso levou à necessidade da busca de mais uma fonte de energia renovável e menos poluente. Assim, a produção de álcool combustível no Brasil e no mundo respondeu prontamente às necessidades globais, já que com os avanços tecnológicos nesse setor obteve-se um combustível além de ambientalmente correto, renovável e competitivo com a gasolina (Goldemberg, 2007).

2.2 O Brasil e o Etanol

Na década de 70, o mundo enfrentava a crise do petróleo e também a queda do preço do açúcar no mercado internacional. Este cenário levou o Brasil a desenvolver na produção da cana de açúcar ligada à fabricação de etanol, criando-se uma política

pública específica para o setor, sendo um dos seus pressupostos a mistura do álcool anidro na gasolina (Valéria, 2007).

Em vista do grande percentual (90%) de importação do petróleo, criou-se um programa para produção de energia própria e renovável, o bioetanol, com o nome de Pró-Álcool (Programa Nacional do Álcool), tendo como prerrogativas facilidades como o estabelecimento da mistura obrigatória de etanol à gasolina, empréstimos à juros baixos a produtores de cana para o plantio bem como para a construção de novas unidades (usinas) com garantias. Além disso, vantagens quanto ao preço do etanol em relação à gasolina, distribuição do etanol produzido em todo o país pela Petrobrás e, ainda, o estímulo do consumo do álcool por meio de propagandas. Tais providências levaram ao aumento de 500% na produção de etanol em menos de quatro anos (Leite *et al.*, 2007).

A continuidade da crise petrolífera avalizou a segunda etapa do programa, com a fabricação de veículos movidos a álcool hidratado os quais teriam os impostos reduzidos em relação aos veículos movidos a gasolina, além do preço do álcool ser aquém em relação ao da gasolina. No entanto o maior sucesso do Pró-Álcool veio na década de 80, quando a produção de etanol foi triplicada trazendo uma grande economia de divisas para o país, em vista da redução de importação de petróleo (Leite *et al.*, 2007).

Contudo, fatores que estimulavam a produção do etanol tal como a crise do petróleo haviam passado e o preço do açúcar no mercado internacional valorizou-se, levando a uma queda na produção de etanol e conseqüente falta do produto no mercado, gerando sérios transtornos, já que a produção de veículos a álcool estava em plena atividade (Valéria, 2007).

Com a citada queda de produção do etanol, o Brasil ficou obrigado a importar o mesmo para satisfazer o mercado interno, levando ainda à desativação do programa Pró-Álcool, restando como herança apenas a obrigatoriedade da mistura do etanol à gasolina. Porém, o Estado achou por bem continuar a incentivar a produção do álcool bem como o estímulo a produção de veículos “flex-fuel”, levando-se em consideração a competitividade do produto decorrente da facilidade da agropecuária brasileira relativamente ao clima e a extensão de terras, ligados à mão de obra barata e a

tecnologia e políticas públicas adequadas. A ideologia mundial também estimulou os países desenvolvidos à utilização do etanol principalmente os Estados Unidos (Valéria, 2007).

2.3 Bioetanol

O etanol é uma fonte de energia menos poluente e renovável, e por isso sua produção no cenário mundial tornou-se interessante (Ferreira et al, 2011). A produção mundial concentra-se mais no Brasil e nos Estados Unidos, responsáveis por 62% da mesma. No Brasil a produção é reduzida tendo como matéria-prima a sacarose da cana-de-açúcar, e nos Estados Unidos o amido de milho (Kim et al, 2004).

O etanol é um excelente combustível de motores. Comparado à gasolina apresenta vantagens tais fatores positivos como o maior valor de octanagem, que significa o uso mais eficiente nos motores de maior compressão, além de ser menos inflamável. Em contrapartida, é de se dizer que o valor de aquecimento é menor, o que leva a apresentar um menor conteúdo de energia (menos 33 % da gasolina) (Goldemberg, 2008).

2.4 Etanol de primeira geração

Caracteriza-se por etanol de primeira geração, aquele produzido por açúcares simples que são encontrados em vegetais (Raele, 2010). Apesar de ser mais obtido por melaço da cana de açúcar e do amido do milho, pode também ser obtido a partir de outras culturas ricas em açúcar tal como a beterraba e algumas frutas ou outras culturas também ricas em amido como a mandioca, batata, trigo, cevada e outros cereais (Naiketal, 2010).

A produção de etanol usando unicamente o método de primeira geração esbarra em problemas ambientais e produtivos na cadeia alimentar, já que são culturas

potencialmente alimentares (Porzioetal, 2011). No Brasil, existe o receio de que as plantações de cana de açúcar expandam desordenadamente, em áreas do Cerrado e na Floresta Amazônica. Caso a necessidade mundial aquecesse o mercado, tornaria mais rentável aos agricultores o plantio da cana-de-açúcar, em detrimento das plantações de culturas alimentares, que conseqüentemente seriam economicamente menos atrativas, o que culminaria na produção de uma única cultura, causando grande impacto ao solo, com risco de assoreamentos, além da contaminação de recursos hídricos (Rodrigues e Ortiz, 2006). Assim surgiu a necessidade de utilização de matéria prima não alimentar para a produção do etanol, sendo esta matéria prima citada encontrada na própria cana de açúcar com a utilização da biomassa lignocelulósica, ou seja, o “bagaço da cana de açúcar”. Tal produto recebe o nome de bioetanol de segunda geração (Agbogbo e Coward-kelly, 2008).

