
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LIU YU PING

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS
DE D-XILOSE / L-ARABINOSE**



Rio Claro
2010

LIU YU PING

SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS
DE D-XILOSE / L-ARABINOSE

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

576 Liu, Yu Ping
L783s Seleção de leveduras fermentadoras de D-xilose / L-arabinose / Liu Yu
Ping. - Rio Claro : [s.n.], 2010
27 f. : il., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Microorganismos. 2. Microbiologia aplicada. 3. Fermentação. 4.
Pentoses. I. Título.

Dedico aos meus pais, minha irmã Letícia e
aos amigos, que marcaram a minha vida...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por acompanhar-me na minha jornada de vida em todos os momentos.

Aos meus pais, por serem um exemplo a ser seguido por mim, por minha educação, por acreditarem que conseguiria realizar o sonho de ser bióloga, pelo apoio emocional e financeiro.

A toda minha família, em especial a minha irmã Lelê pelo incentivo e carinho.

A todos aqueles que estiveram presentes em minha vida e que muito contribuíram para minha formação, em especial às tias Fang e Wu.

Ao tio Huang, por ser meu motorista nas horas que eu mais preciso.

Ao meu querido orientador, Professor Dr. Fernando Carlos Pagnocca, por ter aceitado me orientar, por toda a orientação, ensinamento e incentivo.

Aos docentes, por contribuírem na minha formação de bióloga.

À querida Professora Dra. Vera Lúcia Scatena, nossa “brotha”, pelo carinho e atenção especial por mim.

À Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande (Pindamonhangaba, SP), pela coleta das leveduras estudadas neste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, Bruna (por me ceder as leveduras), André, Mara, Derlene, Ana Paula, Fábio, Ife, Virg, Dirce, Sílvio e Weilan.

Às minhas “veteranas”, Thata, Tati, Paula e Aline, pelo apoio e incentivo, por ouvir-me em meus momentos de crise profissional e de vida.

À Carol “Poita”, pelos conselhos e incentivos na minha vida profissional.

À Mari “Dengue” e Vivi, pelos conselhos e incentivos e por ouvir-me nas horas de indecisão.

À minha querida Paulinha, pela grande amizade, dedicação, carinho e incentivo. Foi essencial a sua presença nestes quatro anos. Com você aprendi a viver melhor, a lidar com pessoas e resolver melhor os problemas. Obrigada por dividir o carinho dos seus pais, Paulo e Vera, comigo. Obrigada por acompanhar-me, sorrindo ou chorando juntos, em todos os momentos. Vou sentir saudades da nossa vida “inseparável”.

Aos meninos, Frodo, Pivs, Socó, Betânia, Hanson, Siri e Ursão, pela amizade, pelos encontros de games e jogos, pelos lanches e sorvetes.

Às meninas que fizeram parte da minha república, Ana e Fê. Por nossas conversas, risadas e aniversários surpresas. Vocês foram essenciais no começo de tudo, foi uma pena por não podermos estar juntas até o fim.

A todos os colegas da minha turma de Biologia 2007, pelas boas memórias em aulas durante estes quatro anos, em excursões de Picinguaba e de Pantanal.

Por fim, gostaria de agradecer todos que me ajudaram e fizeram parte da minha vida nestes quatro anos bem vividos.

Obrigada, obrigada, obrigada!!!...

Confúcio disse: “Explorar o antigo e deduzir o novo forma um mestre.”
(Os Analectos, Confúcio)

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	07
1.1 Material lignocelulósico.....	07
1.2 Capacidade fermentativa de pentoses pelas leveduras.....	08
1.3 Identificação e preservação das leveduras.....	09
2 OBJETIVOS.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Leveduras.....	11
3.2 Testes para análise de capacidade fermentativa de pentoses.....	12
3.2.1 Teste de assimilação.....	12
3.2.2 Teste de fermentação.....	12
3.2.3 Teste de produção de etanol.....	12
3.3 Análise dos resultados.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5 CONCLUSÕES.....	18
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
7 ANEXOS.....	23
7.1 Anexo 1 - Tabela de estirpes de leveduras utilizadas neste trabalho.....	23
7.2 Anexo 2 – Identificação das estirpes fermentadoras de glicose.....	25
7.3 Anexo 3 - Procedência das drogas utilizadas no trabalho.....	26

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são micro-organismos eucariotos (fungos) que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade, que contêm parede celular e não realizam fotossíntese. Elas são comumente encontradas em uma grande diversidade de habitat.

