



FERNANDA PAULA CARVALHO

**ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
XILANOLÍTICAS DE LEVEDURAS ISOLADAS
DO CERRADO MINEIRO**

LAVRAS – MG

2013

FERNANDA PAULA CARVALHO

**ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS DE LEVEDURAS
ISOLADAS DO CERRADO MINEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadores

Dr. Disney Ribeiro Dias

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Carvalho, Fernanda Paula.

Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro / Fernanda Paula Carvalho. – Lavras : UFLA, 2013.
118 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Solos de cerrado. 2. Biodiversidade. 3. Biotecnologia. 4.
Resíduos agroindustriais. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 660.634

FERNANDA PAULA CARVALHO

**ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS DE LEVEDURAS
ISOLADAS DO CERRADO MINEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de dezembro de 2012.

Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dra. Kátia Regina F. Schwan-Estrada	UEM
Msc. Sabrina Carvalho Bastos	UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

Dr. Disney Ribeiro Dias
Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista
Coorientadores

LAVRAS – MG

2012

A Deus.

Ao meu marido, William e filha, Giovanna.

Aos meus pais, Dalva e Tomé.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Disney e Dra. Cristina, pelo apoio e orientação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais, irmão Alexandre e Sabrina, pelo carinho, incentivo e, principalmente, pelo amor incondicional.

Ao meu amor, amigo e companheiro, William, pelo incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos.

A minha filha, Giovanna, pela compreensão durante a minha ausência.

Aos colegas de laboratório, Alenir, Suzana, Karla e Kelly, pela amizade e companhia. Em especial, à grande amiga Angélica, pela amizade, carinho e presença constante em todas as etapas deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia (DBI), pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

Visando o conhecimento da microbiota do cerrado mineiro este trabalho objetivou: i) identificar a diversidade de leveduras do solo de diferentes regiões do Cerrado (savana brasileira); ii) selecionar leveduras produtoras de celulases e xilanases e, iii) avaliar a produção destas enzimas em diferentes resíduos agroindustriais. Um total de 307 leveduras foi isolado de três municípios do Estado de Minas Gerais (Arcos, Passos e Luminárias) nas estações seca e chuvosa. Dez gêneros de leveduras (*Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Lindnera*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulaspota* e *Trichosporon*) e 23 espécies diferentes foram identificadas por sequenciamento do rDNA. Os solos foram caracterizados quimicamente e não houve diferença significativa nas concentrações de magnésio, fósforo e matéria orgânica nos solos, entre as áreas estudadas. A área de Arcos continha grandes quantidades de alumínio durante a estação chuvosa e hidrogênio e alumínio nas estações chuvosa e seca. A população de leveduras identificada parece não ter sido afetada pelos níveis elevados de alumínio no solo. Foi utilizado o sistema API ZYM[®] (BioMérieux, France) e teste semiquantitativo em placa para caracterizar os perfis de atividade enzimática extracelular das leveduras isoladas. Os resultados do teste API ZYM[®] mostraram diferenças nos perfis de enzimas extracelulares entre as espécies de leveduras avaliadas. Alguns isolados pertencentes à mesma espécie apresentaram perfis enzimáticos distintos. Dentre os isolados avaliados para produção de enzimas no teste semiquantitativo, 17 (5.5 %) foram positivos para celulase e xilanase e 6 (1.9%) foram positivos somente para xilanase. Destes isolados positivos, selecionou-se *Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519), *C. flavescens* (UFLA CES 735), *C. humicola* (UFLA CES 683) e *Candida neerlandica* (UFLA CES 707) para cultivo em substratos lignocelulósicos. Bagaço de cana, palha de cana, sabugo de milho, palha de milho, farelo de trigo e casca de cacau foram os resíduos lignocelulósicos utilizados e comparados em relação a substratos puros (CMC e xilana beech wood) para a produção de enzimas do complexo celulolítico (FPase, endoglucanase, β -glicosidase) e xilanolítico (xilanase e β -xilosidase). A levedura *Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519) foi a espécie que se destacou na produção de β -glicosidase com a melhor resposta em atividade específica constatada nos resíduos bagaço de cana (0,983 UI μg proteína⁻¹ mL⁻¹) e palha de milho (0,919 UI μg proteína⁻¹ mL⁻¹). A maior produção de xilanase (0,494 UI μg proteína⁻¹ mL⁻¹) foi observada em bagaço de cana. Este estudo foi o primeiro a descrever leveduras isoladas do ecossistema do Cerrado brasileiro e demonstrar sua capacidade de produzir enzimas em resíduos agroindustriais com potencial interesse industrial.

Palavras-chave: Enzimas. Biodiversidade de leveduras. Cerrado. Solos.

GENERAL ABSTRACT

Pointing to the expertise in the Mineiro Cerrado microbiota, the aim of this study was to : i) identify the diversity of soil yeasts from different regions of the Cerrado (Brazilian Savannah), ii) screen cellulases and xylanases producer yeasts and, iii) evaluate the production of these enzymes in different agro-industrial residues. A total of 307 yeast strains were isolated from three municipalities in Minas Gerais State (Arcos, Passos and Luminárias) in rainy and dry seasons. Ten yeast genera (*Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Lindnera*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulaspota* and *Trichosporon*) and 23 distinct species in both seasons were identified by rDNA sequencing. The soils were chemically characterized and there were no significant differences in the concentrations of phosphorus, magnesium and organic matter in the soils among the studied areas. The Arcos area contained large amounts of aluminum during the rainy season and both hydrogen and aluminum in the rainy and dry seasons. The yeast populations that were identified seemed to be unaffected by the high levels of aluminum in the soil. The API ZYM[®] (BioMérieux, France) system and semiquantitative test in plates were used to characterize the extracellular enzymatic activity profiles of the yeast isolates. The results of the API ZYM[®] test showed differences in the extracellular enzyme profiles among the yeast species evaluated. Some isolates that belong to the same species showed distinct enzymatic profiles. Among the isolates analyzed for enzyme production in the semiquantitative test, 17 (5.5%) were positive for cellulase and xylanase and 6 (1.9%) were positive only for xylanase. From these positive isolates, *Cryptococcus laurentii* (CES UFLA 519), *C. flavescens* (CES UFLA 735), *C. humicola* (CES UFLA 683) and *Candida neerlandica* (CES UFLA 707) were selected for cultivation on lignocellulosic substrates. Sugarcane bagasse, sugarcane straw, corn cobs, corn straw, wheat bran and cocoa shell were the lignocellulosic residues used and compared in relation to pure substrates (beech wood xylan and CMC) for the production of cellulolytic (FPase, endoglucanase, β -glucosidase) and xylanolytic (xylanase and β -xylosidase) enzyme complex. The *Cryptococcus laurentii* yeast (CES UFLA 519) was the species that excelled in the production of β -glucosidase with the best response in specific activity observed in the waste bagasse (0.983 IU mg protein⁻¹ mL⁻¹) and corn straw (0.919 IU ml⁻¹ mg protein⁻¹). The higher production of xylanase (0.494 IU mg protein⁻¹ mL⁻¹) using residue was detected for that species in sugarcane bagasse. Our study is the first to describe yeasts isolated from the Brazilian Cerrado ecosystem and demonstrates their ability to produce enzymes that may be of potential industrial interest.

Keywords: Enzymes. Yeast biodiversity. Cerrado. Soils.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	Cerrado	12
3.2	Leveduras no solo	13
3.3	Materiais lignocelulósicos	14
3.3.1	Composição da parede celular vegetal	17
3.4	Mecanismos de hidrólise enzimática	23
3.4.1	Degradação enzimática da celulose	23
3.4.2	Degradação enzimática da hemicelulose	24
3.5	Microrganismos produtores de celulasas e xilanase	25
3.6	Modelo de indução e regulação da biossíntese de enzimas	27
3.7	Processos microbianos para produção de enzimas	30
3.8	Aplicações biotecnológicas	32
	REFERÊNCIAS	35
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	45
	ARTIGO 1 A study of the enzymatic activities of yeasts from Brazilian Cerrado soils	45
	ARTIGO 2 Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por leveduras utilizando resíduos agrícolas como substrato indutor	79

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país em área, superado apenas pela Floresta Amazônica, ocupando aproximadamente 23,92% do território nacional. A diversidade dos microrganismos presentes neste solo é pouco conhecida, sendo um ambiente potencial para a bioprospeção de novas espécies com aplicação biotecnológicas. Além disso, a presença destes microrganismos na natureza tem papel significativo na biotransformação de substâncias orgânicas do solo. O estudo da diversidade de microrganismos presentes nestes ambientes é de fundamental importância para a caracterização das relações entre os diferentes grupos e espécies de microrganismos e para avaliar a sua influência na ciclagem de nutrientes dos solos. Nestes solos existe grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e leveduras, e poucos estudos têm sido realizados na prospecção de leveduras nativas deste ambiente.

O desenvolvimento tecnológico vem crescendo gradativamente nos últimos anos. Neste contexto, os processos biotecnológicos industriais têm se destacado, visto o grande número de metabólitos de interesse industrial que pode ser gerado, a partir desses processos. Um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial, em ascensão, é a obtenção de enzimas, as quais são produzidas, principalmente, por microrganismos, devido às dificuldades na extração destas enzimas de tecidos animais e vegetais.

A produção industrial de enzimas é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para cultivo dos microrganismos. Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de baixo custo e facilmente disponíveis deve ser explorada, além de avanços tecnológicos e da busca por

novos microrganismos. No Brasil, devido às suas condições climáticas, há disponibilidade de vários resíduos gerados na agricultura ou na agroindústria que podem ser utilizados nos processos para a produção de enzimas. Estes resíduos incluem palhas, cascas, caules, hastes, bagaços e farelos, além de madeiras decíduas e coníferas, café, cacau, algodão, amendoim, juta e resíduos da indústria de polpa e papel. De modo geral, estes resíduos apresentam elevado potencial de energia, visto que contêm até 70% de carboidratos, como celulose e hemicelulose em sua composição.

A busca por novas espécies de leveduras nativas do solo é importante para a caracterização e a preservação de espécies, principalmente aquelas com potencial para aplicação biotecnológica. Em adição, a utilização de substratos alternativos e de baixo custo é promissora para a produção industrial de enzimas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar leveduras do solo do cerrado nativo de Minas Gerais e avaliar o potencial celulolítico e xilanolítico destes isolados utilizando diferentes resíduos agroindustriais.

2.2 Objetivos específicos

- a) isolar leveduras de solo da região do cerrado de Minas Gerais, durante a estação seca e a chuvosa;
- b) testar os isolados de levedura quanto à produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico.
- c) pré-selecionar os melhores isolados produtores destas enzimas, utilizando o índice enzimático;
- d) identificar as espécies produtoras de enzimas por meio do sequenciamento da região ITS;
- e) avaliar a produção de enzimas em diferentes resíduos lignocelulósicos e comparar com substratos puros.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cerrado

O Brasil tem a maior diversidade biológica do planeta (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008). Os biomas mais importantes são a Amazônia (4.196.943 Km²), o Cerrado (2.036.448 km²) e a Mata Atlântica (1.110.182 km²). No entanto, a região semiárida (caatinga), no nordeste (844.453 km²); o pampa, no sul (176.496 km²) e as áreas inundadas sazonalmente, na região denominada “pantanal” (150.355 km²) cobrem áreas significativas do país (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008).

Cerrado é o nome regional dado às savanas brasileiras que se localizam, basicamente, no planalto central do Brasil. É o segundo maior bioma do país em área, superado apenas pela Floresta Amazônica, ocupando cerca de 23,92% do território brasileiro (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2010).

A grande variabilidade de habitats nos diversos tipos de cerrado, que vão desde o cerradão com árvores altas, passando pelo cerrado com árvores baixas e esparsas, até o campo cerrado, com progressiva redução da densidade arbórea, abrange muitas comunidades de mamíferos e de invertebrados, além de uma importante diversidade de microrganismos associados às plantas e aos solos da região (RATTER et al., 2000). Estes microrganismos são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica (plantas, animais e microrganismos mortos), a ciclagem de nutrientes, o controle biológico de doenças e pragas, a purificação da água e a decomposição de resíduos orgânicos e tóxicos, entre muitos outros (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008). Um grama de solo pode conter entre 10⁶-10⁸ células cultiváveis de bactérias, 10⁴-10⁶ esporos de actinobactérias,

$10\text{-}10^6$ células cultiváveis de leveduras e $10^2\text{-}10^4$ esporos de fungos (CRUEGER; CRUEGER, 1993; SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003).

As bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bacillus*, as actinobactérias, solubilizadoras de fósforo e os fungos filamentosos pertencentes às divisões Zigomycota, Basidiomycota e Ascomycota também são encontrados no solo (PEREZ; RAMOS; MCMANUS, 2004). Entre as leveduras mais comumente encontradas no solo podem-se citar as pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Schwanniomyces*, *Hansenula* e *Cryptococcus*, entre outras (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

O estudo da biologia e da biodiversidade de leveduras é importante para a caracterização e a preservação de espécies, principalmente aquelas com potencial para aplicação biotecnológica (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008). No entanto, as taxas crescentes de desflorestamento, degradação e perda da camada superficial do solo, que é muito maior que a taxa de formação do solo, causando perda de habitats, constituem a ameaça principal à biodiversidade do solo (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008).

3.2 Leveduras no solo

Leveduras ocorrem em uma ampla faixa de tipos de solo em áreas geográficas situadas em diferentes latitudes (GARETH JONES; KA-LAI, 2012). Combinações de temperatura, umidade, composição química, localização geográfica e outros fatores influenciam a diversidade de leveduras encontradas nesses ambientes (VISHNIAC, 2006).

Muitas leveduras têm sido isoladas do solo, como *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Schwanniomyces* e *Schizobolusporium*. Outros gêneros que também já foram isolados de solos do Brasil e do mundo incluem *Debaryomyces*,

Hansenula, Candida, Brettanomyces, Rhodotorula, Cryptococcus, Trichosporon e Torulopsis (BRESOLIN et al., 2010).

Leveduras presentes no solo contribuem para o processo de mineralização, crescimento vegetal, manutenção da estrutura do solo, transformações de nutrientes, controle de fitopatógenos e são úteis no processo de biorremediação (BOTHÁ, 2011). Em adição, leveduras são importantes fontes de biomoléculas, como as enzimas, que são frequentemente utilizadas em aplicações industriais. Atualmente, enzimas de fontes microbianas são utilizadas em indústria de alimentos, têxteis e farmacêutica, na fabricação de detergentes, além de biologia molecular e de biocombustíveis (ROMO-SÁNCHEZ et al., 2010).

É importante ressaltar a necessidade de se isolar e caracterizar leveduras de habitats diferentes para aumentar os esforços de preservação das espécies, além de verificar o potencial biotecnológico que esses microrganismos podem apresentar (ROMO-SÁNCHEZ et al., 2010).

3.3 Materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial de uso como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (LATIF; RAJOCA, 2001).

Atualmente, os resíduos agroindustriais vêm aumentando com o processo de industrialização. A utilização desses resíduos em bioprocessos como substrato alternativo pode solucionar problemas ambientais causados por sua disposição incorreta, além de agregar valor a eles (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

A biomassa lignocelulósica inclui resíduos agrícolas, como palhas, cascas, caules, hastes, bagaços e farelos, os quais podem ser originados de cereais (arroz, trigo, milho, sorgo), legumes (tomate, feijão, soja), frutas (banana, manga, coco), além de madeiras decíduas e coníferas, café, cacau, algodão, amendoim, juta, azeitona e resíduos da indústria de polpa e papel (SAHA, 2003; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; VANDAMME, 2009).

Os principais constituintes destes materiais são celulose e hemicelulose, que podem ser convertidos a diversos produtos com maior valor agregado, como etanol, proteína de organismos unicelulares, cultivo de cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos, entre outros (VANDAMME, 2009). Dentre estes, as enzimas de origem microbiana vêm ganhando destaque, haja vista sua ampla aplicação na indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e conversão da biomassa lignocelulósica. A produção industrial de enzimas microbianas é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para o cultivo dos microrganismos. Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de baixo custo e facilmente disponíveis deve ser explorada, além de avanços tecnológicos e da busca por novos microrganismos (TENGERDY; SZAKACS, 2003; POLIZELLI et al., 2005; SUKUMARAN, 2009).

Os resíduos agroindustriais consistem de diversos resíduos gerados na agricultura e na indústria de alimentos. A escolha desses materiais lignocelulósicos para utilização em bioprocessos deve ser baseada na abundância e no custo, além de suas características físico-químicas (DELABONA et al., 2012). Na Tabela 1 apresenta-se a composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.

Tabela 1 Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

	Composição (% peso seco)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Fibra de milho	15	35	8
Sabugo de milho	45	35	15
Palha de milho	40	25	17
Palha de arroz	35	25	12
Palha de trigo	30	50	20
Bagaço de cana-de-açúcar	40	24	25

Fonte: SAHA, (2003)

No Brasil, a cana-de-açúcar constitui, sob o aspecto econômico e social, uma das principais culturas do país e vem sendo utilizada, desde o início da colonização do país, para a produção de cachaça e de açúcar, e na alimentação animal. A partir da década de 1980, ela passou a ser empregada também na produção de álcool carburante (SILVEIRA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2002).

Os principais resíduos gerados do processamento da cana são bagaço e palha de cana-de-açúcar. Para cada tonelada de cana produzida estima-se a produção de 280 kg de bagaço (CERQUEIRA; RODRIGUES; MEIIRELES, 2007). A indústria da cana-de-açúcar gera, anualmente, aproximadamente 186 milhões de toneladas de bagaço no Brasil (SOCCOL et al., 2010). O bagaço de cana é constituído por celulose, hemicelulose e lignina, na proporção, aproximadamente, de 30% a 40% de celulose (m/m em base seca), de 25% a 35% de hemicelulose, lignina e traços de minerais e outros compostos (SUN et al., 2004). Devido ao baixo valor de nutrientes encontrados no bagaço de cana, este resíduo tem sido suplementado com farelo de soja e farelo de trigo, que são boas fontes de N (SANCHEZ; CARDONA, 2008).