2.5 Bioetanol de segunda geração

O bioetanol de segunda geração ou etanol lignocelulósico é produzido por meio da biomassa lignocelulósica. Ele pode ser obtido do bagaço da cana-de-açúcar, da palha do milho ou palha do trigo que são de baixo custo, entre outros resíduos (Agbogbo e Coward-kelly, 2008). Em particular, a procura maior é para o bagaço da cana-de-açúcar devido à sua riqueza em polissacarídeos conversíveis em açúcares fermentáveis (Ferreira *et al*, 2011).

A lignocelulose é composta por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é o mais abundante polímero do planeta e também a maior constituinte das plantas, sendo um polímero linear de glicose conectado por ligações β -1,4-glicosídicas. O segundo maior componente da biomassa lignocelulósica é a hemicelulose, um polímero heterogêneo de pentoses como xilose e arabinose e hexoses como manose e em menor quantidade glicose e galactose. O terceiro maior polímero heterogêneo da lignocelulose é a lignina composta por três álcoois aromáticos atuando como uma barreira física por se ligar tanto à celulose quanto a hemicelulose (Anderson e Akin, 2008).

No processamento da lignocelulose para conversão à etanol, faz-se necessário o pré-tratamento com métodos termoquímicos para que ocorra a quebra da estrutura da biomassa. Assim, as enzimas que convertem carboidratos em açúcares acessam a celulose e a hemicelulose. A lignina é constituída por 10-20% da biomassa seca, sendo um polímero aromático contendo resíduos fenólicos, uma fonte potencial de inibidores da fermentação microbiana (Van Maris, 2006).

O bagaço da cana de açúcar, herbáceos e madeira em geral, são formados por 40-55% da celulose, 25-50% da hemicelulose e 19-40% de lignina (Galbe e Zacchi, 2007). O bagaço da cana de açúcar é a biomassa lignocelulósica mais abundante da indústria sucroalcooeira, o que favorece o Brasil na produção do bioetanol de segunda geração já que o país é um grande produtor dessa matéria prima (Macedo, 2007).

2.6 Conversão da biomassa em etanol

A produção de biocombustíveis baseada na hidrólise enzimática a partir de materiais lignocelulósicos, consiste em quatro fases principais, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação (Tomás-Pejóetal, 2009).

A lignina protege a celulose e a hemicelulose sendo um composto insolúvel em água e opticamente inativo, dificultando sua degradação, e está covalentemente ligada a hemicelulose por ligações éster do ácido ferúlico (Riano, 2010). Para a conversão de lignocelulose em etanol é necessária a deslignificação para liberar a celulose e a hemicelulose da lignina, a qual é feita por técnicas de pré-tratamento, que tornam a celulose e a hemicelulose mais acessíveis as enzimas que convertem carboidratos em açúcares, dando sequência as próximos passos da fermentação das hexoses e pentoses para produzir etanol (Porzio *et al.*, 2011).

A ligação glicosídica β -1,4 torna a celulose cristalina e compacta organizada em microfibrilas insolúveis, tornando difícil o acesso à glicose e causando resistência ao ataque por fatores biológicos. As regiões amorfas, ou seja, microfibrilas menos ordenadas e sem estrutura cristalina, são menos resistentes a degradação (Niga, 2011). Já a hemicelulose, é constituída por uma espinha dorsal de cadeia de xilana com

ligações β -1,4, com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glucurônico e outros, variando o grau de ramificação e identidade dos açúcares de acordo com o tipo de planta. A hemicelulose se liga a lignina nas fibras de celulose (Gray *et al.*, 2006).

Há uma grande dificuldade em encontrar um micro-organismo capaz de fermentar os diferentes açúcares presentes na biomassa lignocelulósica (Agbogbo e Coward-kelly, 2008). A hidrólise da hemicelulose libera um pool de açúcares (L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-manose e D-xilose) (Ferreira *et al.*, 2011) e, uma vez que o açúcar presente em maior quantidade é a xilose, sua conversão é um passo importante no uso de materiais lignocelulósicos (Ferreira *et al.*, 2011).

No etanol de primeira geração, utiliza-se a levedura *S. cerevisiae*, porém, a mesma é incapaz de fermentar pentoses que estão presentes no hidrolisado hemicelulósico, sendo assim, estudos estão dirigidos na procura por micro-organismos capazes de fermentar pentoses (Ferreira *et al.*, 2011).

2.7 Fermentação de D-xilose

A fermentação de D-xilose e outros açúcares de cinco carbonos é exigida no uso da hemicelulose para conversão em etanol, no entanto, poucos micro-organismos fermentam na presença de xilose comparado com a glicose, tornando difícil a fermentação (Wackett, 2008).