Elas são comumente utilizadas em processos fermentativos industriais para produção de açúcares, bebidas alcoólicas e biocombustíveis. Aproximadamente metade das mais de 800 espécies conhecidas fermenta glicose, porém são raras as espécies fermentadoras de pentoses. De acordo com Hahn-Hägerdal et al (2007), somente 12 de 670 espécies de leveduras analisadas fermentam D-xilose e/ou L-arabinose.

1.1 Material lignocelulósico

O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso lignocelulósico que contém celulose e hemicelulose embebidos em uma matriz de lignina (PANDEY et al., 2000).

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (RAMOS, 2003; CAMPBELL, 2000). A sacarificação deste carboidrato por enzimas de fungos e bactérias requer a ação de várias enzimas altamente específicas, cujo produto principal final é a glicose (RIDIEL et al., 1997; GÓMEZ, 1985).

Já a hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (4-O-ácido metil-glucurônico e ácido galacturônico) (RAMOS, 2003). Sua hidrólise é realizada pelas enzimas do complexo xilanolítico, que hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da molécula de xilana (principal polissacarídeo da hemicelulose), resultando em despolimerização do substrato (WONG et al., 1988). D-Xilose é o açúcar mais abundante nesta fração hemicelulósica.

A lignina é uma macromolécula fenólica amorfa formada pela polimerização de radicais livres de unidades de álcool *p*-hidroxicinâmico com variados grupos metoxilas (RAMOS, 2003). As principais enzimas que a degradam são: as lignina-peroxidases (LiP), que catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio (DURAN & ESPOSITO, 2000); as manganês-peroxidases (MnP), que

catalisam a oxidação de fenóis monoaromáticos e outros derivados aromáticos que dependem de peróxido de hidrogênio e de manganês divalente (KARAM & NICELL, 1997) e as fenol-oxidases como a lacase, que catalisam as reações de oxidação dos componentes fenólicos ou não fenólicos quando em presença de um mediador (DURAN & ESPOSITO, 1997).

Além do bagaço de cana, existem outras matérias-primas que contêm os compostos citados anteriormente sendo que a proporção relativa de cada tipo de açúcar depende da matéria-prima. Um exemplo é a fração hemicelulósica da madeira que é rica em pentoses, principalmente a D-xilose e a L-arabinose (HAHN-HÄGERDAL et al, 2007) que são pentoses industrialmente importantes. No entanto, algumas biomassas celulósicas, como palha de milho e fibras de muitas culturas herbáceas, contêm quantidades significativas de L-arabinose (HESPELL, R. B. 1998; MCMILLAN, J. D. & BOYNTON, B.L. 1994; BECKER, J. & BOLES, E. 2003).

1.2 Capacidade fermentativa de pentoses das leveduras

A partir da crise energética no início dos anos 1970, iniciou-se investigação e desenvolvimento que visam à produção sustentável de combustíveis e produtos químicos a partir de fontes de matérias primas provenientes da agricultura (ROSENBERG, 1980; HAHN-HÄGERDAL et al, 2007).

O interesse na exploração de matérias lignocelulósicas não está restrito apenas à produção de biocombustíveis, mas também para a produção de açúcares industrialmente interessantes (FARRELL et al. 2006; GRAY et al. 2006; HAHN-HÄGERDAL et al, 2007). No entanto, ainda não existe a produção destes compostos de maneira industrialmente viável, indicando assim várias dificuldades a serem enfrentadas para se chegar a um processo economicamente viável (HAHN-HÄGERDAL et al, 2007). Um processo somente será designado como economicamente viável se houver uma redução significativa de tempo e consumo de energia, além de bom rendimento.

A capacidade de fermentar pentoses a etanol não é comum entre os micro-organismos, sendo descrita para espécies de leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen* (CAHNDEL et al., 2006; MILLATI et al., 2005). A levedura comumente usada nos processos de fermentação alcoólica, a *Saccharomyces cerevisiae*, não metaboliza a xilose, que é um açúcar abundante na hemicelulose (CHANDEL et al., 2006; MILLATI et al., 2005).

Linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para a habilidade referida anteriormente também foram obtidas e pode ser uma alternativa viável para a biotransformação de material lignocelulósico em etanol. No entanto, ainda existem muitos estudos a serem feitos para chegar a um processo industrialmente viável (HAHN-HÄGERDAL et al, 2007).

1.3 Identificação e preservação das leveduras

A capacidade de fermentação de pentoses por leveduras é um dos objetivos deste trabalho. Paralelamente a ele, outro ponto importante que foi tratado neste mesmo trabalho é a identificação e a preservação dos micro-organismos realizadas de maneira apropriada. Isso é extremamente importante para as aplicações em processos biotecnológicos, pois sem uma boa identificação e preservação dos micro-organismos, os estudos posteriores tornam-se difíceis de serem feitos (SETTE et al., 2005; SETTE et al., 2006; BUGNI & IRELAND, 2004).

Os conhecimentos derivados desta pesquisa poderão contribuir no desenvolvimento biotecnológico de produção de biocombustíveis e açúcares economicamente importantes a partir de substratos lignocelulósicos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- i. A seleção de leveduras fermentadoras de pentoses, especificamente de D-xilose e L-arabinose. A seleção foi realizada a partir das estirpes existentes na coleção do Laboratório de Microbiologia (CEIS, Unesp - Rio Claro).
- ii. Identificação taxonômica das estirpes selecionadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Leveduras

Neste trabalho foram utilizadas 82 estirpes de leveduras presentes na coleção de leveduras do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) isoladas de fungos e vegetais. Todas estas estirpes foram coletadas na Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande, localizada no município de Pindamonhangaba, SP. As estirpes usadas foram:

- a) 26 de águas acumuladas nos pecíolos de sete bromélias (*Vriesea sp.*);
- b) 13 de flores da planta *Campanulacea siphocampylus* (família Camponulaceae);
- c) 4 de drosofilídeos ;
- d) 13 de frutos da planta *Hedychium coronarium Koenig* (lírio do brejo);
- e) 12 de cogumelos não identificados;
- f) 10 de exsudato de *Euterpe sp* (palmitero) e;
- g) 4 de exsudato de *Musa sp* (bananeira).

As leveduras foram cultivadas em meio *Sabouraud dextrose agar* que contém, em gramas/L:

Digerido enzimático de caseína.....	5
Digerido enzimático de tecido animal.....	5
Dextrose.....	40
Ágar.....	15
Água destilada.....	1000 mL
pH final: 5,6±0,2 em 25°C.	

3.2 Testes para análise de capacidade fermentativa de pentoses

3.2.1 Teste de assimilação

A capacidade assimilatória foi testada em meio YNB (Difco) contendo 0,5% (m/v) do açúcar a ser testado (D-xilose e L-arabinose). A incubação foi por 21 dias a 25°C.

3.2.2 Teste de fermentação

A capacidade fermentativa foi testada em meio líquido específico contendo 4% de açúcar (glicose, D-xilose, L-arabinose), utilizando tubos de Durhan (KURTZMAN & FELL, 1998) para observar a produção de gás. Os períodos de incubação foram estabelecidos em 14 dias à 25°C. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 1 atm/121°C.

Para verificarmos a capacidade fermentativa foi utilizado um meio contendo, em gramas/L:

Extrato de levedura.....	5
Peptona.....	7,5
Açúcar.....	40
Água destilada.....	1000mL

3.2.3 Teste de produção de etanol

Para verificarmos a produção de etanol, primeiramente as estirpes foram cultivadas em meio *Starvation* contendo 0,1% de glicose para diminuir as reservas das leveduras por 3 dias a 25°C. Posteriormente, as estirpes foram inoculadas na superfície do meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) contendo 2% do açúcar a ser testado (D-xilose ou L-arabinose). Este meio foi adicionado na placa pelo método “pour plate” e nele estava misturada uma levedura (*Candida silvae*, estirpe BR3-3BY), incapaz de crescer utilizando esses açúcares, mas capaz de crescer em etanol, caso este venha a ser produzido pelas estirpes em teste.

Assim, a produção de etanol é observada indiretamente pelo crescimento da *Candida silvae*, estirpe BR3-3BY, indicando que as leveduras em teste fermentam a pentose.