Outra cultura geradora de resíduos no país é a cultura do milho. A produção de milho no Brasil atingiu 69 milhões de toneladas, na safra 2011/12 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2012). Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são formados pelo

sabugo. Assim como o sabugo, a palha também é um resíduo excedente e que, na maioria das vezes, permanece no campo após a colheita (SULTANA et al., 2007).

Dentre os diversos resíduos utilizados na produção de enzimas, o farelo de trigo tem se mostrado promissor (BANSAL; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2012; DELABONA et al., 2012; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Farelo de trigo é um substrato complexo rico em proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gorduras (6%) e vitamina B. Pelo fato de ser uma boa fonte de nitrogênio, tem sido utilizada em misturas com o bagaço de cana-de-açúcar para a produção de celulase. A composição deste substrato, provavelmente, favorece o crescimento e a produção de enzimas pelos microrganismos (SANCHEZ; CARDONA, 2008).

Os substratos que fornecem todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo devem ser considerados como um substrato ideal. Entretanto, alguns nutrientes podem estar em concentrações subótimas ou não estar presente nos substratos. Em alguns casos, é necessário suplementá-los com mais nutrientes (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

3.3.1 Composição da parede celular vegetal

A parede celular dos vegetais é composta, principalmente, por celulose, hemicelulose, lignina e, dependendo da matéria-prima, pectina.

As fibras de celulose estão incorporadas na matriz amorfa de lignina e hemiceluloses. Estes três tipos de polímeros se ligam fortemente por forças não covalentes, assim como pelo cruzamento de ligações covalentes, formando um material composto que é conhecido como lignocelulose (Figura 1). A quantidade de cada um destes polímeros varia com a espécie e a idade da planta e entre partes da mesma planta (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005; GLAZER; NIKAIDO, 2007).

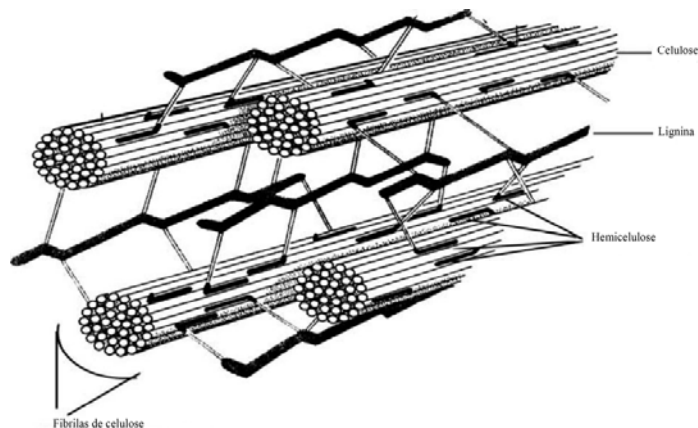


Figura 1 Arranjo de parede celular vegetal (YU; LOU; WU, 2008)

Celulose é o constituinte principal dos vegetais, consistindo na matéria orgânica mais abundante da natureza. É um polímero linear que contém até 15.000 unidades de D-glicose unidas por meio de ligações β -1,4-glicosídicas. A unidade básica de repetição é a celobiose. Estas cadeias estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, são rígidas e em forma de fita. O estabelecimento de pontes de hidrogênio intercadeias resulta na formação de fibrilas, uma estrutura altamente ordenada que se associa formando as fibras de celulose (Figura 2) (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). As fibrilas de celulose têm regiões de alta ordenação, as regiões cristalinas, nas quais as cadeias de glicana estão ligadas em paralelos e regiões de menor grau de ordenação, as regiões amorfas. A região cristalina torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática, à tração e aos agentes químicos. A região amorfa, mais facilmente hidrolisável, pode ser facilmente hidratada e é mais acessível às enzimas (LYND et al., 2002). Esta conformação estrutural, bem como a estreita associação com lignina, hemicelulose, proteínas e minerais, torna a celulose altamente resistente à hidrólise (MARIS et al., 2006).

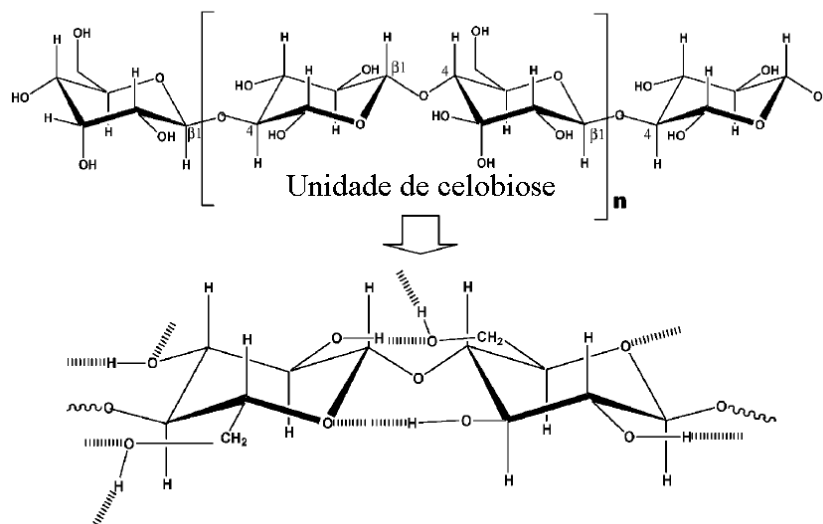


Figura 2 Estrutura química da celulose com ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (YU; LOU; WU, 2008)

Hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza e representa de 20% a 35% da biomassa lignocelulósica (SAHA, 2003). A composição da hemicelulose é fortemente dependente do tipo da planta. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (SAHA, 2003; MARIS et al., 2006). As hemiceluloses formam uma classe heterogênea de polímeros e que podem conter pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e α -D-galactose) e ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e ácidos α -D-galacturônico). Estes resíduos são diversamente modificados por acetilação ou metilação. Outros açúcares, como α -L-ramnose e α -L-fucose, também podem estar presentes em pequenas quantidades. Homopolímeros de xilose, denominados homoxilanas, só ocorrem em algas (algas vermelhas e verdes). As hemiceluloses mais relevantes são xilanas e glicomananas, sendo as xilanas as mais abundantes. Xilanas são os componentes

principais da hemicelulose da parede celular secundária, que constituem cerca de 20% a 30% da biomassa de madeira e de plantas herbáceas (POLIZELI et al., 2005; PENG et al., 2009; GÍRIO et al., 2010) (Figura 3).

A estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas e é mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Apresenta menor grau de polimerização (< 200 açúcares residuais que a celulose) (BOM; GIRIO; PEREIRA JR., 2008; GLAZER; NIKAIDO, 2007).

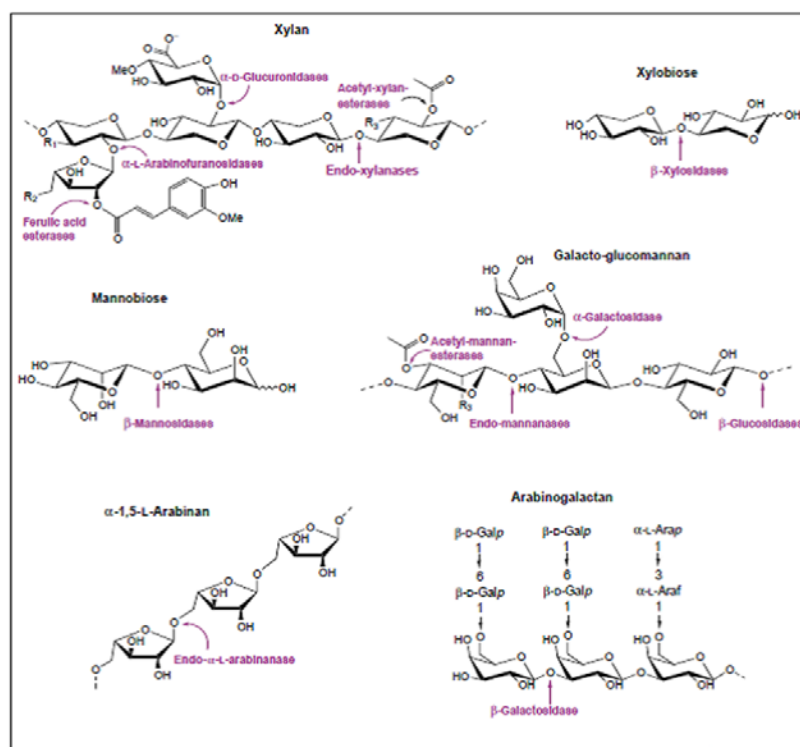


Figura 3 Componentes estruturais básicos encontrados na hemicelulose e as hemicelulases responsáveis pela sua degradação (SHALLOM; SHOHAM, 2003)

Lignina constitui de 10% a 20% do peso seco da biomassa, correspondendo à fração não polissacarídica mais abundante presente nos materiais lignocelulósicos. Juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular. Apresenta estrutura não uniforme, altamente complexa, com massa molecular extremamente elevada (PÉREZ et al., 2002; BOM; GIRIO; PEREIRA JR., 2008). Esse polímero natural é composto de unidades de fenil propano, que se repetem em ligações diferentes, sendo interligadas por ligações covalentes simples entre carbonos (C-C) e do tipo éter (C-O-C) (Figura 4) (BOER et al., 2006). A lignina é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (PÉREZ et al., 2002; BOM; GIRIO; PEREIRA JR., 2008).

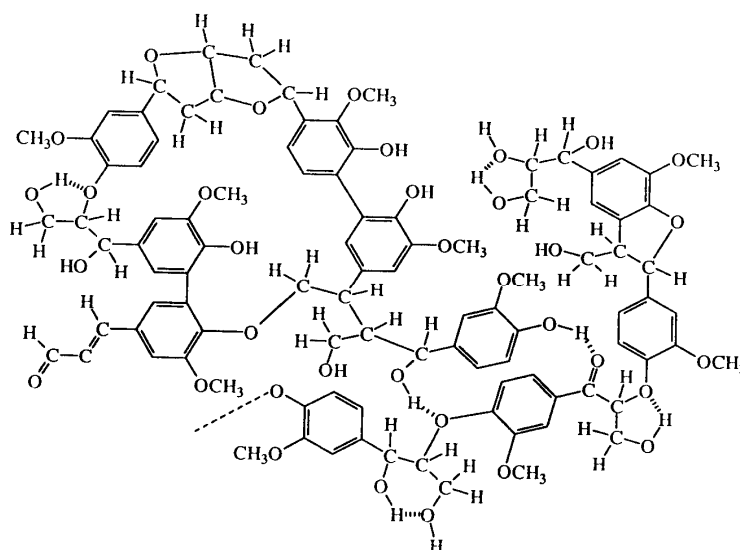


Figura 4 Estrutura da lignina
Fonte: Boer et al. (2005)

Em geral, plantas herbáceas, como gramíneas, têm menor teor de lignina, enquanto as madeiras têm maior teor, como as madeiras de coníferas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Embora seja menos proeminente do que a celulose e a hemicelulose na biomassa, alguns resíduos agrícolas, como casca de cítricos, são extremamente ricos em pectina (MARIS et al., 2006).

Pectinas são polímeros complexos e heterogêneos, sendo constituídos, principalmente, de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. É um dos principais componentes da parede celular das plantas, encontrando-se na lamela média (JAYANI; SHIVALIKA; GUPTA, 2005) (Figura 5).

Devido ao caráter hidrofílico da pectina, o que confere à parede celular propriedades plásticas e flexíveis, a água é capaz de penetrar através da parede celular, favorecendo a formação de géis (RAVEN; EVERT; EINHORN, 2001).

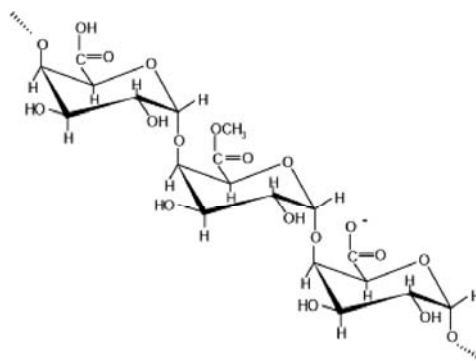


Figura 5 Estrutura primária de substâncias pécicas
Fonte: Adaptado de Jayani, Shivalika e Gupta (2005)

3.4 Mecanismos de hidrólise enzimática

3.4.1 Degradação enzimática da celulose

Para realizar a degradação da celulose, os microrganismos produzem uma mistura complexa de enzimas denominada de celulases. A hidrólise da celulose requer um complexo de enzimas que atuam sinergisticamente para a sua total degradação. De acordo com o sítio de atuação, elas podem ser classificadas em endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; POTHIRAJ; BALAJI; EYINI, 2006; CASTRO, 2010; BOM; GIRIO; PEREIRA JR., 2008) (Figura 6).

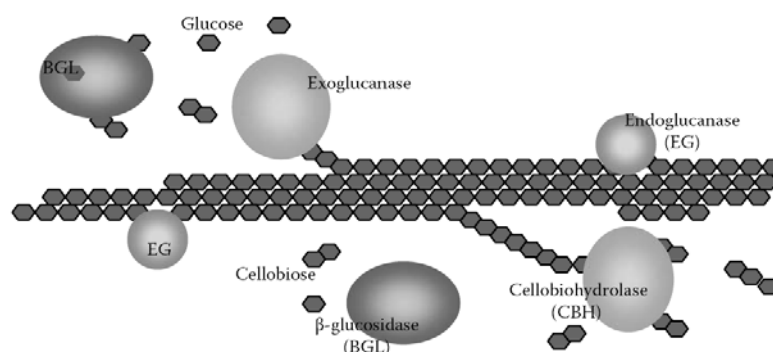


Figura 6 Diagrama mostrando o modo de ação das celulases
Fonte: Sukumaran (2009)

As endo- β -1,4 glucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações internas β -1,4-D-glicosídicas da celulose aleatoriamente, atuando nas regiões amorfas, produzindo celo-oligossacarídeos com diversos graus de polimerização (LYND et al., 2002; ZHANG; LYND, 2004).

As exoglucanases são formadas pela celodextrinase 1,4- β -D-glicano glicanohidrolases (EC 3.2.1.74) e pela celobiohidrolase (CBH), 1,4- β -D-glicana celobio hidrolases (EC 3.2.1.91). São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias de polissacarídeo. As enzimas do tipo I (CBH I) hidrolisam terminais redutores, enquanto as do tipo II (CBH II) hidrolisam terminais não redutores, podendo liberar tanto glicose como celobiose (LYND et al., 2002; BOM; GÍRIO; PEREIRA JR., 2008). As celobiohidrolases apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato (cellulose binding domain, CBD) e sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (AWAFO; CHAHAL; SIMPSON, 1998).

As enzimas β -glicosídeas (EC 3.2.1.21), denominadas de β -D-glicosídeo glicohidrolases, hidrolisam a celobiose em duas moléculas de glicose (LYND et al., 2002).

3.4.2 Degradação enzimática da hemicelulose

A característica heteropolissacarídica das hemiceluloses torna complexo o mecanismo de ataque enzimático e sua hidrólise completa requer a atuação de várias enzimas de forma cooperativa (SHALLOM; SHOHAM, 2003). A mais comum hemicelulose é a xilana (SUKUMARAN, 2009). A completa degradação da xilana requer a ação das enzimas endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), β -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37) e diversas enzimas acessórias e desramificadoras dos grupos laterais ligados à cadeia principal de xilana, como α -glicuronosidase (EC 3.2.1.139), α -arabinosidase (EC 3.2.1.55) e acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterase e ácido p-cumárico esterase (Figura 7) (SAHA, 2003; BOM; GIRIO; PEREIRA JR., 2008).

As endo-xilanases hidrolisam, principalmente, as ligações interiores β -1,4-xilose da cadeia principal de xilana e a β -xilosidase hidrolisa xilo-

oligossacarídeos a xilose. A α -arabinosidase e α -glucuronosidase removem a arabinose e substituintes do 4-O-metil ácido glucurônico, respectivamente. As esterases hidrolisam as ligações éster entre unidades de xilose da xilana e ácido acético (acetilxilanaesterase) ou entre resíduos de cadeia de arabinose e ácidos fenólicos, como ácido ferúlico (ácido ferúlico esterase) e ácido p-cumárico (p-cumárico esterase) (GÍRIO et al., 2010; SAHA, 2003).

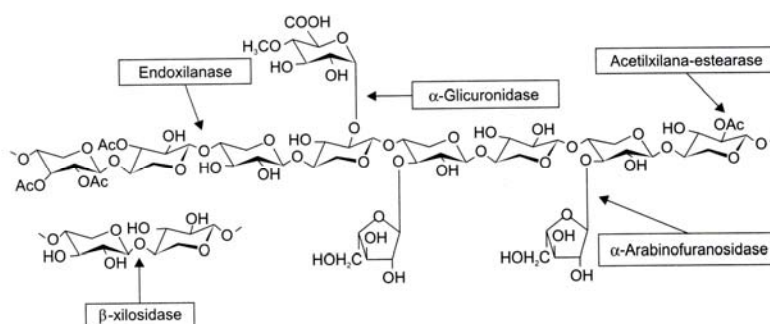


Figura 7 Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana

3.5 Microrganismos produtores de celulases e xilanase

Os microrganismos envolvidos na degradação da celulose e hemicelulose são encontrados em grupos taxonômicos extremamente variados (BÉGUIN; AUBERT, 1994). Estas enzimas são produzidas por fungos, bactérias e leveduras, mas a principal fonte comercial são os fungos filamentosos (POLIZELI, 2005).