Para a produção de etanol de segunda geração comercialmente viável, estudos estão sendo realizados no sentido da co-fermentação da glicose e da xilose, já que as mesmas constituem a maior parte dos açúcares presentes nos hidrolisados da biomassa (Gray *et al.*, 2006). Todavia, a fermentação da mistura de hexoses e pentoses é ineficaz, uma vez que micro-organismos capazes de fermentar todos os açúcares com boa produção de etanol é desconhecido (Ragauskasetal, 2006).

Duas vias da fermentação da xilose são conhecidas. A primeira via é a oxiredutase, conservada entre determinadas espécies nativas de fungos e emprega enzimas comuns e co-fatores redox para catalisar a conversão dos substratos. O limite

desta via está no desequilíbrio do co-fator, pois há uma disparidade entre a quantidade e a acessibilidade intracelular de NADPH e NADH para as enzimas da via da xilose. Grande quantidade de xilitol é produzida devido a competição por NADH por outras enzimas metabólicas endógenas. A segunda via é a isomerase, que não necessita de co-fatores e consiste apenas na xilose isomerase, que converte diretamente xilose em xilulose (Agbogbo e Coward-kelly, 2008).

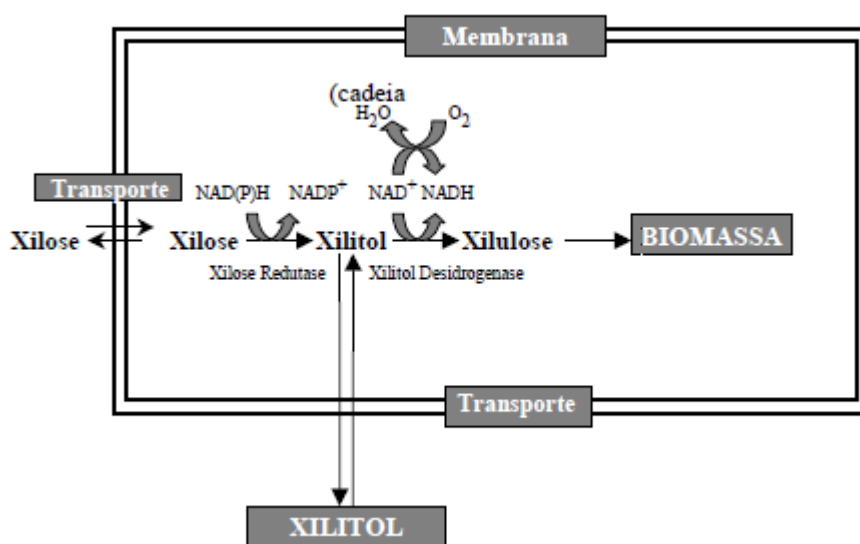


Figura 1: Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras (Cunha *et al.*, 2005)

O sistema de transporte da xilose para a entrada na célula da levedura é compartilhada com a glicose, o que é um fator limitante, pois a glicose inibe o transporte de xilose por inibição não competitiva no sistema de simporte de prótons, tornando a taxa de consumo de glicose maior que a de xilose (Agbogbo e Coward-kelly, 2008).

Portanto, para a produção de etanol de segunda geração em escala industrial, é necessário o isolamento de leveduras capazes de produzir xilanases e ou fermentar D-xilose (Cadete *et al.*, 2009) já a levedura *S. cerevisiae*, levedura atualmente utilizada no processo industrial de bioetanol de primeira geração, é incapaz de fermentar celobiose

e pentoses como a xilose, que estão presentes em grandes quantidades em hidrolisados da biomassa lignocelulósica (Stambuk et al., 2008).

2.8 Biodiversidade de leveduras

Em biotecnologia, os principais micro-organismos são as leveduras, sendo ainda restrito o uso de linhagens nativas em nosso país nos processos industriais. Ressalta-se a importância da correta identificação de uma espécie nos trabalhos ecológicos, aplicados e clínicos (Barbosa et al, 2009). Estimativas mostram que apenas 1% das leveduras do ambiente foram descritas (Kurtzman e Fell, 2011). Com uma tecnologia cada dia mais avançada e exploração de novos ambientes, a busca por novas espécies e linhagens de levedura tem sido cada vez mais frequente (Barbosa, 2010).

Em duas reservas da Floresta Amazônica no Brasil, Cadete e colaboradores (2012) isolou 224 leveduras de madeira em decomposição cultivados em meios YNB-D-xilose e YNB-xilana e encontrou sete possíveis novas espécies capazes de fermentar D-xilose, mostrando a importância do estudo da biodiversidade de leveduras voltado para processos biotecnológicos.