3.3 Análise dos resultados

Inicialmente as estirpes de leveduras existentes na coleção do Laboratório de Microbiologia (CEIS, Unesp – Rio Claro) foram testadas quanto a capacidade assimilatória em relação a D-xilose e L-arabinose.

As estirpes com resultado positivo foram em seguida analisadas quanto à capacidade fermentativa em meio líquido, utilizando tubos de Durhan (KURTZMAN & FELL, 1998) para observar a produção de gás. As leveduras que produziram gás em presença de glicose, independente de terem ou não produzido gás em presença de D-xilose e L-arabinose foram analisadas para verificar a produção de etanol pelo método da placa (GRABEK-LEJKO et al, 2006). Todos os testes, tanto de fermentação quanto de produção de álcool, foram realizados em duplicatas para cada estirpe de levedura.

A identificação das estirpes foi realizada por métodos polifásicos, englobando análises morfológicas, fisiológicas (BARNETT et al. 2000 e KURTZMAN & FELL, 1998) e seqüenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA. (KURTZMAN & ROBNETT, 1998; FELL et al., 2000 e SCORZETTI et al., 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oitenta e duas estirpes de leveduras foram analisadas quanto à capacidade assimilatória em relação à D-xilose e L-arabinose. Em seguida, as 44 estirpes com resultado positivo foram analisadas quanto à capacidade fermentativa em presença de glicose, D-xilose e L-arabinose. As estirpes que produziram gás em tubos de Durhan em presença de glicose foram submetidas ao bioensaio em placa, independente de terem ou não produzido gás em presença das pentoses, pois no caso desses dois açúcares nem sempre se observa produção de gás durante esse teste. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1 e os do teste de produção de etanol foram fotografados (Figura 1).

Tabela 1: Fermentação e produção de etanol (ensaios presuntivo) das estirpes com capacidade assimilatória de D-xilose e L-arabinose

Código da estirpe	Origem	Assimilação		Fermentação			Produção de etanol	
		D-Xyl	L-Arab	Glc	Xyl	Arab	Xyl	Arab
BN2-2AM	<i>Musa</i> sp.	+	+	+	-	+	-	-
BN2-2BASP	<i>Musa</i> sp.	+	-	+	+	-	-	-
BR5-2AY	Água de bromélia	+	-	+	-	-	-	-
BR6-2AI	Água de bromélia	+	-	+	+	-	+	-
BR6-2AY	Água de bromélia	+	-	+	+	-	+	-
BR6-3AASP	Água de bromélia	+	+	+	-	-	-	-
BR7-1AI	Água de bromélia	+	+	+	-	-	-	-
CG7-7AY	Cogumelo	+	-	+	-	-	-	-
CG8-8BY	Cogumelo	+	-	+	-	-	+	-
DC4M	<i>Drosófila</i>	+	-	+	-	-	-	-
PT1-1AASP	<i>Euterpe</i> sp.	+	+	+	-	-	-	-
PT1-1BASP	<i>Euterpe</i> sp.	+	-	+	+	-	+	-
PT1-1AI	<i>Euterpe</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-
PT1-1CASP	<i>Euterpe</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-
PT1-1CI	<i>Euterpe</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-
PT1-1M	<i>Euterpe</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-
PT2-2AY	<i>Euterpe</i> sp.	+	v	+	-	-	-	-

v: resultado variável.