Espécies de *Trichoderma* são fontes preferenciais de preparações de celulases e xilanases industriais, devido à sua capacidade de secretar extracelularmente altos níveis de endoglucanase e celobio-hidrolase, além de uma gama de enzimas acessórias que atacam polissacarídeos não celulósicos, como hemicelulose e pectina (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; BERLIN

et al., 2005; BERLIN et al., 2006). Entretanto, a espécie *Trichoderma reesei* produz baixos níveis de β -glicosidase, sendo necessária a suplementação desta enzima para completar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Diferentes espécies de *Aspergillus* produtoras de β -glicosidase têm sido utilizadas para suplementar as enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* (DE VRIES; VISSER, 2001; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010; LIU et al., 2011). Outra espécie de fungo também relatada como produtora de celobio-hidrolase, β -glicosidase, endoglucanase e xilanase é *Acremonium cellulolyticus* (IKEDA et al., 2007).

Em bactérias, encontraram-se microrganismos decompositores da celulose tanto aeróbios como anaeróbios. As bactérias aeróbias produtoras de celulases são espécies do gênero *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *B. polymixa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* e, entre as bactérias anaeróbias, estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium* e *Ruminococcus* (LYND et al., 2002).

Em relação à produção de hemicelulases, muitos microrganismos, como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Thermomyces*, produtores de celulase, também são capazes de produzir esta enzima. As principais bactérias produtoras de hemicelulase são espécies de *Bacillus*. Xilanases podem também ser produzidas por algumas actinobactérias como *Streptomyces Microbispora*, *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces* (JANG; CHEN, 2003; TUNCER et al., 2004; SUKUMARAN, 2009; KAUSAR et al., 2011). *Clostridium thermocellium*, *C. thermohydrosulfuricum*, *C. thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *T. Brockii*, *T. acetoethylicus*, *Neurospora crassa* e *Pichia stipitis* conseguem degradar a xilana (GLAZER; NIKAIDO, 2007). Alves-Prado et al. (2009) realizaram seleção de microrganismos produtores de xilanase na área de cerrado em Mato Grosso do Sul e, entre as 50

bactérias e 15 fungos isolados, encontraram a bactéria *Lysinibacillus* sp. e o fungo *Neosartorya spinosa* como bons produtores de xilanase.

A atividade celulolítica e xilanolítica em leveduras é relativamente rara. Os principais gêneros e espécies relacionados com a produção de xilanase são *Aureobasidium pullulans*, *Bullera*, *Candida ergatensis*, *C. shehatae*, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *C. podzolicus*, *C. terreus*, *Pichia stipitis*, *Trichosporon cutaneum* e *T. pullulans* (LEE et al., 1986; BIELY et al., 1998; BHADRA et al., 2008). Em pesquisa realizada sobre a atividade enzimática de leveduras isoladas de madeira em decomposição, somente *Aureobasidium microstietum* e *T. pullulans* apresentaram atividade de celulase e xilanase, enquanto as outras espécies isoladas, *Candida*, *Filobasidium uniguttulatum*, *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii*, foram produtoras apenas de xilanase (JIMENEZ et al., 1991). Geralmente, a habilidade de leveduras em hidrolisar xilana não está acoplada à capacidade celulolítica (LEE et al., 1986).

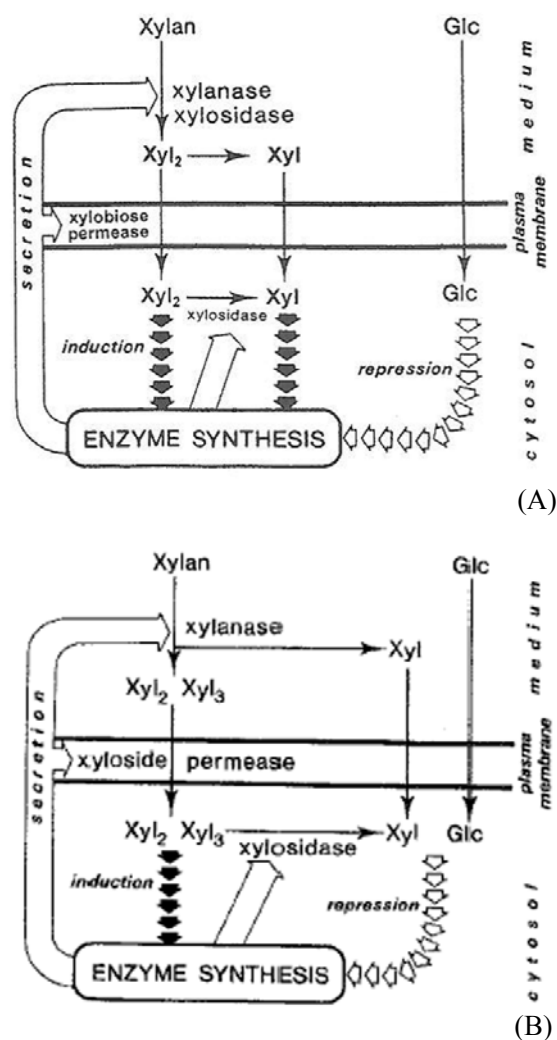
3.6 Modelo de indução e regulação da biossíntese de enzimas

Os sistemas enzimáticos são, geralmente, induzidos com fragmentos dos polissacarídeos correspondentes. Como exemplo, xilanase e xilosidase são produzidas em quantidades elevadas durante o crescimento em xilana e a síntese da enzima é reprimida por fontes de carbono metabolizadas, como a glicose ou a xilose (BIELY, 1985; BIELY; KREMICKY, 1998).

A xilana não pode entrar na célula sem antes ser degradada extracelularmente por xilanases secretadas no meio de cultivo. O principal produto da degradação da xilana são xilo-oligossacarídeos, mas outros produtos, como ácido acético, L-arabionose, D-glucuronato ou ácido 4-O-metil-D-glucurônico e xilose (BIELY, 1985; BIELY; KREMICKY, 1998).

Xilosidase está associada à célula em algumas bactérias e leveduras e ocorre no citosol na forma solúvel. Em alguns microrganismos, os xilooligosacarídeos são transportados para o interior da célula por sistema de transporte ativo chamado xilobiose permease (BIELY, 1985; BIELY; KREMICKY, 1998) (Figura 8).

Por outro lado, a rápida degradação e o metabolismo de compostos indutíveis podem resultar em simultânea repressão catabólica da síntese de enzimas (HRMOVÁ et al., 1984).



Xyl = D-xlose; Xyl₂=β-1,4-xilobiose; Glc=D-glicose

Figura 8 Representação esquemática do sistema xilanólítico de *Aureobasidium pullulans* (A) e *Cryptococcus albidus* (B)

Fonte: Biely e Kremnický (1998); Biely (1985)

Em relação à celulase, a produção comercial desta enzima vem sendo realizada, principalmente, com *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp. (CHI et al., 2009). Em *T. reesei*, esta enzima pode ser induzida por celulose. Além dos

mecanismos indutores, a regulação da expressão de celulases se dá por mecanismos repressores. Soni e Soni (2010) observaram que, com a adição de concentrações variáveis de glicose, os níveis de exoglucanase, endoglucanase e B-glicosidase decresceram no cultivo de *Chaetomium erraticum*, indicando a repressão, a qual foi, geralmente, proporcional às concentrações de açúcares adicionados. Entretanto, o modelo de regulação de celulase em leveduras não é relatado na literatura.

3.7 Processos microbianos para produção de enzimas

Os processos industriais de produção de enzimas são desenvolvidos, em sua maior parte, em cultivos submersos aerados, em biorreatores com agitação mecânica, que permitem maior controle dos parâmetros operacionais. A batelada alimentada é a forma mais empregada de condução do bioprocessamento. O cultivo no estado sólido é também utilizado, principalmente nos países orientais, por apresentar vantagens para a produção de algumas enzimas, especialmente as produzidas por fungos filamentosos (BON; GÍRIO; PEREIRA JR., 2008).

O cultivo submerso tem como vantagem a possibilidade de ter melhor racionalização e padronização do processo, o que é fundamental para a indústria, além de permitir um sistema de cultura homogêneo (HOLKER; LENZ, 2005). Diversos metabólitos de grande importância podem ser produzidos por meio da fermentação submersa. Entre eles estão enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, carotenoides, biotina, proteínas e aminoácidos (PAPAGIANNI, 2004).

Diversos biorreatores podem ser empregados para o cultivo submerso, havendo uma grande variedade de configurações. Os mais amplamente empregados são os reatores de mistura, constituindo cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente. No entanto, para células microbianas com elevadas sensibilidade ao cisalhamento é necessária a utilização de biorreatores

como reatores (*air-lift*), *loop reactors* ou coluna de bolhas (*buble column*) (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A fermentação no estado sólido, por sua vez, é definida como um processo em que o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos, na ausência de água livre. Os substratos tradicionalmente utilizados são produtos agrícolas, como arroz, trigo, cevada, milho e soja, além de resíduos agroindustriais e florestais (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

As operações do processo fermentativo no estado sólido reproduzem os processos microbiológicos naturais, como compostagem e ensilagem. Em aplicações industriais, esse processo natural pode ser utilizado de forma controlada para produzir um produto de interesse. Pode ser realizado sem agitação mecânica, com agitação ocasional ou contínua, ou em colunas recheadas com circulação de líquido (COUTO; SANROMÁN, 2006).

De acordo com Couto e Sanromán (2006), diversas enzimas de importância industrial, como proteases, amilases, glicoamilases, celulasas, xilanases e pectinases, são produzidas por fermentação no estado sólido. Além da produção de enzimas, a fermentação em estado sólido é apropriada para a produção de compostos termolábeis, sobretudo quando os rendimentos mais elevados podem ser obtidos, quando comparados com fermentação submersa.

O sucesso para a produção de um metabólito a partir de microrganismos requer conhecimento detalhado de suas características fisiológicas e de crescimento. Sabe-se que, para a produção de diversos metabólitos, são necessárias diferentes condições físicas e químicas, uma vez que cada microrganismo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico. As condições precisas e o correto estágio de desenvolvimento para cada fermentação devem ser estabelecidos para que seja conseguida a produção máxima do produto de interesse (PAPAGIANNI, 2004).

3.8 Aplicações biotecnológicas

As enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos, utilizam a tecnologia das enzimas em várias de suas etapas (PANDEY et al., 1999). Enzimas são majoritariamente produzidas por microrganismos, embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais.

Com o desenvolvimento da biotecnologia, há um grande interesse na utilização de enzimas celulolíticas produzidas por microrganismos, que são capazes de converter a biomassa da celulose em glicose e serem utilizados em diferentes aplicações, como, por exemplo, a produção de etanol combustível (THONGEKKAEW et al., 2008). Celulases e xilanases são promissoras para sacarificação de vários resíduos agrícolas e florestais pré-tratados em açúcares fermentáveis. A utilização dos açúcares da hemicelulose é essencial para a eficiente conversão de materiais lignocelulósicos a etanol e outros produtos (SAHA, 2003).

As celulases estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes para os processos biotecnológicos (SHAFIQUE et al., 2004), ocupando, atualmente, o terceiro lugar entre as enzimas industriais, devido à sua utilização no processamento de algodão, na reciclagem de papel, como enzima detergente, na extração de suco e como aditivo para a alimentação animal (WILSON, 2009).

A pesquisa direcionada às celulases e a outras polissacaridasas relacionadas começou no início da década de 1950, devido ao seu enorme potencial para converter lignocelulose, a fonte de energia mais abundante e renovável da terra, em glicose e açúcares solúveis (BHAT, 2000).

As crescentes preocupações sobre a escassez de combustíveis fósseis e emissão de gases do efeito estufa resultam no enfoque maior para a produção de

etanol a partir da biomassa lignocelulósica, utilizando celulases para hidrolisar estes materiais (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

As celulases e as hemicelulases (xilosidases, xilanases, mananases e arabinases), juntamente com as pectinases, são denominadas enzimas de maceração, utilizadas para a extração e a clarificação de sucos de frutas e outros vegetais. Durante a produção de sucos, as frutas são totalmente maceradas em polpa que, depois de processos físicos (prensamento, centrifugação e filtração), resulta em uma fase líquida e uma fase sólida que não é aproveitada. O uso das enzimas de maceração permite a utilização desta fase sólida, aumentando o rendimento do processo e o valor nutricional do suco (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002). Outras aplicações das enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico são em processos de fabricação de papel, alimentação animal, indústria de alimentos, produção de bioetanol pela conversão de resíduos lignocelulósicos e tratamento de resíduos, entre outros (CHI et al., 2009)

Preparações enzimáticas contendo, principalmente, β -glicosidases têm sido utilizadas para melhorar características aromáticas dos vinhos pela liberação de monoterpenos e compostos fenólicos responsáveis pelo aroma da bebida (MAICAS; MATEO, 2005).

As celulases, juntamente com as hemicelulases, têm potencial aplicação na indústria de alimentação animal, com grande relevância para aves, porcos, ruminantes, animais de estimação e peixes. Preparações enzimáticas podem melhorar o aproveitamento alimentar, a produção de leite e o ganho de peso, principalmente para ruminantes. Contudo, o uso bem sucedido dessas enzimas na dieta animal deve: eliminar fatores antinutricionais (ANF) presentes em grãos ou outros vegetais, degradar determinados componentes de cereal a fim de melhorar o valor nutritivo dos alimentos e/ou suplementar as enzimas digestivas dos animais (KARMAKAR; RAY, 2011).

As pesquisas, básica e aplicada, sobre celulasas microbianas não só geraram conhecimento científico, mas também revelaram seu enorme potencial na biotecnologia. As celulasas têm sido amplamente utilizadas em diversos segmentos da indústria e a demanda por estas enzimas tem sido a força motriz para as intensas investigações, principalmente com microrganismos produtores de celulase (BHAT, 2000).

REFERÊNCIAS

ALVES-PRADO, H. F. et al. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology. Part A: enzyme engineering and biotechnology**, Duluth, v. 161, n. 1-8, 2009.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 719-739, 2005.

AWAFO, V. A.; CHAHAL, D. S.; SIMPSON, B. K. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 60868) and *Pichia stipitis* Y-7124. A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of wheat straw. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 22, n. 6, p. 489-510, Dec.1998.

BEGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 25-58, 1994.

BERLIN, A. et al. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Duluth, v. 130, n. 1-3, p. 528- 545, 2006.

BERLIN, A. et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—Evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 175–184, 2005.

BHADRA, B. et al. Yeast and yeas-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. **Current Microbiology**, v. 56, p. 489-494, 2008.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.

BIELY, P.; KREMNIČKÝ, L. Yeasts degrading cellulose, hemicelluloses and pectin. **Food Technology Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 305-312, 1998.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, 1985.

BIELY, P. et al. Yeasts degrading cellulose, hemicelluloses and pectin. **Food Technology Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 305-312, 1998.

BOER, C. G. et al. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinus edodes*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1203-1207, 2006.

BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 241-271.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1-8, 2011.

BRESOLIN, J. D. et al. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.

CASTRO, A. M. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. Duluth, v. 162, n. 7, p. 2111-2122, Nov. 2010.

CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G.; MEIIRELES, C.D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymer**, v. 69, p. 579-582, 2007.

CHI, Z. et al. Bioproducts from *Aureobasidium Pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 793–804, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, décimo levantamento, julho 2012. Brasília, 2012.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia**: manual de microbiologia industrial. 3. ed. Traducido por: Paloma Liras Padin. Zaragoza: Acribia, 1993. 413 p. (Microbiologia Universidade de Leon).

DELABONA, P. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, Dec. 2001.

GARETH-JONES, E. B.; KA-LAI, P. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, p. 2403-2423, 2012.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, 13, p. 4775-4800, 2010.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology**: fundamentals of applied microbiology. 2nd ed. New York: Cambridge University, 2007. 554 p.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, Aug. 2010.

HAROS, M.; ROSELL, C. M. ; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425-430, 2002.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 301-306-, 2005

HRMOVÁ, M. et al. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 138, p. 371-376, 1984.

IKEDA, Y. et al. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23, n. 2, p. 333-338, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Bioma**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em: 10 dez. 2010

JAYANI, R. S.; SHIVALIKA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 263-268, Apr. 2003.

JIMENEZ, M. et al. Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose-degrading enzyme activities. **Mycological Research**, v. 95, n. 11, p. 1299-1302, 1991.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41-53, 2011.

KAUSAR, H. et al. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw. **Biodegradation**, Dordrech, v. 22, p. 367–375, 2011.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 411–56, 1999.

LATIF, F.; RAJOCA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corncobs by yeasts. **Bioresearch Technology**, Essex, v. 77, p. 57-63, 2001.

LEE, H. et al. Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, n. 2 p. 320-324, 1986.

LIU, D. et al. Thermostable cellulose production of *Aspergillus fumigates* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 65, n. 5, p. 717-725, Aug. 2011.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, **Microbiology and Molecular Biology**, New York, v. 66, p. 506–577, 2002.

MAICAS, S.; MATEO, J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 67, p. 322-335, 2005.

MARIS, A. J. A. van. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 391-418, Nov. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. v. 1, 768 p.

PANDEY, A. et al. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Colombus, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 6305–6317, 2009.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-67, 2002

PEREZ, K. S. S.; RAMOS, M. L. G.; MCMANUS, C. Carbono da biomassa microbiana em solo cultivado com soja sob diferentes sistemas de manejo nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 567-573, 2004.

POLIZELI, M.L.T.M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 67, p. 577-591, 2005.

POTTHRAJ, C.; BALAJI, P.; EYINI, M.; Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1882-1885, 2006.

RATTER, F. A. et al. **Distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos estados compreendidos pelo bioma Cerrado**. Brasília: Herbário Ezechias Paulo Heringer, 2000. p. 5-43. (Boletim, 5).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EINHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

ROMO-SÁNCHEZ, S. et al. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. **Food Microbiology**, London, v. 27, p. 487-492, 2010.

SHALLON, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHAFIQUE, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, A. Solid state fermentation of banana stalk for exoglucanases production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 3, 2004.

SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 30, p. 279-291, 2003.

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

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, p. 179-192.

SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ufla, 2008. 768 p.

SONI, S. K.; SONI, R. Regulation of celulase synthesis in *Chaetomium erraticum*, **BioResources**, v. 5, p. 81-98, 2010.