As identificações das leveduras é baseada em características morfológicas, testes fisiológicos e bioquímicos (Kurtzman, 2010). A distinção das espécies pode ser realizado por meio do sequenciamento de regiões do DNA, considerando que 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 e as sequências desta região de quase todas as espécies de leveduras estão depositadas no banco de dados do GenBank (Kurtzman *et al.*, 2011). Em uma outra vertente, há também a utilização de outras regiões, sendo uma delas o espaçador transcrito interno (ITS) do gene do rDNA. O uso conjunto das duas sequências dos domínios acima citados funciona melhor para a diferenciação das espécies (Lopes, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Identificar leveduras fermentadoras de D-Xilose, associadas à madeira em decomposição de ecossistemas brasileiros de Mata Atlântica e Floresta Amazônica, visando o emprego destas leveduras em processo de produção de etanol de segunda geração.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Selecionar dentre os isolados assimiladores de D-xilose aqueles capazes de fermentar D-xilose;
- Identificar e agrupar as leveduras fermentadoras de D-xilose, utilizando ferramentas fisiológicas e moleculares;
- Descrever novas espécies de leveduras fermentadoras de xilose a partir de madeira em decomposição;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Áreas de Coleta

4.1.1 Centro de Pesquisa Canguçu – Tocantins

O Centro de Pesquisa Canguçu – CPC, está localizado 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. A área é caracterizada como região ecotonal, por apresentar peculiaridades de cerrado e floresta amazônica. É uma região de elevado interesse científico tecnológico, econômico e social (Disponível em: <http://www.site.uft.edu.br/propesq/pesquisa/centro-de-pesquisa-cangucu.html>). Nesta área foram coletadas 13 amostras de madeira em decomposição, divididas em dois pontos de coleta: Trilha da Praia (cinco amostras) e Trilha do Lago (oito amostras).

4.1.2 Distrito de Taquaruçu - Tocantins

O distrito de Taquaruçu, localizado no estado do Tocantins, região serrana de Palmas, é conhecida como a pela riqueza de sua vegetação e clima ameno. O distrito possui diversas cachoeiras e balneários naturais, sendo considerado como um dos principais atrativos turísticos do Tocantins (Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Taquaru%C3%A7u_\(Tocantins\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Taquaru%C3%A7u_(Tocantins))). Essa região faz parte da área rural de Palmas e está situado na Área de Proteção Ambiental (APA) Serra do Lajeado. Neste distrito foram coletadas 36 amostras, divididas em dois pontos de coleta: butincal (18 amostras) e bela vista (18 amostras).

4.1.3 Município de Mucajaí – Roraima

O município de Mucajaí localiza-se na porção centro-oeste de Roraima, a aproximadamente 50 km da cidade de Boa Vista. Possui uma cobertura vegetal característica de floresta ombrofila densa e floresta de transição (Silva, 1997). O município tem sua estrutura fundiária baseada em minifúndios situados na faixa de 60 a 100 hectares (Freitas, 2001). Neste município foram coletadas 51 amostras de madeira em decomposição.

4.2 Coleta e processamento das amostras

Cinquenta amostras de madeiras em decomposição foram coletadas em cada um dos locais de amostragem. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterelizados devidamente identificados e processadas em laboratório num período de, no máximo, 24h em relação à coleta.

4.2.1 Isolamento das leveduras

Para o isolamento das leveduras um grama de cada amostra de madeira em decomposição foi adicionado a tubos Fálcon contendo 20 mL do meio YNB-Xilana (xilana 1%, Yeast Nitrogen Base 0,67%, cloranfenicol 0,02%), segundo Cadete *et al.* (2012). Também foi adicionado um grama de cada amostra a tubos contendo 20 mL do meio YNB-D-xilose (D-xilose 0,5%, Yeast Nitrogen Base 0,67%, cloranfenicol 0,02%) (Cadete *et al.*, 2012). Os frascos foram incubados em agitador horizontal (modelo New BrunswickScientific 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 500 µL foi transferida a tubos contendo 5 mL do mesmo meio utilizado

anteriormente. Os tubos foram incubados sob as mesmas condições anteriores e daqueles que apresentaram crescimento, uma alçada foi semeada em placas de Petri contendo ágar extrato de malte e extrato de levedura (YM, glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%), acrescido de 0,02% de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25°C até a observação do crescimento de colônias.

4.2.2 Purificação e Manutenção das Leveduras

A partir 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%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na^2PO^4 0,2%) com 20% de glicerol e conservadas a -80° C. As leveduras isoladas durante o estudo foram depositadas na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG.