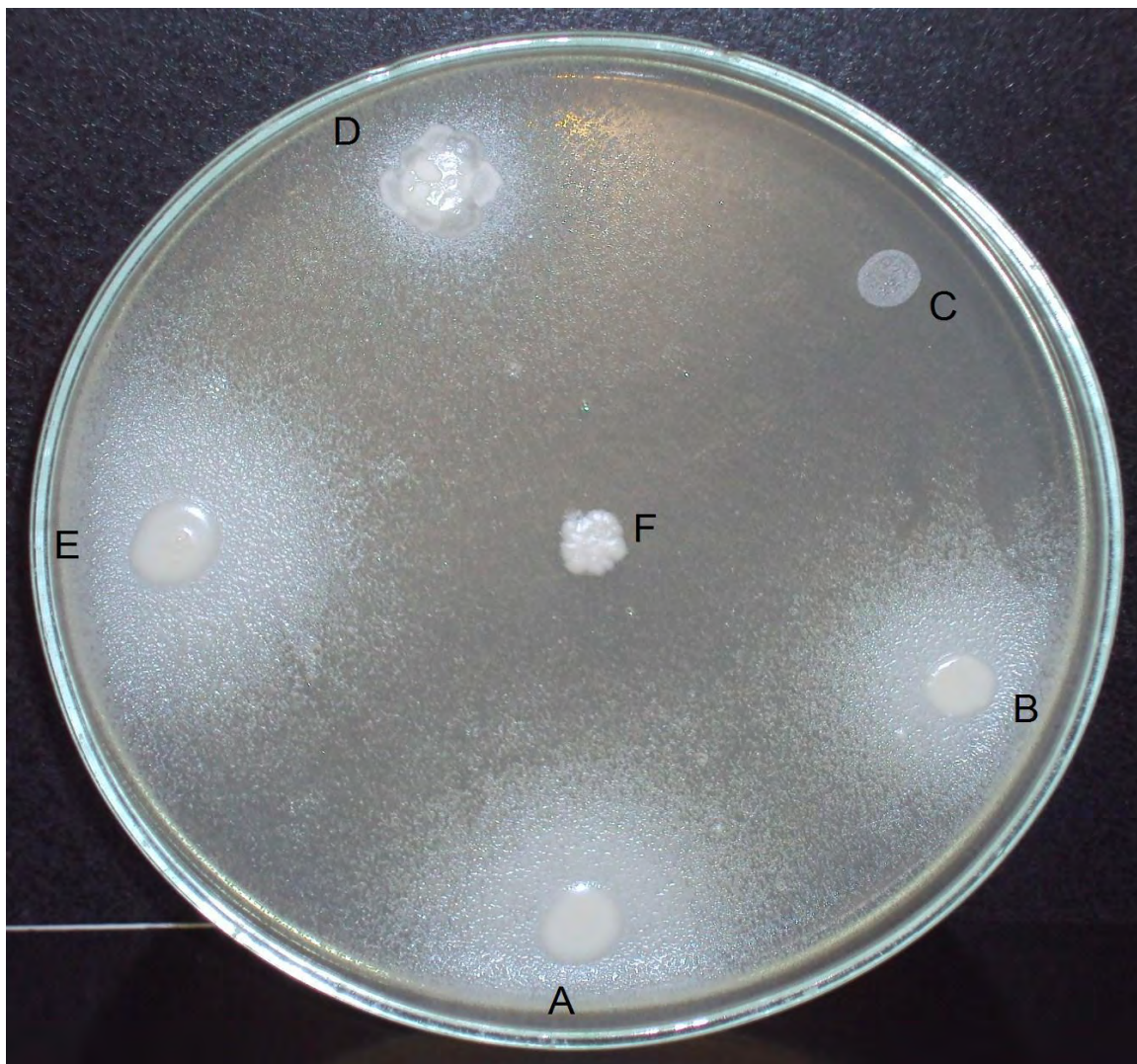


Figura 1: Teste de produção de etanol com D-xilose. As estirpes A, B, D e E são as leveduras fermentadoras deste açúcar. Já as estirpes C e F são controle negativo deste teste. Pode-se observar a produção de etanol indiretamente, através do crescimento da levedura “pourplate” (halos de leveduras circundando a estirpe em teste). A, B, C, D, E e F são BR6-6AY, BR6-6AI, CG7-7AY, PT1-1BASP, CG8-8BY e DC4M, respectivamente. Todas essas estirpes estão identificadas nas Tabelas 2 e 5 - Anexo 2.

A estirpe BN2-2AM, embora tenha produzido gás no teste de fermentação em presença de L-arabinose (mas não em presença de D-xilose), não mostrou sinais de produção de álcool, sugerindo que a presença de gás no tubo de Durhan no teste com L-arabinose pode ser um resultado falso positivo ou que, havendo fermentação, esta não leva à produção de etanol. Esta estirpe precisa ser melhor analisada, utilizando metodologia mais precisa (cromatografia) para verificar se pode ou não produzir etanol a partir de L-arabinose.

As estirpes PT1-1AASP e PT1-1BASP (Tabela 2) são idênticas e apresentam 99% de similaridade com *Candida shehatae* var. *shehatae*; no entanto os resultados dos testes destas estirpes são diferentes um do outro. Para a estirpe PT1-1AASP, obtiveram-se resultados negativos nos testes (não houve a produção de gás nos tubos de Durhan e não produziu etanol nos bioensaios na placa). Já a estirpe PT1-1BASP apresenta resultados positivos nos testes (produziu gás nos tubos de Durhan e houve a produção de etanol nas placas).