SILVEIRA, L. C. I; BARBOSA, M. H. P.; OLIVEIRA, M. W. Manejo de variedades de cana de açúcar predominantes nas principais regiões produtoras de cachaça de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 17, p. 25-32, 2002.

SLÁVIKOVA, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43, p. 430-436, 2003

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stok and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, Feb. 2009.

SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases – production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 64, p. 832-844, 2005.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant potential of corncob extracts of stabilization of corn oil subjected to microwave heating. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 997-1005, 2007.

SUN, J. X. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 84, p. 331-339, 2004.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 169-179, 2003.

THONGEKKAEW, J. et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 140-146, Aug. 2008.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 783–791, 2004.

VANDAMME, E. J. Agro-industrial residue utilization for industrial biotechnology products In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**: utilisation of agro-residues. New York: Springer, 2009. 462 p.

VISHNIAC, H. S. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. **Microbiology Ecology**, v. 52, p. 90–103, 2006.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, p. 295-299, 2009.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy and Fuels**, Washington, v. 22, p. 46-60, 2008.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, n. 24, n. 5, p. 452-481, Sept./Oct. 2006.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology Bioeng.**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1****A study of the enzymatic activities of yeasts from Brazilian Cerrado soils**

Artigo submetido de acordo com as normas da revista
Biodiversity and Conservation

Fernanda Paula Carvalho¹, Angélica Cristina de Souza¹, Karina Teixeira Magalhães-Guedes¹, Disney Ribeiro Dias², Cristina Ferreira Silva^{1*}, Rosane Freitas Schwan¹

¹ Department of Biology, Federal University of Lavras (UFLA), Campus Universitário, 37.200-000, Lavras, MG, Brazil

² Department of Food Science, Federal University of Lavras (UFLA), Campus Universitário, 37.200-000, Lavras, MG, Brazil

Fernanda Paula Carvalho – *email*: ferpc@ig.com.br

Angélica Cristina de Souza – *email*: angelicacristinasouza@posgrad.ufla.br

Karina Teixeira Magalhães-Guedes – *email*: karynamagat@gmail.com

Disney Ribeiro Dias - *email*: diasdr@dca.ufla.br

Cristina Ferreira Silva – *email*: cristinafsb@dbi.ufla.br

Rosane Freitas Schwan - *email*: rschwan@dbi.ufla.br

*Corresponding author: Cristina Ferreira Silva – *email*: cristinafsb@dbi.ufla.br

Mailing address: Departamento de Biologia Universidade Federal de Lavras.

CEP: 37200-000. Lavras-MG, Brazil.

Phone: (+55) 35 38291916. Fax: (+55) 35 38291100

Abstract

A total of 307 yeasts strains were isolated from native Cerrado (Brazilian Savannah) soils collected from the Passos, Luminárias and Arcos municipalities in Minas Gerais State, Brazil. The soils were chemically characterized. Ten yeast genera (*Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Lindnera*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulaspora* and *Trichosporon*) and 23 distinct species in both rainy and dry seasons were identified. All of these genera were abundant during the dry season. The pH values of the soil from the Passos, Luminárias and Arcos regions varied from 4.1 to 5.5. There were no significant differences in the concentrations of phosphorus, magnesium and organic matter in the soils among the studied areas. The Arcos area contained large amounts of aluminum during the rainy season and both hydrogen and aluminum in the rainy and dry seasons. The yeast populations that were identified seemed to be unaffected by the high levels of aluminum in the soil. The API ZYM[®] (BioMérieux, France) system was employed to characterize the extracellular enzymatic activity profiles of the yeast isolates. The results of the API ZYM[®] test showed differences in the extracellular enzyme profiles among the yeast species that were evaluated. Some isolates that belong to the same species showed enzymatic profiles that differed from one another. Our study is the first to describe yeasts isolated from the Brazilian Cerrado ecosystem and demonstrates their ability to produce enzymes that may be of potential industrial interest.

Keywords Enzymes. Brazilian soils. Yeasts biodiversity. Cerrado

Introduction

The Cerrado is the second largest biome in Brazil, covering an area of approximately 2 million km² and accounting for 24% of the national territory. This area encompasses land within the Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Piauí e o Distrito Federal States of Central Brazil. The climate of this biome is tropical, characterized by well-defined seasons, including dry winters (April to September) and rainy summers (October to March). The Cerrado soils are deep, acidic, poor in nutrient quality and contain high concentrations of aluminum (Lopes and Cox 1997). The Cerrado vegetation is heterogeneous, ranging from tall dense savanna woodlands (cerradão), through progressively less arboreal formations (cerrado sensu strictu), to nearly treeless grasslands (campo sujo) (Furley 1999). The variation of vegetation contributes to the extensive biodiversity found within this biome. Indeed, the Cerrado region is considered a biodiversity hotspot and is a priority for conservation efforts (Myers et al. 2000, Bustamante et al. 2012).

The expansion of agriculture, forest fires, and urban growth has led to reductions in the native Cerrado, making it the most threatened biome in South America. It is estimated that by 2030, the Brazilian Cerrado will be eliminated if no actions are taken to preserve this biome (Bresolin et al. 2010).

Several studies have been conducted to profile the diversity of the flora and fauna of the Brazilian Cerrado biome (Bustamante et al. 2012, Bitar et al. 2012). However, few studies have described the biodiversity of microorganisms within this ecosystem. Others have demonstrated the presence of several types of bacteria and fungi in the Cerrado soils (Castro et al. 2008, Bresolin et al. 2010, Nascimento et al. 2012), however, the diversity of yeasts in the native cerrado soils of Minas Gerais have yet to be documented.

Yeasts occur in a wide range of soil types from vastly diverse geographical areas ranging from arctic zones to the tropics (Gareth-Jones and Ka-Lai 2012). Combinations of temperature, humidity, chemical composition, geographic location and other factors influence the diversity of yeasts found in these environments (Vishniac 2006). Many yeast genera have been isolated from soils, such as *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Schwanniomyces* and *Schizoblotsporium*. Other genera that have been isolated from soils taken from locations in Brazil and throughout the world include *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Torulopsis* (Bresolin et al. 2010).

Yeasts present in the soil contribute to the mineralization process, enhance plant growth, maintain soil structure, contribute to nutrient transformations, control phytopathogens and are useful in bioremediation approaches (Botha 2011). In addition, yeasts are important sources of biomolecules such as enzymes that are commonly used in industrial applications. Currently, enzymes from microbial sources are used in food processing, detergents, textiles and pharmaceuticals, molecular biology and biofuels (Romo-Sánchez et al. 2010).

It is important to highlight the need to isolate and characterize yeasts from different habitats to enhance species preservation efforts, in addition to ascertaining the biotechnological potential that these microorganisms may present (Romo-Sánchez et al. 2010). In this study, we assessed the diversity, geographical and seasonal distribution, and biotechnologically relevant enzyme production of yeasts inhabiting the native cerrado within the Arcos, Passos and Luminárias municipalities in Minas Gerais, Brazil.

Methods

Sampling sites and sample collection

Thirty composite soil samples of the native cerrado were collected from three sites in Minas Gerais, Brazil: Passos (PA), Arcos (AR) and Luminárias (LU). The samples were taken during the months of January (highest rainfall season, designated “r”) and August (dry season, designated “d”) in the year 2010. Five composite samples were collected (A, B, C, D and E) by region, totaling 15 georeferenced samples, with coordinates ranging from 20° 14’ to 21° 37’ south and 44° 58’ to 46° 30’ west. Each composite sample consisted of 12 simple sub-samples, collected at a depth of 0-20 cm, in two concentric circles with a radius of 3 and 6 m from the center (Figure 1). The soil samples were extracted with a flamed-sterilized auger, mixed, packed in sterile bags, transported to the laboratory and stored at 4 °C for later use (Moreira et al., 2009).

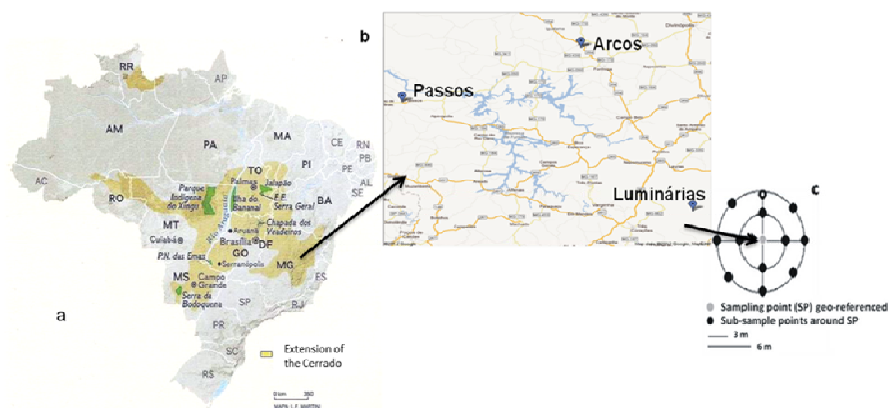


Figure 1 Geographical location and description of sampling points in the Brazilian Cerrado, in Minas Gerais

Isolation, purification and maintenance of yeasts

Yeasts were isolated after enrichment of 10 g of a soil sample in 90 mL of yeast extract peptone dextrose media (YEPD) (Merck, SP, Brazil) containing 2% glucose, 2% peptone and 1% yeast extract. The media containing the different soils was sonicated for 2 min and incubated in an orbital shaker at 130 rpm for 2 to 7 days. After the incubation period, serial dilutions of the suspension were plated on YEPD media acidified to pH 3.5 to prevent bacterial growth.

Plates were incubated under aerobic conditions at 28 °C for 24 at 72 hours. A number of colonies, corresponding to the square root of the sum of all morphologically different colonies appearing on the plates, were purified by repeated streaking on YEPD (pH 3.5) (FOOD DRUGS ADMINISTRATION, 1998). The purified isolates were maintained at -80 °C in YEPD broth containing 20% glycerol.

Identification of yeasts

ITS (internal transcribed spacer) regions were sequenced to identify the yeasts, using a methodology described by Ramos et al. (2010). The ITS region was amplified using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). The PCR thermocycler was run using the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles at 94 °C for 1 min, 52 °C for 45 s and 72 °C for 1 min; a final extension step at 72 °C for 7 min; then held at 4 °C. Amplification of the ITS region was confirmed by electrophoresis. The ITS region was sequenced by Macrogen, (Seoul, Korea) (same primers) and compared with sequences reported in GenBank using the BLAST algorithm.

Diversity indices of species

The species diversity of yeasts isolated from the cerrado regions of Arcos, Passos and Luminárias was evaluated using the PAST program (version 2.15), which calculated the number of taxa (S), the total number of individuals (n), equitability ($J = H'/H_{max}$), dominance ($D = \sum (n_i/n)^2$), Simpson's index (1-D) and Shannon's index ($H = -\sum (n_i/n) \ln(n_i/n)$, where n_i is the number of individuals of the taxon I, and n is the total number of individuals) (Hammer et al., 2001).

Physicochemical analysis of soils

The soil samples were forwarded to the Soil Fertility and Plant Nutrition laboratory at the Federal University of Lavras and analyzed according to Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa 1997). The concentrations of phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), aluminum (Al), exchangeable acidity (H^+Al), organic matter (OM), sandy, silt and clay were evaluated. These results were used to calculate other parameters, such as the base sum Ca, Mg and K (SB), effective cation exchange capacity (t), cation exchange capacity at pH 7.0 (T), and base saturation of CTC at pH 7.0 (V%), aluminum saturation and texture (m%).

Screening for cellulase and xylanase enzymes

Cellulase and xylanase activities were assessed on plates containing CMC agar media (0.2% carboxymethylcellulose, 0.2% $NaNO_3$, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% KCl, 0.02% peptone and 1.7% agar) (Kasana et al., 2008) and xylan-agar (0.67% yeast nitrogen base, 1% beech wood xylan, and 1.8% agar) (Merck, SP,

Brazil) (Bhadra et al., 2008). The plates were inoculated with 10 μ L aliquots of each isolate, standardized to 10^7 cells/mL, and incubated at 28 °C and 26 °C for 48 hours and 15 days, respectively. After the incubation period, the plate was flooded with iodine (2.0 g KI and 1.0 g iodine in 300 ml distilled water) for 3 to 5 minutes to identify isolates producing enzymes. The formation of a clear halo zone around the colonies was considered a positive result, indicating the presence of a given enzyme.

Evaluation of enzymes by the API ZYM® test

The API ZYM® (BioMérieux, France) test was used to evaluate the enzymatic profiles of representative isolates of different species of yeasts. The API ZYM® gallery is composed of 20 cupules that contain enzymatic substrates, with a single cupule serving as a control. This system allows the semi-quantitative assessment of 19 enzymes, including glycosyl hydrolases (α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosamidase, α -mannosidase and α -fucosidase), esterases (esterase, esterase lipase and lipase), aminopeptidases (leucine arylamidase, valine arylamidase, and cystine arylamidase), proteases (trypsin, α -chymotrypsin) and phosphatases (alkaline phosphatase, acidic phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase).

The API-ZYM® test was used according to the manufacturer's instructions (API bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The enzyme activity was graded on a scale from 0 to 5 with the API ZYM® color reaction chart, with "0" indicating a negative reaction and "5" a reaction of maximum intensity. Values of 1-4 indicate intermediate reactions commensurate with the intensity of the reaction.

Statistical analyses

The PAST (version 2.15) program was used for principal component analysis (PCA) and canonical correspondence analysis (CCA) (Hammer et al., 2001). PCA was performed using a correlation matrix in which the values of abiotic variables, such as soil chemical composition, were used to identify similarities between the samples that were collected at different locations. CCA was employed to correlate the distribution of yeasts with the abiotic soil variables and different regions sampled.

Results and discussion

Physiochemical characteristics of the Brazilian Cerrado soils

The chemical and biochemical properties of the cerrado soils from the Passos, Luminárias and Arcos regions during the rainy and dry seasons are shown in Table 1. The results for the thirty samples of cerrado soils were ordered by PCA, in which the principal components accounted for 70.98% of the total variance. The first principal component accounted for 48.59% and the second component accounted for 22.39% of the total variability. The generated scatterplot revealed relationships between the areas studied; grouping the similar soils into four groups (Figure 2). This analysis did not show any discernible pattern in the distribution for soils belonging to the same region or season. Groups III and IV covered a larger number of cities and were influenced mainly by the aluminum saturation index (m%) and pH, respectively. Most soils of the Arcos and Luminárias regions contained high levels of Al, H + Al and m%. These soils had high acidity and aluminum concentration, consistent with the values found in cerrado soils that have been reported by others (Furley 1999,

Lopes and Cox 1997). Considering the t, V% and SB parameters, which relate to soil fertility, the points belonging to groups I and II correspond with the most fertile conditions of all the points that were assessed.

Table 1 Chemical and physical characteristics of the Brazilian Cerrado soil samples

Sample and Season		pH	P	K	Mg	Al	H+Al	OM	SB	Texture	
			mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	Cmol/dm ³	dag/Kg	mg/dm ³		
PA	Rainy	Point 1	5.3±0.1a	1.5±0.1a	25±1a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	3.6±0.1a	1.4±0.1a	0.3±0.1a	Sandy loam
		Point 2	5.4±0.1a	1.5±0.1a	56±2a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	4.5±0.1a	2.0±0.1a	0.4±0.1a	Medium loam
		Point 3	5.5±0.1a	1.2±0.1a	33±1a	0.2±0.0a	0.4±0.1a	2.6±0.1a	1.1±0.1a	0.3±0.1a	Medium loam
		Point 4	5.5±0.1a	1.0±0.1a	70±1b	0.1±0.0a	0.5±0.1a	3.6±0.1a	1.5±0.1a	0.5±0.1a	Medium loam
		Point 5	5.4±0.1a	0.7±0.1a	9±1b	0.1±0.0a	0.1±0.1a	1.7±0.1a	0.4±0.1b	0.2±0.1a	Medium loam
LU	Rainy	Point 6	5.4±0.1a	1.2±0.1a	28±1a	0.2±0.0a	0.5±0.1a	7.9±0.1a	3.4±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
		Point 7	5.0±0.1a	1.5±0.1a	20±1a	0.1±0.0a	0.5±0.1a	7.9±0.1a	2.6±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
		Point 8	5.1±0.1a	1.2±0.1a	11±1b	0.2±0.0a	0.3±0.1a	2.6±0.1a	1.1±0.1a	0.2±0.1a	Sandy loam
		Point 9	5.2±0.1a	2.0±0.1a	20±1a	0.1±0.0a	0.9±0.2a	7.0±0.1a	2.4±0.1a	0.3±0.1a	Medium loam
		Point 10	5.1±0.1a	1.5±0.1a	34±1a	0.1±0.0a	0.8±0.1a	8.8±0.3b	2.7±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
AC	Rainy	Point 11	5.0±0.1a	1.2±0.1a	48±1a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	4.0±0.1a	1.6±0.1a	0.7±0.1a	Clay loam
		Point 12	4.6±0.1a	0.7±0.1a	39±1a	0.1±0.0a	1.0±0.1a	6.3±0.1a	2.0±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
		Point 13	4.1±0.1a	1.8±0.1a	27±1a	0.3±0.0a	2.1±0.1b	15.3±1b	3.4±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
		Point 14	4.1±0.1a	1.8±0.1a	33±1a	0.1±0.0a	2.4±0.1b	17.1±2b	4.0±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
		Point 15	5.0±0.1a	1.8±0.1a	69±2b	0.1±0.0a	1.8±0.1b	12.3±1b	2.7±0.1a	0.4±0.1a	Clay loam
PA	Dry	Point 1	4.7±0.1a	1.7±0.1a	113.8±1b	0.1±0.0a	0.2±0.1a	13.7±0.1b	3.9±0.1a	0.5±0.1a	Sandy loam
		Point 2	5.1±0.1a	1.7±0.1a	88.9±1b	0.1±0.0a	0.4±0.1a	5.6±0.1a	2.4±0.1a	0.7±0.1a	Medium loam
		Point 3	5.1±0.1a	1.4±0.1a	137.28±1b	0.1±0.0a	0.4±0.1a	4.5±0.1a	2.2±0.1a	0.8±0.1a	Medium loam
		Point 4	5.1±0.1a	1.7±0.1a	117±1b	0.1±0.0a	0.5±0.1a	5.0±0.1a	1.9±0.1a	0.9±0.1a	Medium loam
		Point 5	5.2±0.1a	1.4±0.1a	54±1b	0.1±0.0a	0.2±0.1a	4.5±0.1a	1.7±0.1a	0.4±0.1a	Medium loam
		Point 4	5.1±0.1a	1.7±0.1a	117±1b	0.1±0.0a	0.5±0.1a	5.0±0.1a	1.9±0.1a	0.9±0.1a	Medium loam
LU	Dry	Point 5	5.2±0.1a	1.4±0.1a	54±1b	0.1±0.0a	0.2±0.1a	4.5±0.1a	1.7±0.1a	0.4±0.1a	Medium loam
		Point 6	5.1±0.1a	2.5±0.1a	37.4±1a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	6.3±0.1a	2.2±0.1a	0.1±0.1a	Clay loam
		Point 7	5.1±0.1a	0.9±0.1a	37.4±1a	0.1±0.0a	1.5±0.1b	7.0±0.1a	2.8±0.1a	0.2±0.1a	Clay loam
		Point 8	5.2±0.1a	0.9±0.1a	39±1a	0.1±0.0a	0.7±0.1a	7.8±0.1a	2.8±0.1a	0.2±0.1a	Sandy loam
		Point 9	5±0.1a	1.2±0.1a	46±1a	0.1±0.0a	1.5±0.1b	10.9±0.1b	3.0±0.1a	0.3±0.1a	Medium loam
Point 10	5±0.1a	1.2±0.1a	67±1b	0.1±0.0a	1.4±0.1b	9.88±0.1b	3.1±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam		