4.2.3 Seleção das Leveduras Fermentadoras de D-xilose

Foi realizado um teste de triagem com as leveduras isoladas dos meios YNB-xilana e YNB-D-xilose quanto à fermentação de D-xilose. Para tanto, meia alçada da cultura pura e recente (24-48h de crescimento) da levedura cultivada em meio ágar YM foi diluída em água destilada estéril. Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi inoculada em tubos contendo 2 mL do meio YPX (D-xilose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 1%). O meio YPD (glicose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 1%) foi utilizado como controle positivo. Os tubos foram incubados em agitador horizontal (modelo New BrunswickScientific CO. INC. séries 25) sob agitação a 150 rpm e 25°C. Foram retiradas alíquotas de 100 µl de cada amostra no período de 24h, 48h e 72h. As alíquotas foram 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 utilizando as enzimas álcool oxidase (AOD, de *Pichia pastoris*, Sigma) e peroxidase, (POD, Toyobo). O ensaio para detectar a produção de etanol foi realizado em microplacas de 96 poços (fundo plano), contendo $10\ \mu\text{L}$ da amostra e $200\ \mu\text{L}$ do reagente enzimático contendo $0,5\ \text{U ml}^{-1}$ de AOD, $4,0\ \text{U ml}^{-1}$ de peroxidase, $14\ \text{mM}$ de 4-aminoantipirina e $60\ \text{mM}$ de fenol em tampão $0,1\ \text{M}$ fosfato de sódio pH 7,5, por poço (Mouro, 2012). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C . Após este período foi determinada a absorbância a $505\ \text{nm}$ utilizando o leitor de placas (TecanInfinite M 2000). A concentração de etanol em cada poço foi determinada pela correlação das absorbâncias das amostras com as absorbâncias da curva padrão, construída por soluções de etanol contendo 0, 1,2, 4, 5, 7, 8, e $10\ \text{g L}^{-1}$ de etanol. Linhagens da levedura de referência das espécies *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, fermentadoras de D-xilose (Kurtzman *et al.*, 2011a), foi utilizada como padrão nos testes de fermentação.

4.2.4 Identificação das Leveduras

As leveduras que foram capazes de fermentar D-xilose foram agrupadas por análise molecular, por meio de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) utilizando o iniciador EI1 ($5'$ - CTGGCTTGGTGTATG) para a realização do agrupamento das leveduras em perfis moleculares distintos.

4.2.5 Extração do DNA

Para a extração do DNA total, os isolados foram crescidos em ágar extrato de malte e extrato de levedura (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%) por 24 horas a 25°C . Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em $100\ \mu\text{L}$ de tampão de lise (Tris-HCl $0,05\text{M}$, EDTA

0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1%) 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 que ocorresse a precipitação do DNA. Após esse tempo, 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%. Efetuou-se novamente uma centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e os tubos foram incubados a temperatura ambiente *overnight* para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de tampão Tris EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e estocado a – 20 °C.

4.2.6 PCR com o iniciador EI1

Para o agrupamento das leveduras, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR utilizando-se o iniciador EI1 (5`- CTGGCTTGGTGTATG), segundo de Barros Lopes e colaboradores (1996, 1998). Cada ensaio de PCR foi realizado num volume final de 25 µL contendo: 1µL de DNA, 2,0 µL do iniciador EI1 10 pmol-1 (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5M (Fermentas), 1,0 µL de DNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Taq DNA Polymerase Fermentas), 1,0 µL de Betaína 5M (Sigma-Aldrich), 0,5µL de DMSO (Sigma-Aldrich) e o volume final foi completado com água deionizada esterelizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf) sob as condições descritas por de Barros Lopes e colaboradores (1996): 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% 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), durante aproximadamente 1 hora a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

4.2.7 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4, ITS1 e ITS4

Das leveduras que apresentaram perfis moleculares distintos um isolado foi selecionado para o sequenciamento 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') (Lachance *et al.*, 1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5µL de tampão de PCR 10X (Fermentas, Lithuania), 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), 2 a 5 µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Fermentas), 2,0 µL de Betaína 5M (Sigma-Aldrich, USA), 1,0µL de DMSO (Sigma-Aldrich) e o volume final foi completado com água deionizada estéril. 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 do iniciador 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 espécies novas, tiveram a região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA amplificada. Para isso foram utilizados os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) conforme descrito por White e colaboradores. (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5µL de tampão de PCR 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), 2 a 5 µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Fermentas), 2,0 µL de Betaína 5M (Sigma-Aldrich, USA), 1,0µL de DMSO (Sigma-Aldrich) e o volume final foi completado com água deionizada esterelizada. 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% em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

4.2.8 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

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. A reação foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para que ocorresse 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% 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 colocados por 20 minutos a 37°C para evaporação do restante do etanol. O DNA foi então ressuspensionado 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 utilizando-se o Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000, no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão gênica (NAGE) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.2.9 Análise das sequências

As sequências 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 sequências obtidas foram comparadas às sequências já depositadas no GenBank, e as sequências similares foram alinhadas usando o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis- MEGA- 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Isolados apresentando similaridade na sequência analisada de 99% ou mais em relação a outro já depositado no GenBank foram considerados como pertencentes àquela espécie conhecida. Microorganismos que apresentaram sequências com similaridade menor ou igual a 98% na região do DNA analisada foram designados com o termo “similar”, e podem representar uma nova espécie. O poder discriminatório das sequências 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 no máximo de duas a três bases não-contíguas diferentes em uma região de cerca de 600 nucleotídeos (Kurtzman *et al.*, 2011). As sequências das espécies novas encontradas foram depositadas no GenBank.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de Leveduras

Um total de 236 isolados de leveduras a partir de 100 amostras de madeira em decomposição, sendo 13 amostras coletadas no centro de pesquisa Canguçu na trilha da praia e Trilha do Mato Verde e 36 amostras coletadas em Taguaruçu, divididas em Buritizal e Belas Vista, totalizando 49 amostras no estado de Tocantins. No estado de Roraima no município de Mucajaí foram coletadas 51 amostras.