As estirpes BR6-2AI e BR6-2AY (Tabela 2), isoladas de água de tanque de bromélia também são idênticas e apresentaram 99% de similaridade com *Candida shehatae* var. *insectosa*. Os resultados dos testes, tanto de fermentação quanto de produção de álcool, confirmaram a capacidade fermentativa de D-xilose de ambas as estirpes. Já a estirpe CG8-8BY, isolada da parte superior de píleo de cogumelo crescendo na mata também apresentou 99% de similaridade com *Candida shehatae* var. *insectosa* (Tabela 2). Embora não tenha produzido gás, os resultados do teste de produção de álcool deram positivos, confirmando assim a capacidade fermentativa de D-xilose desta estirpe e a dificuldade de se detectar gás em tubos de Durhan quando essas pentoses são utilizadas como substrato fermentativo.

Tabela 2: Identificação das estirpes fermentadoras.

código	Origem	Identificação	nº acesso do <i>closest relative</i>	<i>query</i> <i>coverage</i>	max ident
BR6-2AI	Água de bromélia	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	FM200042.1	100%	99%
BR6-2AY	Água de bromélia	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	FM200042.1	99%	99%
CG8-8BY	Cogumelo	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	FM200042.1	98%	99%
PT1-1BASP	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Candida shehatae</i> var. <i>shehatae</i>	AJ606464.1	100%	99%

Na tabela 1 vemos que três estirpes que fermentaram D-xilose pelo teste com tubos de Durhan, a saber, BR6-2AI, BR6-2AY e PT1-1BASP, também produziram etanol nos ensaios em placa e, portanto são excelentes candidatas para continuação dos estudos, os quais deverão prosseguir através da quantificação da produção de etanol por HPLC. A estirpe CG8-8BY, embora não produzido gás detectável, também pode ser incluída nesse grupo bastante promissor. Também a estirpe BN2-2AM, a qual apresentou resultados inconsistentes, pois produziu gás em presença de L-arabinose, mas não foi possível detectar a produção de etanol nos testes em placa. Esta poderia ser melhor avaliada, pois foi a única que aparentemente pode fermentar L-arabinose.

Todas as estirpes fermentadoras de D-xilose obtidas neste trabalho pertencem ao gênero *Candida* cuja capacidade fermentativa de D-xilose é citada nos trabalhos de Chandel et al. (2006) e de Millati et al. (2005). Segundo a literatura consultada, a espécie *Candida shehatae*, com suas variedades “shehatae” e “insectosa” as quais diferem fisiologicamente apenas na liquefação da gelatina (a variedade “insectosa” apresenta liquefação fraca de gelatina), é uma das raras espécies fermentadoras de D-xilose existente na natureza (PREEZ et al., 1986; KURTZMAN et al., 1998; CHANDEL et al., 2006).

Nesta nossa busca, encontramos quatro estirpes que podem ser melhor estudadas quanto a produção de etanol a partir de D-xilose, especialmente quanto ao aspecto quantitativo, o que deverá ser efetuado em seguida.

Todas as estirpes estudadas neste trabalho foram coletadas na Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande (Pindamonhangaba, SP). Esta propriedade ainda contém pequenos fragmentos de floresta Atlântica. O fato de termos encontrado essas estirpes junto a um pequeno número inicial de isolados demonstra o potencial que nossas matas possuem para isolamento de espécies e variedades microbianas que podem ser aproveitadas para desenvolvimento de novas tecnologias de produção de biocombustíveis.

5 CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados neste trabalho, conclui-se que as estirpes BR6-2AI, BR6-2AY, CG8-8BY e PT1-1BASP fermentam D-xilose com produção de etanol. Portanto, estas estirpes devem ser utilizadas em estudos posteriores para analisar o potencial que apresentam para produção de biocombustíveis ou eventualmente em outros processos industriais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3. Ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2000. 1139 p.