Table 1, conclusion

Sample and Season		pH	P	K	Mg	Al	H+Al	OM	SB	Texture	
			mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	Cmol/dm ³	dag/Kg	mg/dm ³		
AC	Dry	Point 11	4.7±0.1a	2.0±0.1a	149.7±1b	0.1±0.0a	0,4±0.1a	8.7±0.1a	2.4±0.1a	1.3±0.1a	Clay loam
		Point 12	4.8±0.1a	1.4±0.1a	48.3±1a	0.6±0.0a	0.1±0.1a	7.0±0.1a	1.8±0.1a	0.2±0.1a	Clay loam
		Point 13	4.3±0.1a	1.4±0.1a	54.6±1a	0.1±0.0a	0.1±0.1a	15.3±1b	2.8±0.1a	0.3±0.1a	Clay loam
		Point 14	4.2±0.1a	1.7±0.1a	39.0±1a	0.1±0.0a	0.1±0.1a	17.1±1b	3.0±0.1a	0.2±0.1a	Clay loam
		Point 15	4.8±0.1a	1.2±0.1a	84.2±2b	0.1±0.0a	0.1±0.1a	10.9±1b	1.9±0.1a	0.4±0.1a	Clay loam

Data are average values of duplicate±standard deviation. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Soil classification in sandy (content clay <15), Medium (content clay between 15 and 35) and clay (content clay \geq 35). Abbreviations: PA – Passos; LU – Luminárias; AC – Arcos. K – Potassium; P - Phosphorus; Al – Aluminum; Ca – Calcium; Mg – Magnesium; H+Al – Hydrogen + Aluminum; OM - Organic Matter; SB – (exchangeable bases) the sum of Ca, Mg, Na and K

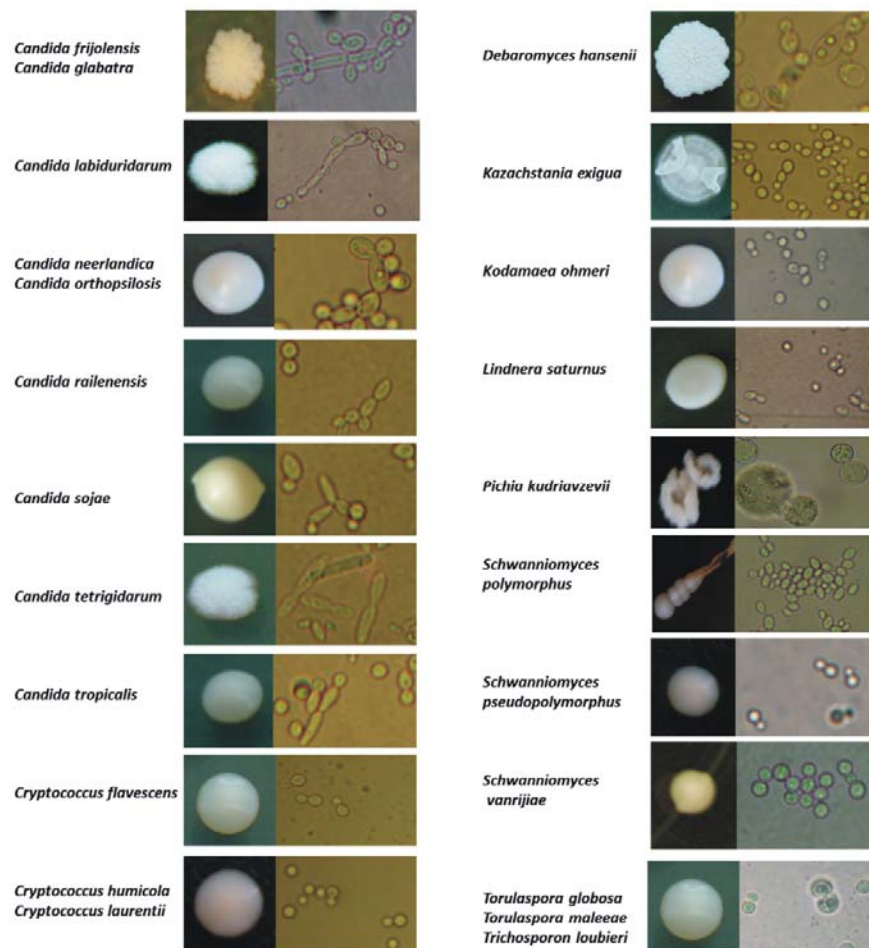


Figure 2 Yeast species morphotypes isolated in the Brazilian Cerrado in Minas Gerais

Yeast isolation and identification

The total yeasts counts were compared between the rainy and dry seasons. A statistically significant difference ($p < 0.05$) was observed for all the analyzed areas (Table 2). The dry season exhibited higher microbial counts (~ 9 log CFU/g) compared with the rainy season (~ 8 log CFU/g).

Table 2 Isolates count of the population in log CFU/g of soil in YEPD medium during the rainy and dry season

Region	Rainy Season
Arcos	7.9±0.1 ^a
Luminárias	7.8±0.1 ^a
Passos	7.8±0.1 ^a
Region	Dry Season
Arcos	9.1±0.2 ^c
Luminárias	8.9±0.2 ^c
Passos	8.8±0.1 ^c

Data are mean values of duplicate \pm standard deviation
Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

The analysis of the ITS region sequence amplification products led to the identification of ten yeast genera: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Lindnera*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis* and *Trichosporon* (Table 3 and Figure 3). Several yeast genera have been frequently isolated from various soil types. In Amazonian soils, species belonging to the *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Wangiella*, *Trichosporon* and *Pichia* genera were found (Mok et al. 1984). In addition, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Williopsis*, *Rhodotorula* and *Sporidiobolus* genera were isolated from fertile soils collected from Costa Rica (Vishniac 2006). Yeasts belonging to the *Aureobasidium*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon* and *Williopsis* genera were

isolated from Amazon soils (Vital et al. 2002). The above mentioned areas contain distinct soil and climate characteristics, and yet, several yeast genera isolated from these soils were also found in the Brazilian Cerrado soils.

Table 3 Identification of representative yeasts isolated from Arcos, Passos e Luminárias

Group	Identified Isolate Number	Isolate Code	Accession Number	% Identity	Closest GenBank fit (species name)
I	3	UFLA CES-Y 816	EF658666.1	97	<i>Candida frijolensis</i>
		UFLA CES-Y 818	EF658666.1	97	
		UFLA CES-Y 835	EF658666.1	97	
II	7	UFLA CES-Y 557	AY939793.1	100	<i>Candida glabrata</i>
		UFLA CES-Y 561	AY939793.1	100	
		UFLA CES-Y 563	AY939793.1	99	
III	1	UFLA CES-Y 590	FJ623629.1	100	<i>Candida labiduridarum</i>
IV	13	UFLA CES-Y 580	FJ623628.1	98	<i>Candida neerlandica</i>
		UFLA CES-Y 284	EF658663.1	100	
V	11	UFLA CES-Y 597	FN812686.1	99	<i>Candida orthopsilosis</i>
		UFLA CES-Y 614	FN812686.2	99	
		UFLA CES-Y 625	FN812686.1	99	
VI	4	UFLA CES-Y 758	HQ438300.1	99	<i>Candida railenensis</i>
		UFLA CES-Y 759	FM178302.1	99	
		UFLA CES-Y 760	HQ438303.1	99	
VII	3	UFLA CES-Y 777	FN424104.1	99	<i>Candida sojae</i>
		UFLA CES-Y 781	FN424104.1	99	
		UFLA CES-Y 784	FN424104.2	99	
VIII	24	UFLA CES-Y 279	FJ623630.1	98	<i>Candida tetragidarum</i>
		UFLA CES-Y 601	FJ623630.1	98	
		UFLA CES-Y 836	FJ623630.1	98	
IX	18	UFLA CES-Y 598	EF194842.1	100	<i>Candida tropicalis</i>
		UFLA CES-Y 621	EF568038.1	99	
		UFLA CES-Y 783	JF916546.1	99	
X	2	UFLA CES-Y 726	JF279290.1	100	<i>Cryptococcus flavescens</i>
		UFLA CES-Y 735	JF279290.1	99	
XI	2	UFLA CES-Y 682	AY382335.1	99	<i>Cryptococcus humicola</i>
		UFLA CES-Y 683	EF377334.1	99	

Table 3, conclusion

Group	Identified Isolate Number	Isolate Code	Accession Number	% Identity	Closest GenBank fit (species name)
XII	18	UFLA CES-Y 521	JN626987.2	100	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES-Y 546	JN627015.2	100	
		UFLA CES-Y 548	JN627003.2	100	
XIII	1	UFLA CES-Y 678	EF193070.1	99	<i>Debaromyces hansenii</i>
XIV	2	UFLA CES-Y 838	AY046170.1	100	<i>Kazachstania exigua</i>
		UFLA CES-Y 839	AY046170.1	100	
XV	1	UFLA CES-Y 648	AF219004.1	100	<i>Kodamaea ohmeri</i>
XVI	9	UFLA CES-Y 669	EF194844.1	99	<i>Lindnera saturnus</i>
		UFLA CES-Y 676	EF194844.1	100	
		UFLA CES-Y 681	EF194844.1	100	
XVII	2	UFLA CES-Y 542	FR819718.1	100	<i>Pichia kudriavzevii</i>
		UFLA CES-Y 543	JF920160.1	100	
XVIII	3	UFLA CES-Y 641	AJ586523.1	99	<i>Schwanniomyces polymorphus</i>
		UFLA CES-Y 646	AJ586523.1	99	
		UFLA CES-Y 652	AJ586523.1	99	
XIX	5	UFLA CES-Y 635	EF198011.1	99	<i>S. pseudopolymorphus</i>
		UFLA CES-Y 638	EF198011.1	99	
		UFLA CES-Y 649	EF198011.1	99	
XX	10	UFLA CES-Y 657	AB054104.1	100	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>
		UFLA CES-Y 661	AB054104.1	100	
		UFLA CES-Y 680	AB054104.1	100	
XXI	15	UFLA CES-Y 64	AY046184.1	99	<i>Torulaspota globosa</i>
		UFLA CES-Y 832	FN428932.1	99	
		UFLA CES-Y 846	AY046184.1	99	
XXII	4	UFLA CES-Y 775	AB304160.1	100	<i>Torulaspota maleeae</i>
		UFLA CES-Y 782	AB304160.1	100	
XXIII	1	UFLA CES-Y 785	AB304160.1	99	<i>Trichosporon loubieri</i>
		UFLA CES-Y 631	HM585351.1	99	

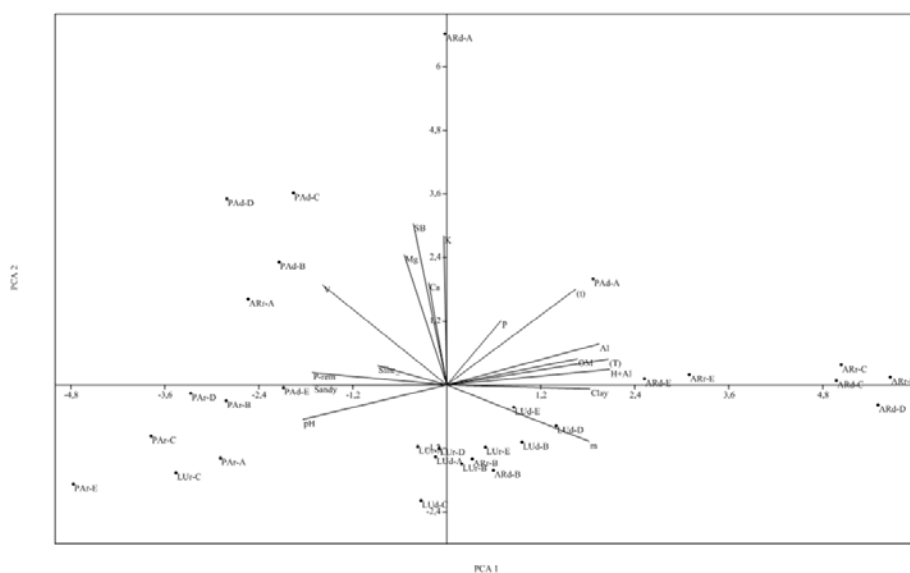


Figure 3 Principal components analysis (PCA) of chemical and physical attributes of 30 soil samples of Brazil cerrado of regions Arcos (AR), Passos (PA) and Luminárias (LU) in five points (A, B, C, D e E) in seasons dry (d) and rainy (r). Abbreviations: P – phosphorus; K – potassium; Ca – calcium; Mg – magnesium; Al – aluminium; H^+Al - exchangeable acidity; OM - organic matter; SB - sum of Ca, Mg and K; t - effective cation exchange capacity; T - cation exchange capacity at pH 7,0; V% - base saturation of CTC at pH 7,0; m% - aluminium saturation

Species composition and diversity analysis

We identified twenty-three distinct Operational Taxonomic Units (OTUs); 22 OTUs were present in samples taken during the dry season, and 9 OTUs were present in rainy season samples (Table 4). The different yeast species are members of the *Saccharomycetaceae* (18), *Tremellaceae* (3), *Trichosporonaceae* (1) and *Wickerhanomycetaceae* (1) families.

A total of 307 distinct yeast species were isolated. The yeast higher frequency was in Passos in the dry season (121). The percent of organisms from

each genus was as follows: *Candida* (58.6%), *Torulaspora* (13.4%), *Schwanniomyces* (11.4%), *Cryptococcus* (8.5%) and *Lindnera* (6.2%). The *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Pichia* and *Trichosporon* genera corresponds to 2% of the isolated organisms. Loureiro and colleagues isolated the *Candida* genera mainly in soil and water beach in the Northeast of Brazil (Pernambuco) (Loureiro et al. 2005).

Species of the *Cryptococcus* genera have also been isolated frequently from soil (Vital et al. 2002). Organisms that were isolated with high frequency include *Candida* sp. (40%), *Candida tetragidarum* (30%) and *Candida tropicalis* (30%). The isolation frequency of other species ranged from 3.3 to 16.7%, with 18 species that showed a frequency below of 10% (Table 4). The species that were found in the greatest numbers, because they grow and persist within the habitat and originate within the system, are considered autochthonous, whereas species isolated in smaller quantities are considered allochthonous and originate outside the system (Botha 2011).

Yeast species that were common in both seasons (dry and rainy) correspond to 22% of isolates (*C. glabrata*, *C. neerlandica*, *C. tetragidarum*, *C. tropicalis* and *T. globosa*). The yeasts *C. labiduridarum*, *C. laurentii* and *P. kudriavzevii* were isolated only in the rainy season, while a greater diversity of species was obtained in the dry season (*C. frijolensis*, *C. orthopsilosis*, *C. railenensis*, *C. sojae*, *C. flavescens*, *C. humicola*, *D. hansenii*, *K. exigua*, *K. ohmeri*, *L. saturnus*, *Schwanniomyces* sp., *S. polymorphus*, *S. pseudopolymorphus*, *S. vanrijiae*, *T. malleae* and *T. loubieri*).

Among the various isolated genera, the relative abundance of the Ascomycota and Basidiomycota phyla was 80% and 20%, respectively. Vital et al. also found the Ascomycota phylum is most abundant in Amazonian soils Vital et al. (2002). However, other authors detected higher numbers of yeast that are members of the Basidiomycota phylum in the soils of Austria and other

countries located along the latitudinal gradient ranging from $> 77^{\circ}$ S to $> 64^{\circ}$ N (Vishniac, 2006).