Morais (2013) isolou 326 leveduras a partir de 100 amostras de madeira em decomposição coletadas na RPPN – Parque do Caraça no estado de Minas Gerais e RPPN Serra Bonita no estado da Bahia e utilizou dois diferentes meios de enriquecimento em seu trabalho, YNB-xilana e YNB-D-xilose, os mesmos que neste trabalho.

A diferença entre os biomas coletados, sendo o trabalho de Moraes (2013) um bioma da Mata Atlântica e o presente trabalho no Cerrado, pode justificar a diferença entre a quantidade de leveduras isoladas nos trabalhos citados.

5.2 Teste de Fermentação

O teste de fermentação foi feito com todas as leveduras isoladas. Um total de 236 leveduras, vinte e oito, 11,8 % foram capazes de produzir etanol, utilizando como única fonte de carbono a D-xilose. Todas as leveduras que produziram etanol, foram isoladas no estado de Tocantins. A tabela 1 traz os resultados da identificação dos isolados fermentadores com os valores de etanol produzidos em g/L.

Morais (2013) testou 326 leveduras isoladas a partir de madeira em decomposição e 49 leveduras, 15% dos isolados, foram capazes de produzir etanol,

utilizando YNB-xilana e YNB-D-xilose como meio de enriquecimento. Este autor utilizou a metodologia que emprega a reação das enzimas peroxidase e álcool oxidase para a dosagem de etanol produzido, a mesma metodologia utilizada no presente estudo. A utilização do mesmo método pode justificar a semelhança nos resultados encontrados nos dois estudos. Cadete (2012) testou 224 leveduras isoladas de madeira em decomposição na região da Floresta Amazônica, e trinta e três (14,7%) foram capazes de fermentar D-xilose. A metodologia utilizada foi a de tubos de Durhan, porém, Cadete (2012) observou diferença nos resultados de fermentação entre tubos de Durhan e testes de fermentação em escala de bancada, uma vez que utilizando a espécie *Spathaspora arborariae* não houve produção de gás no tubo de Duhan, porém esta espécie apresentou maior rendimento em etanol nos testes de fermentação em escala de bancada que *Scheffersomyces shehatae*, que apresentou fermentação completa do tubo de Durhan, mostrando que os testes nos tubos de Duhan não são uma boa metodologia para determinação de fermentação.

Tabela 1: Identificação de leveduras fermentadoras de D-xilose e produção de etanol.

Espécie	Código	Melhor Produção de etanol em g/L
<i>Cryptococcus laurentii</i>	4TA1	0,91 em 24h
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	15TE1	0,96 em 72h
<i>Cândida tropicalis</i>	16TA1	1,50 em 72h
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	16TE1	1,66 em 24h
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	17TA1	0,98 em 72h
<i>Cândida sp.</i>	30TE1	0,95 em 72h

<i>Cândida sp.</i>	31TE1	1,08 em 24h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	36TA1	0,88 em 72h
<i>Cândida tropicalis</i>	38TA2	1,01 em 72h
<i>Geotrichum sp.</i>	38TE1	1,30 em 72h
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	39TA1	1,03 em 72h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	39TE1	1,31 em 24h
<i>Asterotremella humicola</i>	40TE1	0,97 em 72h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	41TA2	0,97 em 24h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	42TA1	0,98 em 72h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	42TA4	0,95 em 48h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	43TA1	0,85 em 72h
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	44TA1	0,95 em 24h
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	44TE2	1,12 em 72h
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	45TE1	4,69 em 72h
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	45TA1	3,44 em 72h
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	45TE2	0,93 em 48h
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	46TA1	3,57 em 72h
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	47TA2	2,20 em 72h
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	47TA1	0,80 em 72h
<i>Asterotremella humicola</i>	48TA2	0,95 em 24h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	48TA1	1,12 em 72h
<i>Cryptococcus laurentii</i>	49TA1	1,44 em 48h

5.3 Identificação das leveduras fermentadoras de D-xilose

A partir das vinte e nove leveduras identificadas, foram encontradas três possíveis novas espécies, duas pertencentes ao gênero *Candida* e uma pertencente ao gênero *Geotrichum*. Para as três leveduras encontradas o depósito das sequências já foi realizado no GenBank, mas a espécie ainda não foi descrita formalmente. Na tabela 2, lista-se as leveduras identificadas e o número de linhagens isoladas.

Dentre as espécies identificadas, a mais frequente neste trabalho foi *Cryptococcus laurentii* totalizando nove isolados (27%). Cadete e colaboradores (2012) também encontrou essa levedura em amostras de madeira em decomposição na Floresta Amazônica, utilizando o meio D-xilose. Santos (2010) obteve 76,3% dos seus isolados em bagaço de cana de açúcar, a espécie *C. Laurentii*, com atividade para a enzima xilanase, importante na hidrólise da hemicelulose em açúcares simples. Morais (2013) também isolou *Cr. Laurentii* com atividade para a enzima xilanase de madeira em decomposição em ecossistemas da Mata Atlântica. Segundo Kurtzman e colaboradores (2011) a maioria das espécies de leveduras encontrada em meio D-xilose e xilana já foram associadas a ambientes terrestres tais como solo, flores, frutas, madeira em decomposição e intestino de besouro. Como Cadete (2012), Morais (2013) e o presente trabalho isolaram *C. laurentii* de madeira em decomposição, conclui-se que este substrato pode ser um habitat natural para esta espécie.