BECKER, J.; BOLES, E. A Modified *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Consumes L-Arabinose and Produces Ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 69, No. 7, p. 4144–4150, 2003.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports Articles**, vol. 21, p.143-163, 2004.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. Ed. Porto Alegre: Ed. ArtMed. 2000. 751p.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, vol.98, p. 1947-1950, 2006.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., **Microbiologia Ambiental**, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, p. 269-292, 1997.

FARRELL, AE et. al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, Vol. 311, p. 506–508, 2006.

FELL, J. W et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Vol. 50, p. 1351-1371, 2000.

GRABEK-LEJKO, D. et al. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Vol. 33, p. 934-940, 2006.

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

GOMEZ, R. J. H. C. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985. Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=675>. Acesso em 06 out. 2010.

GONG, C. S.; MCCracken L. D.; TSAO, G. T. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermentating yeast mutant, *Candida sp* XF 217. **Biotechnology Letters**, vol. 3, n. 5, p. 245-250, 1981.

HAHN-HÄGERDAL et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, Vol. 74, p.937-953, 2007.

HESPELL, R. B. Extraction and characterization of hemicellulose from the corn fiber produced by corn wet-milling processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 46, p. 2615–2619, 1998.

KARAM, J.; NICELL, J. A. Potential applications of enzymes waste treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Vol. 69, p. 141-153, 1997.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts – a taxonomic study**. 4. Ed. Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055 p.

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**, Vol. 73, p. 331-371, 1998.

LICKFELDT, E.; MEYER, W., BORNER, T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprint. **Journal of Basic Microbiology**, Vol. 33, p. 413-426, 1993.

MCMILLAN, J. D.; BOYNTON, B. L. Arabinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol.45–46, p. 569–584, 1994.

MILLATI, R; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 36, p. 294-300, 2005.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, Vol. 74, p. 69-80, 2000.

PREEZ, J. C. du; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Vol. 23, p. 228-233, 1986.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, Vol. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RIDIEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 147, p. 239-243, 1997.

ROSENBERG, S. L. Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. **Enzyme Microbiology Technology**, Vol. 2, p. 185–193, 1980.

SAMPAIO, J. P. et al. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Vol. 51, p. 687-697. 2001.

SCORZETTI, G. et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large sub-unit D1D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Vol. 2, p. 495-517, 2002.

SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Vol. 87, p. 81-89, 2005.

SETTE, L. D. et al. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Vol. 22, p. 1185-1195, 2006.

TOLAN, J. S.; FINN, R. K. Fermentation of D-xylose and L-arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 53, n. 9, p. 2033-2038, 1987.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vol. 52, n. 3, p. 305-317, 1988.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1: Tabela de estirpes de leveduras utilizadas neste trabalho

Tabela 3: Tabela de estirpes de leveduras utilizadas neste trabalho.

Código da estirpe	Origem	Código da estirpe	Origem
BR1-2AM	Àgua de bromélia	BN2-2AASP	<i>Musa</i> sp.
BR1-2BM	Àgua de bromélia	BN2-2AM	<i>Musa</i> sp.
BR1-2BM-F	Àgua de bromélia	BN2-2BASP	<i>Musa</i> sp.
BR1-2I	Àgua de bromélia	BN2Y	<i>Musa</i> sp.
BR2-1Y	Àgua de bromélia	CG1ASP	Cogumelo
BR2-2Y	Àgua de bromélia	CG2-2BASP-a	Cogumelo
BR2-4AI	Àgua de bromélia	CG2-2BASP-b	Cogumelo
BR2-4Y	Àgua de bromélia	CG2-2BASP-c	Cogumelo
BR3-2AASP	Àgua de bromélia	CG2-2BY-a	Cogumelo
BR3-2I	Àgua de bromélia	CG2-2BY-b	Cogumelo
BR3-3AY	Àgua de bromélia	CG3-3AM	Cogumelo
BR3-3BY	Àgua de bromélia	CG3-3BM	Cogumelo
BR3-3CY	Àgua de bromélia	CG5-5AY	Cogumelo
BR3-3CASP	Àgua de bromélia	CG5-5BY	Cogumelo
BR3-4AY	Àgua de bromélia	CG7-7AY	Cogumelo
BR5-1AASP	Àgua de bromélia	CG8-8BY	Cogumelo
BR5-2AY	Àgua de bromélia	DC1M	Drosófila
BR5-3I	Àgua de bromélia	DC4M	Drosófila
BR5-4M	Àgua de bromélia	DC7M	Drosófila
BR6-2AI	Àgua de bromélia	DCAY	Drosófila
BR6-2AY	Àgua de bromélia	FB1-1AASP-a	<i>Campanulacea siphocampylus</i>
BR6-3AASP	Àgua de bromélia	FB1-1AASP-b	<i>Campanulacea siphocampylus</i>
BR6-4BASP	Àgua de bromélia	FB1-1AY-a	<i>Campanulacea siphocampylus</i>
BR7-1AI	Àgua de bromélia	FB1-1AY-b	<i>Campanulacea siphocampylus</i>
BR7-2I	Àgua de bromélia	FB1-1BY-a	<i>Campanulacea siphocampylus</i>
BR7-3BM	Àgua de bromélia	FB1-1BY-b	<i>Campanulacea siphocampylus</i>