Table 4 Distribution of yeasts in dry and rainy season, OTUs, richness (S), abundance and frequency quantification

OTUs	Arcos			Passos			Luminárias			TA	TF (%)
	Rainy	Dry	A	Rainy	Dry	A	Rainy	Dry	A		
<i>Candida frijolensis</i>			0			0		3	3	3	16,7
<i>Candida glabatra</i>	10		10	1		1	1	1	2	13	66,7
<i>Candida labiduridarum</i>	1		1			0			0	1	16,7
<i>Candida neerlandica</i>	11		11		2	2	14	5	19	32	66,7
<i>Candida orthopsilosis</i>			0		11	11			0	11	16,7
<i>Candida railenensis</i>		4	4			0			0	4	16,7
<i>Candida sojae</i>		3	3			0			0	3	16,7
<i>Candida sp.</i>	5	16	21	12	26	38	5	4	9	68	100
<i>Candida tetrigidarum</i>	3	4	7	4	7	11	5	1	6	24	100
<i>Candida tropicalis</i>	1	2	3		13	13	1	4	5	21	83,3
<i>Cryptococcus flavescens</i>		2	2			0			0	2	16,7
<i>Cryptococcus humicola</i>			0		5	5			0	5	16,7
<i>Cryptococcus laurentii</i>			0	18		18			0	18	16,7
<i>Debaromyces hansenii</i>			0		1	1			0	1	16,7
<i>Kazachstania exigua</i>			0			0		2	2	2	16,7
<i>Kodamaea ohmeri</i>			0		1	1			0	1	16,7
<i>Lindnera saturnus</i>			0		19	19			0	19	16,7
<i>Pichia kudriavzevii</i>			0	2		2			0	2	16,7
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>			0		3	3			0	3	16,7
<i>S. pseudopolymorphus</i>			0		5	5			0	5	16,7
<i>Schwanniomyces sp.</i>			0		17	17			0	17	16,7
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>			0		10	10			0	10	16,7
<i>Torulaspora globosa</i>			0			0	6	27	33	33	33,3
<i>Torulaspora maleeae</i>		8	8			0			0	8	16,7
<i>Trichosporon loubieri</i>			0		1	1			0	1	16,7
Total Abundance	31	39	70	37	121	158	32	47	79	307	
Richness (S)	6	7	10	4	14	17	6	8	8	25	

(A=abundance, TA=total abundance, TF=total frequency)

The species richness, dominance, evenness and the Shannon diversity index and Simpson's index for different regions during both seasons (dry and rainy) were evaluated. The dry season was the period of time with highest species richness (S). With respect to regional differences, the Passos region demonstrated the greatest degree of species richness (fourteen species). This was followed by Arcos and Lamps, in which isolates varied from five to eight species (Table 5).

Table 5 Richness and diversity indices of yeasts isolated from the Brazilian Cerrado for region and season

Diversity indexes	Sampling sites					
	Arcos		Passos		Luminárias	
	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry
Richness (S)	6	7	5	14	6	8
Individuals	31	39	37	121	32	47
Dominance	0.27	0.24	0.36	0.12	0.28	0.36
Simpson (1-D)	0.73	0.76	0.64	0.88	0.72	0.64
Shannon (H)	1.47	1.66	1.21	2.27	1.47	1.45
Equitability (J)	0.82	0.85	0.75	0.86	0.82	0.70

The Passos region in the dry season showed the highest Shannon and Simpson indexes, indicating greater diversity in this region. In all regions, the dominant points were equal to 1. This means there is one dominant taxon within the ecosystem (Table 5).

The values of equitability (J) refer to the distribution pattern of the individual's number among species. The J values ranged from 0.70 to 0.86, with the lowest value found in Luminárias during the dry season, and the highest values corresponded to the Arcos and Passos regions, also during the dry season (Table 5).

The results of Canonical Correspondence Analysis (CCA) (Figure 4) of the yeast species isolated from the three regions in the rainy season showed that *C. glabatra*, *P. kudriavzevii*, *Candida sp.*, *C. tetrigarum*, *C. tropicalis* and *T. globosa* are associated with high values of SB (base sum), K, and Ca. The *Candida labiduridarum* and *C. neerlandica* were associated with OM, P, t, T, Al, H + Al,

Mg and m. *Cryptococcus laurentii* was isolated only in PAr-E and is not associated with any specific characteristic of the soil.

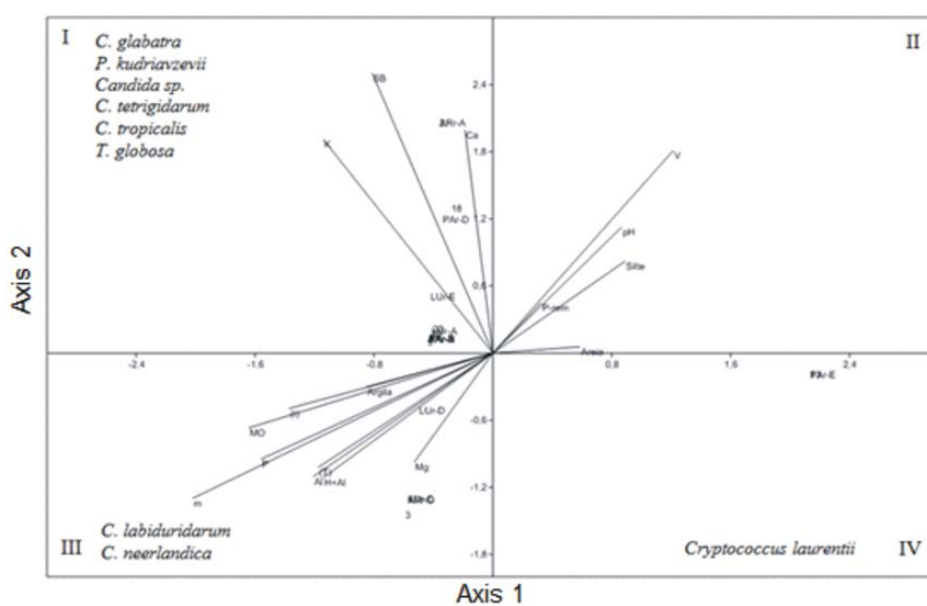


Figure 4 Canonical correspondence analysis (CCA) of species of soil yeasts of regions Arcos (AR), Passos (PA) and Luminárias (LU) during season rainy (r). 2-*Candida glabrata*; 3-*C. labiduridarum*; 4-*C. neerlandica*; 8-*Candida* sp.; 9-*C. tetrigidarum*; 10-*C. tropicalis*; 13-*Cryptococcus laurentii*; 18-*Pichia kudriavzevii*; 23-*Torulaspota globosa*

In the dry season (Figure 5), the parameters V, Mg and P-rem correspond with the yeast *C. humicola*, *D. hansenii* and *L. saturnus*. The species *K. ohmeri*, *S. polymorphus*, *S. pseudopolymorphus*, *Schwanniomyces* sp., and *S. vanrijae* were not associated with any particular chemical characteristic of the soil, but all of them were isolated in soils with high levels of silt. High aluminum concentrations and potential acidity associated with other factors correspond with 13 species of yeasts (*C. frijolensis*, *C. neerlandica*, *C. orthopsilosis*, *C. railenensis*, *C. sojiae*, *Candida*

sp., *C. tetrigidarum*, *C. tropicalis*, *C. flavescens*, *K. exigua*, *T. globosa*, *T. maleeae* and *T. loubieri*). Approximately 90% of *Candida* species were isolated in soils that had high levels of aluminum and potential acidity, suggesting that these species are tolerant to these factors. In addition to the influence of the chemical and physical characteristics of the soil, the growth and survival of a particular yeast species in a given soil sample may not depend solely on the intrinsic abilities of the yeast but rather result from the cumulative interactions within the soil microbial community (Martini 1992, Botha 2011).

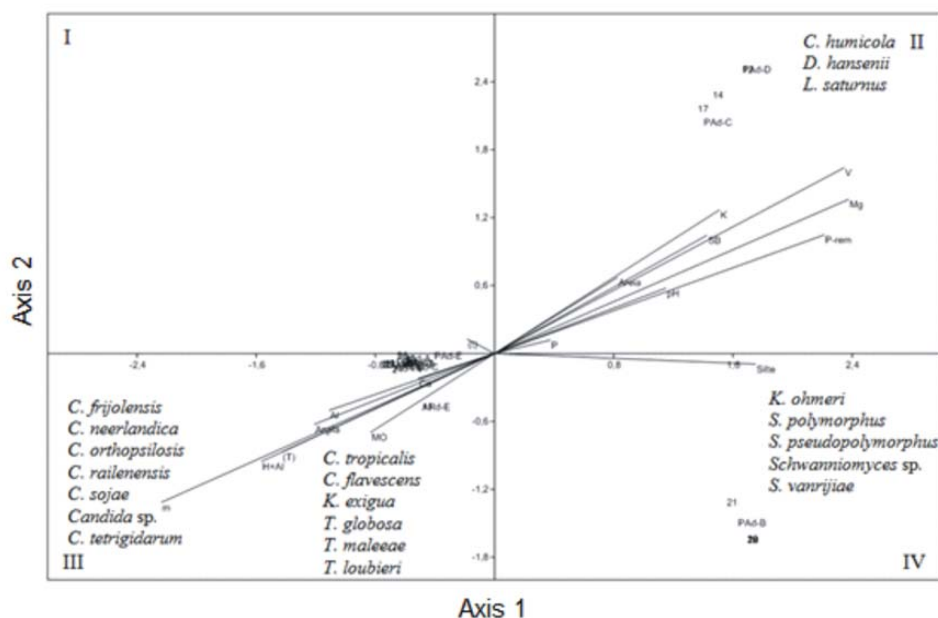


Figure 5 Canonical correspondence analysis (CCA) of species of soil yeasts of regions Arcos (AR), Passos (PA) and Luminárias (LU) during season dry (d). 1-*Candida frijolensis*; 2-*C. glabrata*; 4-*C. neerlandica*; 5-*C. orthopsilosis*; 6-*C. railenensis*; 7-*C. sojae*; 8-*Candida sp.*; 9-*C. tetrigidarum*; 10-*C. tropicalis*; 11-*C. flavescens*; 12-*Cryptococcus humicola*; 14-*Debaromyces hansenii*; 15-*Kazachistania exigua*; 16-*Kodamaea ohmeri*; 17-*Lindnera saturnus*; 19-*Schwanniomyces polymorphus*; 20-*S. pseudopolymorphus*; 21-*Schwanniomyces sp.*; 22-*S. vanrijae*; 23-*Torulaspora globosa*; 24-*T. maleeae*; 25-*Trichosporon loubieri*

Enzymatic profile of yeasts

The API ZYM® system was employed to characterize the extracellular enzymatic activities of the different genera of yeast isolated from Brazilian Cerrado soil of Minas Gerais State (Table 6). The results demonstrate differences in the extracellular enzymes produced by the different species evaluated. In addition, some isolates belonging to the same species showed different enzymatic profiles.

All isolates showed some esterase activity. The isolates that produced esterase and esterase lipase enzymes with relatively high intensity (4-5) were 22% and 6%, respectively. *Candida* sp., *C. neerlandica*, *C. tetragidarum*, *C. humicola*, *K. exigua*, *P. kudriavezevii*, *S. pseudopolymorphus*, *S. vanrijae* and *T. loubieri* showed the greatest amount of esterase activity. The highest esterase lipase activity was obtained by the *C. orthopsilosis* and *C. laurentii* isolates.

The proportion of isolates exhibiting high glycosyl hydrolase enzyme activity was 2.0% (α -galactosidase), 6.1% (β -galactosidase), 30.6% (α -glucosidase), 16.3% (β -glucosidase) and 20.4% (N-acetyl- β -glucosamidase). No isolate was able to produce the enzymes β -glucuronidase, α -mannosidase or α -fucosidase. The cerrado soil isolates with the most prolific production of enzymes were *S. vanrijae* (α -galactosidase), *C. laurentii* (β -galactosidase), *C. labiduridarum*, *C. neerlandica*, *C. orthopsilosis*, *C. sojae*, *C. tropicalis*, *S. polymorphus*, *S. pseudopolymorphus*, *S. vanrijae* and *T. globosa* (α -glucosidase), *C. laurentii*, *L. saturnus*, *S. polymorphus* and *S. pseudopolymorphus* (β -glucosidase), *C. frijolensis*, *C. neerlandica*, *C. tropicalis*, *Candida* sp. and *T. globosa* (N-acetyl- β -glucosamidase).

Table 6 Comparison of enzymatic activities of yeasts strains determined by the API ZYM®

Species	Code	Enzymes																		
		Alkaline phosphatase	Esterase (C 4)	Esterase Lipase (C 8)	Lipase (C 14)	Leucine arylamidase	Valine arylamidase	Cystine arylamidase	Trypsin	α -chymotrypsin	Acidic phosphatase	Naphthyl-AS-BI-phosphohydrolase	α -galactosidase	β -galactosidase	β -glucuronidase	α -glucosidase	β -glucosidase	N-acetyl- β -glucosaminidase	α -mannosidase	α -fucosidase
<i>Candida frijolensis</i>	UFLA CES-Y 816	1	3	3	0	5	3	2	0	0	3	2	0	0	0	1	0	5	0	0
	UFLA CES-Y 818	1	3	3	0	5	3	2	0	0	3	2	0	0	0	1	0	5	0	0
<i>Candida glabrata</i>	UFLA CES-Y 557	1	2	3	0	5	3	2	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFLA CES-Y 566	1	2	3	0	5	3	2	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida labiduridarum</i>	UFLA CES-Y 558	1	2	3	0	5	3	2	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFLA CES-Y 590	2	3	3	1	5	3	2	0	0	3	1	0	0	0	5	2	0	0	0
<i>Candida neerlandica</i>	UFLA CES-Y 580	1	2	3	0	5	3	2	1	0	2	2	0	0	0	4	1	1	0	1
	UFLA CES-Y 284	2	4	3	1	5	3	1	0	0	4	1	0	1	0	2	0	5	0	0
	UFLA CES-Y 707	1	2	3	0	5	3	2	1	0	2	2	0	0	0	4	1	1	0	1
	UFLA CES-Y 708	1	2	3	0	5	3	2	1	0	2	2	0	0	0	4	1	1	0	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	UFLA CES-Y 606	2	2	4	1	5	4	2	0	0	5	1	0	0	0	4	0	0	0	0
	UFLA CES-Y 614	2	2	4	1	5	4	2	0	0	5	1	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Candida railenensis</i>	UFLA CES-Y 758	2	2	3	1	5	3	2	0	0	4	1	0	0	0	2	3	1	0	0
	UFLA CES-Y 759	2	2	3	1	5	3	2	0	0	4	1	0	0	0	2	3	1	0	0
<i>Candida sojae</i>	UFLA CES-Y 781	1	3	3	1	5	4	1	0	0	1	1	0	0	0	5	3	0	0	0
	UFLA CES-Y 784	1	3	3	1	5	4	1	0	0	1	1	0	0	0	5	3	0	0	0
<i>Candida tetragidarum</i>	UFLA CES-Y 68	1	4	3	1	5	3	2	0	0	4	1	0	0	0	3	1	5	0	1
	UFLA CES-Y 289	1	4	3	1	5	3	2	0	0	4	1	0	0	0	3	1	5	0	1

Table 6, continuation

Species	Code	Enzymes																		
		Alkaline phosphatase	Esterase (C 4)	Esterase Lipase (C 8)	Lipase (C 14)	Leucine arylamidase	Valine arylamidase	Cystine arylamidase	Trypsin	α -chymotrypsin	Acidic phosphatase	Naphthyl-AS-BI-phosphohydrolase	α -galactosidase	β -galactosidase	β -glucuronidase	α -glucosidase	β -glucosidase	N-acetyl- β -glucosaminidase	α -mannosidase	α -fucosidase
<i>Candida tropicalis</i>	UFLA CES-Y	1	3	2	0	5	3	2	0	0	2	2	0	0	5	3	0	1	0	
	UFLA CES-Y	1	3	3	0	5	3	2	1	0	4	2	0	0	4	0	5	0	0	
	UFLA CES-Y	1	3	3	0	5	3	2	1	0	4	2	0	0	4	0	5	0	0	
<i>Candida</i> sp.	UFLA CES-Y	1	4	3	1	5	3	2	0	0	4	1	0	0	3	1	5	0	1	
	UFLA CES-Y	2	2	3	1	5	3	2	0	0	4	1	0	0	2	3	5	0	0	
	UFLA CES-Y	1	3	3	1	5	4	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cryptococcus flavescens</i>	UFLA CES-Y	1	3	2	0	5	1	0	0	0	5	1	0	0	0	1	0	0	0	
<i>Cryptococcus humicola</i>	UFLA CES-Y	1	2	2	1	5	4	2	1	0	5	3	0	0	1	0	0	0	0	
	UFLA CES-Y	1	4	3	1	5	1	1	1	0	3	2	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Cryptococcus laurentii</i>	UFLA CES-Y	2	3	4	1	5	3	1	0	0	5	5	1	5	0	2	4	0	0	0
	UFLA CES-Y	1	2	3	1	5	3	2	0	0	5	2	0	5	0	1	4	0	0	0
	UFLA CES-Y	1	2	3	1	5	3	2	0	0	5	2	0	5	0	1	4	0	0	0
<i>Debaromyces hansenii</i>	UFLA CES-Y	2	3	3	1	5	3	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kazachstania exigua</i>	UFLA CES-Y	1	2	2	1	5	3	1	1	0	2	1	0	0	0	0	1	0	1	1
	UFLA CES-Y	1	4	3	1	5	4	3	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kodamaea ohmeri</i>	UFLA CES-Y	2	3	3	0	5	2	1	0	0	5	2	0	0	2	1	0	0	0	0