O segundo clado de isolados de levedura dominante no presente trabalho foi *Meyerozyma guilliermondii*, com quatro isolados (13%). Cadete (2012) em seu trabalho, isolou *M. guilliermondii* de madeira em decomposição na Floresta Amazônica.

Do mesmo modo, quatro isolados (13%), foram encontrados a levedura *Scheffersomyces stipitis*. De todas as leveduras encontradas, *S. stipitis* foi a que teve a melhor produção de etanol a partir de D-xilose. Segundo Liu e colaboradores (2012) é uma ótima levedura para a produção de bioetanol, já que possui a capacidade de catabolizar glicose, manose, galactose, ramnose, xilose, arabinose, celobiose, e até mesmo alguns compostos de lignina, além de alta produção de etanol, forte resistência

à contaminações e desintoxicação dos inibidores derivados da biomassa. Porém, os mecanismos metabólicos desta levedura na produção de etanol são pouco conhecidos e suas características fisiológicas e genéticas ainda não são bem caracterizadas. Morais (2013) das 326 leveduras isoladas obteve sete isolados (14,28%) de *S. stipitis* capazes de fermentar D-xilose, com uma porcentagem semelhante a encontrada no presente estudo. Segundo Nardi e colaboradores (2006) essa levedura foi originalmente isolada de larva de insetos e está intimamente relacionada com várias leveduras endosimbiontes de besouros que habitam e degradam madeira em decomposição.

A levedura *Asterotremella humicola* foi encontrada com dois isolados. Segundo Liu (2011) esta espécie tem sido isolada do solo, plantas e cogumelos. Cadete (2012) isolou, de um total de 224 leveduras, oito linhagens em meio YMB-D-xilose e dez linhagens em meio YMB-xilana isoladas de madeira em decomposição, maior número de isolados comparado com o presente trabalho.

Somente um isolado da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi encontrado. Morais (2013) também encontrou um isolados desta levedura no parque do Caraça-MG, o mesmo valor do presente trabalho. Segundo Kurtzman e colaboradores (2011) essa espécie é generalista e já foi isolada de vários substratos.

Um isolada da levedura *Cyberlindnera saturnus* foi encontrado. Segundo Kurtzman e colaboradores (2011) esta é relatada como uma espécie típica de solo. Porém, Morais (2013) e Cadete (2012) também isolaram esta levedura de madeira em decomposição mostrando que este substrato também pode ser o habitat natural desta levedura.

Apenas um isolado de *Candida tropicalis* foi encontrado no presente trabalho. Esta espécie já foi isolada de frutos, flores, solos, água e espécimes clínicos (Lachance et al. 2011). Rao e colaboradores (2008) isolaram essa espécie em frutas em decomposição. Segundo Sanches e colabores (2008), *C. tropicalis* é uma ótima levedura produtora de xilitol a partir de D-xilose e a produção de etanol a partir de D-xilose.

Tabela 2: Leveduras identificadas e o número de linhagens isoladas a partir de madeira em decomposição.

Espécie	Número de Isolados
<i>Cryptococcus laurentii</i>	9
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	5
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	4
<i>Asterotremella humicola</i>	2
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	2
<i>Candida tropicalis</i>	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Candida sp.</i>	1
<i>Candida sp.</i>	1
<i>Geotrichum sp.</i>	1

6. CONCLUSÕES

- A partir de 236 leveduras isoladas de madeira em decomposição, 30 % foram capazes de fermentar D-xilose produzindo etanol, no estado de Tocantins. Com isso, conclui-se que este substrato é interessante para estudos biotecnológicos na produção de bioetanol de segunda geração.
- Das leveduras isoladas, a espécie que apresentou a melhor produção de etanol foi a *Shefferomyces stipitis*, encontrada no estado de Tocantins.
- Do isolamento de três possíveis novas espécies, vê-se a necessidade de posteriores estudos para a produção de bioetanol em grande escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVAY, R.: Biocombustíveis: A Energia Da Controvérsia. SENAC SAO PAULO 2009.

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G.: Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeasts, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett.* v. 30, p.1515–1524, 2008.

ANDERSON, W. F.; AKIN, D. E.: Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* v. 35(5), p. 355-366, 2008.

BARBOSA, A.C.; CADETE, R.M.; GOMES, F.C.O.; 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* 59: 2105-2107, 2009.

BARBOSA, A.C.; Diversidade e taxonomia de leveduras em flores de *Heliconia psittacorum*, dissertação de Mestrado; Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.

BASTOS, V.D. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007

CADETE, R. M.: Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulasas e xilanases associadas à madeira em decomposição. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

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:e43135, 2012.