Continuação da Tabela 3 – estirpes de leveduras utilizadas neste trabalho.

Código da estirpe	Origem	Código da estirpe	Origem
FB1-1CASP	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	H3M	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig
FB1-1DASP	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	H8-8BY	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig
FB2-2AM-a	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	H10-10AY	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig
FB2-2BM	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	H10-10BY	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig
FB2-2CM	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	H12-12BM	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig
FB2-2AY	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	PT1-1AASP	<i>Euterpe</i> sp.
FB2-2BY	<i>Campanulacea siphocampylus</i>	PT1-1BASP	<i>Euterpe</i> sp.
FH9T	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT1-1AI	<i>Euterpe</i> sp.
FH11T	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT1-1BI	<i>Euterpe</i> sp.
H1-1AY	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT1-1CASP	<i>Euterpe</i> sp.
H2-2AM	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT1-1CI	<i>Euterpe</i> sp.
H2-2AASP	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT1-1M	<i>Euterpe</i> sp.
H2-2BASP	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT1-1Y	<i>Euterpe</i> sp.
H3-3AASP	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT2-2AY	<i>Euterpe</i> sp.
H3-3CASP	<i>Hedychium coronarium</i> Koenig	PT2-2BY	<i>Euterpe</i> sp.

7.2 Anexo 2: Das 44 estirpes que assimilaram D-xilose, as que constam na tabela 5 fermentaram apenas a glicose.

Tabela 4: Identificação das estirpes.

código	Origem	Identificação	nº acesso do closest relative	query coverage	max ident
BN2-2AM	<i>Musa</i> sp.	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<u>EU441895.1</u>	99%	99%
BN2-2BASP	<i>Musa</i> sp.	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<u>EU441895.2</u>	99%	99%
BR5-2AY	Água de bromélia	<i>Candida oleophila</i>	<u>FN868264.1</u>	100%	100%
BR6-3AASP	Água de bromélia	não identificada	-	-	-
BR7-1AI	Água de bromélia	não identificada	-	-	-
CG7-7AY	Cogumelo	não identificada	-	-	-
DC4M	<i>Drosófila</i>	<i>Candida chickasaworum</i>	<u>AY309830.1</u>	99%	99%
PT1-1AASP	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Candida shehatae</i> var. <i>shehatae</i>	<u>AJ606464.1</u>	100%	99%
PT1-1AI	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Pichia spartinae</i>	<u>GU373761.1</u>	98%	96%
PT1-1CASP	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Pichia spartinae</i>	<u>FJ914895.1</u>	100%	97%
PT1-1CI	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Pichia spartinae</i>	<u>FJ914895.1</u>	100%	98%
PT1-1M	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Candida picinguabensis</i>	<u>DQ377638.1</u>	99%	99%
PT2-2AY	<i>Euterpe</i> sp.	<i>Sporopachydermia</i> sp.	<u>AF313365.1</u>	97%	98%

7.3 Anexo 3: Procedência das drogas utilizadas no trabalho

Tabela 5: Procedência das drogas utilizadas no trabalho

Droga	Procedência	Código
Ágar	Acumedia	7178A
D-xilose	Sigma	X-1500
Extrato de levedura	Difco	151517
Glicose	Synth	G1008.01.AH
L-arabinose	Sigma	A3256
Peptona	Oxoid	LP037
Sabouraud dextrose agar	Acumedia	7150A
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Sigma	Y-1250

Liu Yu Ping

Aluna

Prof^o Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Orientador