Table 6, conclusion

Species	Code	Enzymes																		
		Alkaline phosphatase	Esterase (C 4)	Esterase Lipase (C 8)	Lipase (C 14)	Leucine arylamidase	Valine arylamidase	Cystine arylamidase	Trypsin	α -chymotrypsin	Acidic phosphatase	Naphthyl-AS-BI-phosphohydrolase	α -galactosidase	β -galactosidase	β -glucuronidase	α -glucosidase	β -glucosidase	N-acetyl- β -glucosaminidase	α -mannosidase	α -fucosidase
<i>Lindnera saturnus</i>	UFLA CES-Y 676	0	2	2	1	5	4	3	0	0	2	3	0	0	0	1	5	0	0	0
	UFLA CES-Y 681	0	2	2	1	5	4	3	0	0	2	3	0	0	0	1	5	0	0	0
<i>Pichia kudriavzevii</i>	UFLA CES-Y 667	0	2	2	1	5	4	3	0	0	2	3	0	0	0	1	5	0	0	0
	UFLA CES-Y 542	0	4	3	1	5	4	3	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	UFLA CES-Y 543	0	4	3	1	5	4	3	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFLA CES-Y 652	2	2	3	1	5	3	1	0	0	5	1	0	0	0	5	4	1	0	0
<i>S. pseudopolymorphus</i>	UFLA CES-Y 632	2	4	3	1	5	3	1	0	0	5	3	1	0	0	5	4	1	0	0
<i>Schwanniomyces vanrijiiae</i>	UFLA CES-Y 657	4	4	3	1	5	3	2	0	1	5	4	4	0	0	5	0	0	0	0
<i>Torulaspota globosa</i>	UFLA CES-Y 64	2	1	2	1	5	4	2	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFLA CES-Y 817	2	1	2	1	5	4	2	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Torulaspota malleae</i>	UFLA CES-Y 61	1	3	3	1	5	3	2	0	0	3	1	0	0	0	4	0	5	0	0
	UFLA CES-Y 775	1	3	2	1	5	3	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	UFLA CES-Y 782	1	3	2	1	5	3	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Trichosporon loubieri</i>	UFLA CES-Y 771	1	3	2	1	5	3	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	UFLA CES-Y 631	2	4	3	0	5	2	1	0	0	5	2	0	0	0	2	2	2	0	0
No activity (0)		5	0	0	14	0	0	1	41	48	0	0	46	45	49	15	24	27	48	42
Low intensity (1)		28	2	0	35	0	2	12	8	1	6	24	2	1	0	9	9	11	1	7
Medium intensity (2-3)		15	36	46	0	0	33	36	0	0	17	23	0	0	0	10	8	1	0	0
High intensity (4-5)		1	11	3	0	49	14	0	0	0	26	2	1	3	0	15	8	10	0	0

All isolates showed high leucine arylamidase activity, being this enzyme a good measure of the proteolytic activity of microorganisms. This enzyme catalyze the cleavage of leucine and other hydrophobic amino acids from the amino terminus of protein or peptide substrates (Flores et al., 2000). The best producers of valine arylamidase were *Candida* sp., *C. orthopsilosis*, *C. sojae*, *C. humicola*, *K. exigua*, *L. saturnus* and *T. globosa*, corresponding at 28,6% of isolates. The proportion of isolates that produced highly active alkaline phosphatase, acidic phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (phosphatases), were 2%, 53% and 4.1%, respectively. The organisms that demonstrated a great amount of enzyme activity were as follows: *S. vanriijiae* (alkaline phosphatase), *C. glabatra*, *C. neerlandica*, *C. orthopsilosis*, *C. railenensis*, *C. tetrigidarum*, *Candida tropicalis*, *Candida* sp., *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodamaea ohmeri*, *Schwanniomyces polymorphus*, *Schwanniomyces pseudopolymorphus*, *Schwanniomyces vanriijiae*, *Torulaspora globosa* and *Trichosporon loubieri* (acidic phosphatase), and *Cryptococcus laurentii* and *Schwanniomyces vanriijiae* (naphthol-AS-BI-phosphohydrolase).

We did not isolate any producers of lipase, β -glucuronidase, α -mannosidase, α -fucosidase, trypsin, α -chymotrypsin, or cysteine arylamidase with medium or high intensity. The *S. vanriijiae* yeast produced the most enzymes with the greatest activities, including esterase, leucine arylamidase, acidic phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, and α -glucosidase. *S. vanriijiae* was the only producer of alkaline phosphatase and α -galactosidase. Only *S. vanriijiae* (CES UFLA Y-657) and *C. laurentii* (CES UFLA 519) demonstrated significant naphthol-AS-BI-phosphohydrolase production.

The *Cryptococcus* genera, the third most abundantly isolated genus in this work, showed high production of various enzymes, including β -glucosidase and β -galactosidase. The β -glucosidase enzymes associated with other complex

carbohydrates may be potentially useful in the food industry, biofuel production, and textile production, among others (Dhillon et al. 2012, Lavenson et al. 2012). *C. laurentii* UFLA CES 519, UFLA CES 523 and UFLA CES 526 were the only isolates that produced β -galactosidase with high activity. This enzyme is used in the hydrolysis of lactose, and it is commercially produced by *Kluyveromyces lactis* (Romo-Sánchez et al. 2010).

The Cerrado yeasts showed differences in the enzyme profiles for isolates of the same species. Therefore, it may be possible that yeast species isolated from tropical regions vary somewhat from those described in the literature (Dhillon et al. 2012, Lavenson et al. 2012).

Extracellular screening for cellulase and xylanase enzymes

Of the 307 yeasts evaluated, 18 (5.8%) isolates were positive for cellulase and xylanase, and six (1.9%) were positive for xylanase only (*data not shown*). These isolates were identified as *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus humicola* and *Candida neerlandica*. *C. laurentii* was isolated during the rainy season in the Passos region and produces the enzymes cellulase and xylanase. Other isolates produce xylanase exclusively, including *C. humicola* and *C. neerlandica*, which were isolated from Passos, along with *C. flavescens* isolated from Arcos during the dry season. Parachin et al. (2009) isolated *Cryptococcus flavus* from leaves and flowers of the Brazilian Cerrado, which exhibits amylase, carboxymethyl cellulase and xylanase activities. Cellulases can be used for the improved processing of cellulosic fibers, in stone washing, as detergent additives and as biofuel and waste treatments (Dhillon et al. 2012). Xylanases have many applications in paper production, in fermentation and in food industries, as well as in waste treatment (Parachin et al. 2009).

Conclusions

To our knowledge, our study is the first that describes the isolation of specific yeast strains from Brazilian Cerrado soil ecosystems. In addition, we have demonstrated their ability to produce enzymes of industrial interest. Characterization of this resource may also contribute to the development of a microbial database, providing data on the properties and enzyme characteristics of yeast isolates for potential industrial and technological applications.

Perspectives

This study highlights the ability of Cerrado soil yeasts to produce enzymes that show potential for industrial applications. The yeast isolates that are the best at producing selected enzymes are being tested for scale-up production on different substrates.

Acknowledgements

The Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Brasil (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) are acknowledged for financial support and a scholarship grant.

References

- Bitar YOC, Pinheiro LPC, Abe PS, Santos-Costa MC (2012) Species composition and reproductive modes of anurans from a transitional Amazonian forest. *Brazil Zoo* 29:19–26
- Botha A (2011) The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol Bioch* 43:1-8
- Bresolin JD, Bustamante MMC, Krüger RH, Silva MRSS, Perez KS (2010) Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian J Microbiol* 41:391-403
- Bustamante MMC, Brito DQ, Kozovits AR, Luedemann G, Mello TRB, Pinto AS, Munhoz CB R, Takahashi FSC (2012) Effects of nutriente additions on plant biomass and diversity of the herbaceous *subs shrub layer* of a Brazilian savanna (Cerrado). *Plant Ecol* 213:795–808
- Castro AP, Quirino BF, Kurokawa AS, Neto EL, Krüger RH (2008) Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture Welds. *Arch Microbiol* 190:129–139
- Dhillon GS, Kaura S, Brara SK, Vermac M (2012) Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind Crop Prod* 38:6– 13
- Embrapa (1997) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Métodos de Análise de Solos, 2ed. Rio de Janeiro, pp 212
- Flores M, Marina M, Toldra F (2000). Purification and characterization of soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Meat Science*, 56, 247–254
- FOOD DRUGS ADMINISTRATION (1998) Bacteriological Analytical Manual 8. ed. Washington: AOAC International

- Furley PA (1999) The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian Cerrados. *Glob Ecol Biog* 8:223–241
- Gareth-Jones EB, Ka-Lai P (2012) Tropical aquatic fungi. *Biodivers Conserv* 21:2403-2423
- Hammer, PAST: Paleontological. Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9
- Lavenson DM, Tozzia EJ, Karuna N, Jeoh T, Powella RL, McCarthy M (2012) The effect of mixing on the liquefaction and saccharification of cellulosic fibers. *Biores Technol* 111:240–247
- Lopes AS, Cox FR (1997) A survey of the fertility status of surfasse soils under Cerrado vegetation in Brazil. *Soil Sci Soc Am J* 41:741-747
- Loureiro STA, Cavalcanti MAQ, Neves RP, Passavante JZO (2005) Yeasts isolated from sandandsea water in beachesof Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Braz J Microbiol* 36:333-337.
- Martini A (1992) Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodivers Conserv* 1:324-333
- Mok WY, Luizão RC, da Silva MSB, Teixeira MF, Muniz EG (1984) Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. *Appl Environ Microbiol* 47:390-394
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858
- Nascimento CA, Gomes EPC, Souza JI, Pires-Zottarelli CL (2012) Zoosporig true fungi and heterotrophic straminipiles assemblages from soil of Brazilian Cerrado areas. *Fung Ecol* 5:31-41
- Parachin NS, Siqueira S, de Faria FP, Torres FAG, Moraes LMP (2009). Xylanase from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59:52-57
- Ramos CL, Almeida EG, Pereira GVM, Cardoso P G, Dias ES, Schwan RF (2010) Determination of dynamic characteristics of microbiota in a

fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *Inter J Food Microbiol* 140:225-231

Romo-Sánchez S, Alves-Baffi M, Arévalo-Villena M, Úbeda-Iranzo J, Briones-Péres A (2010) Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. *Food Microbiol* 27:487-492

Vishniac HS (2006) A Multivariate Analysis of Soil Yeasts Isolated from a Latitudinal Gradient. *Microb Ecol* 52:90–103

Vital MJS, Abranches J, Hagler AN, Mendonça-Hagler LC (2002) Mycotoxigenic yeasts isolated from Amazon soils of Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. *Braz J Microbiol* 33:230-235

ARTIGO 2

**Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por leveduras utilizando
resíduos agrícolas como substrato indutor**

RESUMO

A produção industrial de enzimas é geralmente limitada pelo custo do substrato utilizado para cultivo dos microrganismos. Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de resíduos agroindustriais facilmente disponíveis devem ser exploradas, além de avanços tecnológicos e busca por novos microrganismos. O cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país em área, ocupando aproximadamente 23,92% do território nacional. A diversidade dos microrganismos presentes neste solo é pouco conhecida, sendo um ambiente potencial para bioprospeção de novos produtores de enzimas. Nestes solos existe uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e leveduras, sendo que poucos estudos têm sido realizado na prospecção de leveduras nativas deste ambiente. Neste contexto, este trabalho descreve o isolamento e seleção de leveduras celulolíticas e xilanolíticas isolados do Cerrado brasileiro e a produção destas enzimas quando cultivadas em diferentes resíduos agro-industriais. Dos 307 isolados avaliados para produção de enzimas no teste semiquantitativo em placas, 17 (5.5 %) foram positivos para celulase e xilanase e seis (1.9%) foram positivos somente para xilanase. Destes isolados positivos, selecionou-se *Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519), *C. flavescens* (UFLA CES 735), *C. humicola* (UFLA CES 683) e *Candida neerlandica* (UFLA CES 707) para cultivo em substratos lignocelulósicos. Bagaço de cana, palha de cana, sabugo de milho, palha de milho, farelo de trigo e casca de cacau foram os resíduos utilizados e comparados em relação a substratos puros (CMC e xilana beech wood) para a produção de enzimas do complexo celulolítico (FPase, endoglucanase, β -glicosidase) e xilanolítico (xilanase e β -xilosidase). A levedura *Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519) foi a espécie que se destacou na produção de β -glicosidase com melhor resposta em atividade específica constatada nos resíduos bagaço de cana (0,983 UI μg proteína⁻¹ mL⁻¹) e palha de milho (0,919 UI μg proteína⁻¹ mL⁻¹). A maior produção de xilanase (0,494 UI μg proteína⁻¹ mL⁻¹) utilizando resíduo foi detectada para esta mesma espécie em bagaço de cana. Nosso estudo é o primeiro a descrever leveduras isoladas do ecossistema do Cerrado brasileiro e demonstrar sua capacidade de produzir enzimas em resíduos agroindustriais que possam ser de potencial interesse industrial.

Palavras-chave: Enzimas. Celulase. Xilanase. Leveduras. Solos.

ABSTRACT

The industrial production of enzymes is generally limited by the cost of the substrate used for cultivation of microorganisms. To become the most competitive enzyme production, the use of agro-industrial wastes readily available should be explored, in addition to technological advances and search for new microorganisms. The Brazilian Cerrado biome is the second largest in the country in area, occupying approximately 23.92% of the national territory. The diversity of microorganisms found in this soil is poorly understood, being a potential environment for bioprospection of new enzyme producers. In these soils there are a great diversity of microorganisms, including fungi, bacteria and yeasts, and few studies have been conducted in this prospection for native yeasts in this environment. In this context, this paper describes the isolation and selection of cellulolytic yeasts and xylanolytic isolated from the Brazilian Cerrado and the production of these enzymes when grown in different agro-industrial residues. From a total of 307 isolates evaluated for the production of enzymes in semiquantitative assay plates, 17 (5.5%) were positive for cellulase and xylanase and 6 (1.9%) were positive only for xylanase. From these positive isolates, *Cryptococcus laurentii* (CES UFLA 519), *C. flavescens* (CES UFLA 735), *C. humicola* (CES UFLA 683) and *Candida neerlandica* (CES UFLA 707) were selected for cultivation on lignocellulosic substrates. Sugarcane bagasse, sugarcane straw, corn cobs, corn straw, wheat bran and cocoa shell were the lignocellulosic residues used and compared in relation to pure substrates (beech wood xylan and CMC) for the production of cellulolytic (FPase, endoglucanase, β -glucosidase) and xylanolytic (xylanase and β -xylosidase) enzyme complex. The *Cryptococcus laurentii* yeast (CES UFLA 519) was the species that excelled in the production of β -glucosidase with the best response in specific activity observed in the waste bagasse ($0.983 \text{ IU mg protein}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) and corn stover ($0.919 \text{ IU mL}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$). The higher production of xylanase ($0.494 \text{ IU mg protein}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) using residue was detected for that species in sugarcane bagasse. Our study is the first to describe yeasts isolated from the Brazilian Cerrado ecosystem and demonstrates their ability to produce enzymes that may be of potential industrial interest.

Keywords: Enzymes. Cellulase. Xylanase. Yeasts. Soils.

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos da agricultura e da indústria de alimentos vêm aumentando com o desenvolvimento econômico. A disposição incorreta destes resíduos agrícolas pode causar sérios problemas ambientais. Os resíduos agroindustriais mais disponíveis incluem palhas, cascas, caules, hastes, bagaços e farelos, os quais podem ser originados de cereais (arroz, trigo, milho, sorgo), legumes (feijão, soja), frutas (tomate, banana, manga, coco), além de madeiras decíduas e coníferas, café, cacau, algodão, amendoim, juta e resíduos da indústria de polpa e papel (JAYAPAL et al., 2013; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; SAHA, 2003;). De modo geral, estes resíduos apresentam elevado potencial de energia, visto que contêm até 70% de carboidratos, como celulose e hemicelulose, em sua composição. Avanços em biotecnologia industrial oferecem oportunidades em potencial para o aproveitamento econômico por meio da conversão em diversos produtos com maior valor agregado, como, por exemplo, etanol, proteína de organismos unicelulares, cultivo de cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos, entre outros (VANDAMME, 2009). Dentre estes, as enzimas de origem microbiana vêm ganhando destaque, haja vista sua ampla aplicação numa variedade de processos.

A produção industrial das enzimas microbianas envolve os processos de fermentação submersa ou sólida para o cultivo do microrganismo. A fermentação submersa é tradicionalmente utilizada para a produção de enzimas, pois há melhor controle de parâmetros importantes do processo, como pH e crescimento celular, além de ser facilitada a recuperação de enzimas extracelulares (LIAO et al., 2012; HOLKER; LENZ, 2005). No processo de fermentação sólida, os microrganismos crescem em substrato úmido, mas na ausência de água livre. Uma das principais vantagens desta fermentação é o baixo custo, pois os substratos utilizados podem ser resíduos agrícolas sem pré-

tratamento. Entretanto, a umidade do substrato deve garantir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos (DELABONA et al., 2013; PANDEY.; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Uma das principais classes de enzimas descritas na literatura para aplicações em diferentes processos biotecnológicos são as celulasas e as xilanases, que ocupam posição de destaque entre as enzimas hidrolíticas extracelulares (SHAFIQUE et al., 2004; SUKUMARAN, 2009). As enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico possuem ampla aplicação industrial em processos de fabricação de papel, alimentação animal, indústria de alimentos e produção de bioetanol, pela conversão de resíduos lignocelulósicos, entre outros. As celulasas são classificadas, de acordo com o sítio de atuação na celulose, em dois grupos: endoglucanases e exoglucanases/celobio-hidrolases. As hemiceluloses mais relevantes são xilanas e glicomananas, com xilanas sendo as mais abundantes. As principais enzimas requeridas para sua hidrólise são endoxilanase e β -xilosidase (SUKUMARAN, 2009; SAHA, 2003; BOM; GIRIO; PEREIRA JR., 2008).

A produção industrial de enzimas é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para cultivo dos microrganismos. Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de baixo custo e facilmente disponíveis deve ser explorada, além de avanços tecnológicos e busca por novos microrganismos (DELABONA et al., 2012; SUKUMARAN, 2009; POLIZELLI et al., 2005; TENDERDY; SZAKACS, 2003).