CUNHA, M.A.A.; SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J. C.; Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitola partir de bagaço de cana-de-açúcar, 2005.

FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R. M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S.; Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian Forest. *Yeast*, v. 28, p. 547–554, 2011.

FREITAS, A.: Geografia e Historia de Roraima. 6ª ed. Editora DLM, Boa Vista, RR, 2001.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 108, p. 41-65, 2007.

GOLDEMBERG, J.: Ethanol for a sustainable energy future. *Science*. v.315, p.808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J.: The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for biofuels*, v. 1 p. 1-6, 2008.

GUOZZ, L.; DING, Z.; GU, Z.; SHI, G.: Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. *Enzyme and microbial technology*, 2011.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M.: Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, p. 141–146, 2006.

KIM; DALE, B.E.: Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, p. 361-375, 2004.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.: Yeast Systematics and Phylogeny - implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. In: ROSA, C.A.; GÁBOR, P. Biodiversity and ecophysiology of yeast, Berlin: Springer, p.11-30, 2006.

KURTZMAN, C.P.: Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*, 2010.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E.. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v.2, p.334-335, 2011.

LACHANCE, M.A.; In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v.2, p.575-620, 2011.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. *O Biocombustível no Brasil*, 2007.

LIU, Y. R.; HUANG, L. Y.; YOUNG, S. S.; CHANG, C. F.; LEE, C. F. *Asterotremella meifongana* sp. nov. and *Asterotremella nantouana* sp. nov., two anamorphic basidiomycetous yeasts isolated from soil and mushrooms, v. 99, p.643-650, 2011.

LIU, T.; ZOU, W.; LIU, L.; CHEN, J.. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitidis* for improved ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, p.72, 2012.

Lopes M.R.; *Taxonomia e caracterização de leveduras fermentadoras de Celobiose isoladas de ecossistemas brasileiros; Projeto de Doutorado; Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.*

MACEDO, I. C.: Situação atual e perspectivas do etanol. *Estudos Avançados*, v. 21, p. 157-165, 2007

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

MOURO, A. Fermentação de Xilose e Celobiose por Leveduras Isoladas da Biodiversidade Brasileira. Universidade Federal de Santa Catarina; Florianópolis; 2012.

MORAIS P.B.; PAGNOCCA, F.C.; ROSA, C.A.: Yeast communities in tropical rain forests in Brazil and other South American ecosystems. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*. (eds) pp.461-484, 2006.

MORAIS C.G.: Isolamento e identificação de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de xilanases associadas à madeira em decomposição de dois ecossistemas de Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Minas Gerais 2013.

NARDI JB, BEE CM, MILLER LA, NGUYEN NH, SUH SO, BLACKWELL M.: Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. *Arthropod Struct Dev.* 35:57–68, 2006.

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.

NIGA, E.: Bioethanol from lignocellulosic biomass: A review. *Stefan cel Mare University*, v. 2, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 59, p. 12–22, 2000.

PORZIO, G.F.; PRUSSI, M.; CHIARAMONTI, D. Process analysis and modelling for 2nd generation lignocellulosic bioethanol production. *Chemical Engineering Transactions*, v. 25, p. 869-874, 2011.

RAELE, R. A aplicação de um modelo de construção de cenários no setor produtivo de etanol: um estudo sobre o etanol de segunda geração, 2010.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK JR, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T.: The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, v. 311, p. 484-489, 2006.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S.: Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology* v. 47, p. 19–24, 2008.

RIANO, S.; MORALES, G.; HERNANDEZ, M.; BARRERO, R.; Bioethanol production from agroindustrial lignocellulosic by products. Tumbaga, 2010

RODRIGUES, D; ORTIZ, L; Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana de açúcar no Brasil, Disponível em: http://www.natbrasil.org.br/Docs/biocombustiveis/sustentabilidade_etanol_port.pdf2006.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99: 5270–5295, 2008.

SANTOS, R. O.: Leveduras fermentadoras de pentoses e produtoras de xilanases e celulases associadas ao bagaço de cana-de-açúcar em decomposição. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER, J.N.; Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8945–895, 2011.

SILVA, E.L.S. . A vegetação do estado de Roraima. In: Homem, ambiente e ecologia no estado de Roraima. Barbosa, R.I., E.J.G. Ferreira e E.G. Castellon (eds.). pp. 401-415. INPA, Manaus, AM, 1997.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. A. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific & Industrial Research*. v. 67, p. 918-926, 2008.

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* 100: 890–895, 2009.

Tocantins, disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Taquaru%C3%A7u_\(Tocantins\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Taquaru%C3%A7u_(Tocantins)), acesso em 20 de dezembro de 2012.

Universidade Federal de Tocantins (UFT), disponível em: <http://www.site.uft.edu.br/propesq/pesquisa/centro-de-pesquisa-cangucu.html>, acesso em 5 de julho de 2012.

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* 90: 391- 418, 2006.

WACKETT, L. P.: Microbial-based motor fuels: science and technology. *Microbial Biotechnology*, v. 1, p. 211–225, 2008.