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país em área, superado apenas pela Floresta Amazônica, ocupando, aproximadamente, 23,92% do território nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2010). A diversidade dos microrganismos presentes neste solo é pouco conhecida, sendo um ambiente potencial para a bioprospeção de novos produtores de enzimas. Nestes solos existe grande diversidade de

microrganismos, incluindo fungos, bactérias e leveduras, e poucos estudos têm sido realizados na prospecção de leveduras nativas desse ambiente (DA VINHA et al., 2011; MOREIRA et al., 2008; SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

Neste contexto, a busca por novas espécies de leveduras nativas do solo é importante para a caracterização e a preservação de espécies, principalmente aquelas com potencial para aplicação biotecnológica. Em adição, a utilização de substratos alternativos e de baixo custo é promissora para a produção industrial de enzimas.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar leveduras do solo do cerrado nativo de Minas Gerais e avaliar o potencial celulolítico e xilanolítico desses isolados, utilizando diferentes resíduos agroindustriais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem de solo

A amostragem de solo foi realizada no cerrado de Minas Gerais, nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias, nos meses de janeiro (elevada pluviosidade) e agosto (estação seca), no ano de 2010 (Figura 1). Foram coletadas cinco amostras compostas (A, B, C, D e E) por município, com coordenadas variando de 20° 14' S a 21° 37' S e 44° 58' W a 46° 30' W. Cada amostra composta foi constituída por 12 subamostras simples, coletadas à profundidade de 0-20 cm. Para cada ponto de amostragem, as subamostras foram coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do centro. As amostras de solo foram extraídas com o auxílio de um trado previamente flambado, acondicionadas em sacos plásticos estéreis, transportadas ao laboratório e armazenadas, a 4 °C, para posterior utilização (MOREIRA et al., 2009).

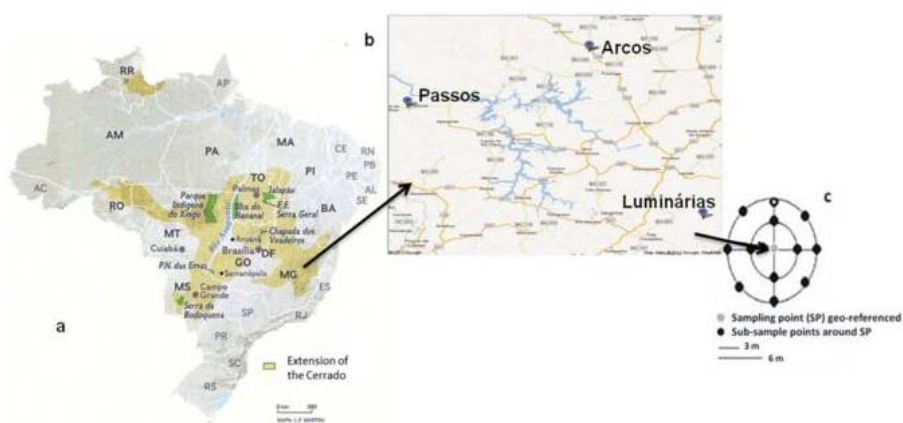


Figura 1 Localização geográfica e descrição dos pontos de amostragem no cerrado de Minas Gerais

2.2 Isolamento e identificação

As leveduras foram isoladas após o enriquecimento de 10 g da amostra de solo em 90 mL de meio YEPG contendo 2% glicose, 2% peptona e 1% extrato de levedura. Os frascos foram sonicados por 2 minutos e incubados, a 28 °C, por 2 a 7 dias, em agitador rotativo (130 rpm). Após o período de incubação, diluições seriadas das suspensões foram plaqueadas em YEPG pH 3,5, para prevenir o crescimento bacteriano.

As placas foram incubadas em aerobiose, a 28 °C, por 24 a 72 horas. O número de isolados selecionados para a purificação foi determinado pela raiz quadrada do número total de colônias com características morfológicas diferentes. Estes isolados foram purificados por meio de estrias em YEPG pH 3,5.

O sequenciamento da região ITS foi empregado para a identificação de leveduras, usando a metodologia descrita por Ramos et al. (2010). Os isolados foram mantidos a -80 °C, em meio YEPG contendo 20% de glicerol na coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos, no Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.3 Padronização do inóculo

O inóculo de cada isolado foi preparado em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPG. As leveduras foram incubadas, a 28 °C, por 48 horas, sob 125 rpm de agitação orbital. O meio de cultivo foi centrifugado e as células obtidas foram resuspendidas em água e centrifugadas. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Após a segunda lavagem das células em água, estas foram resuspendidas em meio nitrogênio levedura base (0,67%) e homogeneizadas para a contagem do número de células em câmara de

Newbauer. A padronização do inóculo foi realizada para as etapas de seleção de leveduras produtoras de celulases e xilanase e para a produção de enzimas em substratos lignocelulósicos.

2.4 Seleção de leveduras produtoras de celulases e xilanases

A atividade celulolítica e xilanolítica de 307 leveduras foi realizada em placas contendo meio ágar CMC (0,2% carboximetilcelulose, 0,2% NaNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% KCl, 0,02% peptona e 1,7% ágar) e ágar xilana (0,67% nitrogênio levedura base, 1% xilana de madeira de faia e 1,8% ágar) (Merck, SP, Brasil), respectivamente. As placas foram inoculadas com alíquotas de 10 µL de cada isolado padronizado a 10⁷ células/mL e incubadas, a 28 °C, por 48 horas (CMC) e 15 dias (ágar xilana). Após o período de incubação, as placas foram inundadas com solução de iodo (2,0 g KI e 1,0 g iodo, em 300 mL água destilada), por 3 a 5 minutos, para identificar isolados produtores de enzimas (KASANA et al. 2008). Os resultados positivos foram baseados na formação de halo claro ao redor das colônias.

A atividade enzimática qualitativa foi estratificada por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como índice enzimático de atividade (IE).

2.5 Avaliação de diferentes resíduos lignocelulósicos na produção de enzimas

Bagaço de cana, palha de cana, sabugo de milho, palha de milho, farelo de trigo e casca de cacau foram os resíduos lignocelulósicos utilizados e comparados em relação a substratos puros (CMC e ágar xilana) para a produção

de enzimas do complexo celulolítico (FPase, endoglucanase, β -glicosidase) e xilanolítico (xilanase e β -xilosidase).

O bagaço de cana, a palha de cana, o sabugo de milho e a palha de milho foram obtidos na fazenda da Caçapa, localizada na zona rural de Itirapuã, município de Lavras, MG. O farelo de trigo foi adquirido no comércio local e a casca de cacau proveniente das Fazendas Reunidas Vale do Juliana, Igrapiúna, BA. Os resíduos foram lavados com água, para a remoção de açúcares residuais, secos em estufa com circulação de ar a 60°C e cortados em partículas classificadas em peneiras de 20 mesh. Os resíduos processados foram embalados para posterior utilização.

Foram selecionados quatro isolados de levedura *Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519), *Cryptococcus flavescens* (UFLA CES 735), *Cryptococcus humicola* (UFLA CES 683) e *Candida neerlandica* (UFLA CES 707), que apresentaram resultado positivo no teste em placas para cultivo em diferentes substratos lignocelulósicos.

Todos os isolados foram cultivados em fermentação submersa (SmF) utilizando como fonte de carbono bagaço de cana, palha de cana, sabugo de milho, palha de milho, farelo de trigo, casca de cacau, CMC e xilana. O meio composto por 0,67% nitrogênio levedura base e 2,0% de cada fonte de carbono foi autoclavado, a 121 °C, por 15 minutos e, posteriormente, inoculados com um volume suficiente para obter concentração final de 10^7 células/mL. A produção de enzimas foi conduzida, a 28 °C, por 15 dias, sob 125 rpm de agitação orbital. Amostras foram coletadas e congeladas, após o término do período de incubação, para a determinação da atividade enzimática e do teor de proteínas totais.

2.6 Ensaios enzimáticos

A atividade de celulase em papel de filtro (FPase), endoglucanase (CMCase), β -glicosidase, xilanase e β -xilosidase foi determinada no sobrenadante livre de células, após centrifugação, a 3.600 x g a 4°C, por 10 minutos.

Uma unidade de atividade enzimática (FPU ou UI/mL) dos ensaios de FPase, endoglucanase e xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a obtenção de 1 μ mol de glicose e/ou xilose liberado por minuto. A liberação de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959) foi quantificada espectrofotometricamente, a 540 nm.

A atividade de papel de filtro foi mensurada de acordo com recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), com algumas modificações, por meio da incubação de 500 μ L do sobrenadante enzimático com 1000 μ L de tampão citrato (50 mM, pH 4,8) contendo papel de filtro Whatman nº1 (1 x 6 cm) (Ghose, 1987). Após a incubação a 50 °C, por 60 minutos, a reação foi finalizada com a adição 500 μ L de ácido dinitrosalicílico (DNS).

Nos ensaios para a determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), as reações contendo 250 μ L de solução de CMC 2% em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, com 250 μ L do sobrenadante enzimático foram incubadas, a 50 °C, por 10 minutos. A reação foi finalizada com adição de 500 μ L DNS, segundo metodologia proposta por Ghose (1987), com algumas modificações.

A quantificação de xilanase foi determinada incubando-se 50 μ L do sobrenadante enzimático e 100 μ L de xilana de madeira de faia 1% (em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5), a 50 °C, durante 10 minutos. A reação foi

interrompida adicionando-se 300 μL de DNS modificado por Bailey, Biely e Poutanem (1992).

As atividades de β -glicosidase e β -xilosidase foram determinadas utilizando-se p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) e p-nitrophenyl- β -D-xilopyranoside (PNPX) como substrato, respectivamente. A reação contendo 200 μL de tampão acetato de sódio 50 mM-pH 5, 650 μL de água destilada, 50 μL do sobrenadante enzimático e 100 μL da de PNPG ou PNPX 10 mM foi incubada, a 45 °C, por 10 minutos. A reação foi finalizada adicionando-se 500 μL de Na_2CO_3 1 M e a quantidade de p-nitrofenol foi medida espectofotometricamente, a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a obtenção de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto, sob as condições de ensaio.

Verifica-se, na literatura, uma tendência de utilizar apenas a unidade U/mL para expressar a produção enzimática. No entanto, outras proteínas podem ser liberadas durante o cultivo de microrganismos, sendo estas também detectáveis juntamente com a enzima de interesse. Neste caso, corre-se o risco de subestimar a quantidade de enzima a ser quantificada. Tal risco pode ser minimizado pela quantificação enzimática, em termos de atividade específica, calculada pela razão entre a atividade total (UI/mL) e o teor de proteínas totais presentes na amostra.

Os parâmetros de comparação dos resultados com a literatura ficam comprometidos pela ausência de uma unidade padronizada. Os resultados da atividade enzimática no presente trabalho foram expressos de ambas as formas, possibilitando uma discussão mais abrangente em relação à real atividade enzimática.

2.7 Quantificação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada espectrofotometricamente, a 595 nm, de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

O teor de proteínas na amostra foi calculado subtraindo-se o valor obtido após 15 dias de cultivo do branco de cada substrato lignocelulósico (tempo zero).

2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999), utilizando-se o teste de Skott Knott, a 5% de significância, para comparar o melhor isolado na etapa de seleção de leveduras produtoras de celulase e xilanase.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de leveduras produtoras de celulase e xilanase

Foram isoladas 307 leveduras do solo do cerrado de Minas Gerais durante a estação seca e a chuvosa nas cidades de Passos, Arcos e Luminárias. Todas as leveduras isoladas foram avaliadas em relação à produção de celulase e xilanase, em teste semiquantitativo realizado em placas. Dentre os isolados avaliados, 17 (5,5%) foram positivos para celulase e xilanase e seis (1,9%) foram positivos somente para xilanase. Os resultados positivos foram baseados na formação de halo claro ao redor da colônia (Figura 2).

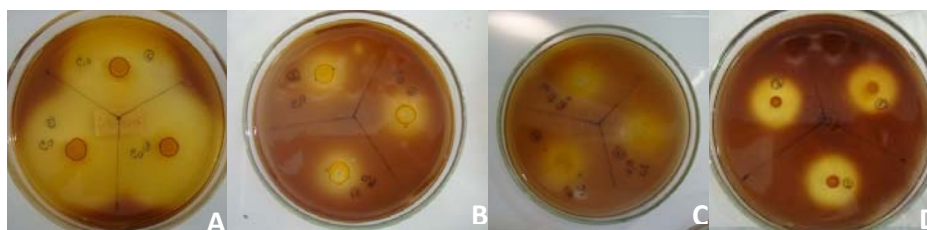


Figura 2 Halo de degradação em meio ágar xilana (A, B e C) e em meio ágar CMC (D). A-*Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519), B-*C. flavescens* (UFLA CES 735), C-*C. humicola* (UFLA CES 683), D-*C. laurentii* (UFLA CES 519)

As 17 leveduras produtoras de celulase e xilanase foram isoladas da estação chuvosa do ponto E da cidade de Passos. Na estação seca, foram encontrados quatro isolados produtores de xilanase, sendo dois pertencentes ao ponto E da região de Passos e os outros aos pontos A e E de Arcos.

Dentre os isolados com atividade celulolítica, 41% apresentaram índices enzimáticos mais elevados, com valores variando entre 3,91 a 4,53. Os outros produtores de celulase (59%) apresentaram índices inferiores a 3,91. Em relação aos produtores de xilanase da estação chuvosa, os isolados UFLA CES 519 e

UFLA CES 547 apresentaram índices enzimáticos superiores, com valores de 6,11 e 5,69, respectivamente. Os isolados da estação seca apresentaram índices enzimáticos inferiores aos obtidos na estação chuvosa, tendo o maior valor de IE obtido sido de 1,72 (Tabela 1 e 2).

Os isolados utilizados para a produção de enzimas em fermentação submersa foram selecionados após análise estatística dos índices enzimáticos. Da estação chuvosa, selecionou-se a levedura UFLA CES 519 (*Cryptococcus laurentii*), que apresentou halos de degradação para celulase e xilanase. Na estação seca, apesar de os índices enzimáticos não serem estatisticamente diferentes, selecionaram-se dois isolados, UFLA CES 707 e UFLA CES 735, por pertencerem a espécies diferentes (*Candida neerlandica* e *Cryptococcus flavescens*).

Além dos três isolados selecionados, foi avaliada a produção de enzimas pela levedura UFLA CES-683 (*Cryptococcus humicola*), por apresentar degradação do meio. Entretanto, não foi possível calcular o índice enzimático desta levedura, devido à localização do halo de degradação abaixo da colônia, diferentemente dos outros isolados.

Tabela 1 Resultado semiquantitativo do teste para a produção enzimática de celulase e xilanase de leveduras isoladas do solo do cerrado mineiro, durante a estação chuvosa

Local de coleta	Isolado	Índice enzimático	
		Celulase	Xilanase
Passos – Ponto E	UFLA CES 519	4,20 ^b	6,11 ^c
	UFLA CES 520	3,33 ^a	4,63 ^a
	UFLA CES 521	4,00 ^b	5,33 ^b
	UFLA CES 522	3,67 ^a	4,85 ^a
	UFLA CES 523	3,67 ^a	5,03 ^b
	UFLA CES 524	3,83 ^a	5,27 ^b
	UFLA CES 525	4,08 ^b	4,58 ^a
	UFLA CES 526	4,02 ^b	5,35 ^b
	UFLA CES 546	4,08 ^b	5,20 ^b
	UFLA CES 547	3,91 ^b	5,69 ^c
	UFLA CES 548	3,69 ^a	4,22 ^a
	UFLA CES 549	3,72 ^a	4,29 ^a
	UFLA CES 550	3,44 ^a	4,85 ^a
	UFLA CES 551	3,72 ^a	5,16 ^b
	UFLA CES 552	3,79 ^a	4,40 ^a
	UFLA CES 553	3,77 ^a	5,10 ^b
UFLA CES 554	4,53 ^b	4,43 ^a	

Índice enzimático (IE) = $\frac{\text{Ø halo}}{\text{Ø Colônia}}$

*Letras iguais na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade

Tabela 2 Resultado semiquantitativo do teste para a produção enzimática de xilanase de leveduras isoladas do solo do cerrado mineiro, durante a estação seca

Local de coleta	Isolado	Índice enzimático (média)
Passos-Ponto E	UFLA CES 708	1,31 ^a
Passos-Ponto E	UFLA CES 707	1,67 ^b
Arcos-Ponto A	UFLA CES 726	1,72 ^b
Arcos-Ponto E	UFLA CES 735	1,72 ^b

Índice enzimático (IE) = $\frac{\text{Ø halo}}{\text{Ø Colônia}}$

*Letras iguais na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade

Dos dez gêneros isolados do solo do cerrado (*Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Lindnera*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulaspora* e *Trichosporon*), somente dois (*Cryptococcus* e *Candida*) apresentaram resultado positivo para a produção de celulase e/ou xilanase. O gênero *Cryptococcus* se destacou com três espécies produtoras de enzimas. Os isolados foram identificados como *Cryptococcus laurentii*, *C. flavescens*, *C. humicola* e *Candida neerlandica*. *Cryptococcus* foi também o gênero que apresentou o maior número de espécies produtoras de xilanase, em pesquisa realizada por Lee et al. (1986). Segundo estes autores, a habilidade em hidrolisar xilana é relativamente rara em leveduras, o que coincide com os resultados encontrados neste trabalho.

C. laurentii foi a única espécie a produzir celulase e xilanase. As outras espécies (*C. flavescens*, *C. humicola* e *C. neerlandica*) foram produtoras somente de xilanase. Lee et al. (1986) encontraram poucas leveduras que apresentaram atividade xilanolítica acoplada à atividade celulolítica, diferentemente dos fungos filamentosos, em que atividade celulolítica e xilanolítica frequentemente ocorrem juntas. A vantagem da produção de xilanase livre de celulase é a aplicação na indústria de papel, em que o objetivo é preservar a celulose.

Além das espécies de leveduras isoladas neste trabalho, outras espécies também já foram relatadas como produtoras de celulase e/ou xilanase. Bhadra et al. (2008) isolaram cinco cepas de *Aureobasidium* sp. de casca de árvore que foram produtoras de xilanase. Parachin et al. (2009) isolaram a levedura *Cryptococcus flavus* de folhas e flores do Cerrado brasileiro que apresentaram atividade de amilase, carboximetilcelulase e xilanase.

A habilidade em hidrolisar xilana está restrita a limitado número de gêneros ou de espécies de leveduras. Os principais gêneros já relatados que têm atividade xilanolítica são *Aureobasidium pullulans*, *Bullera*, *Candida*,

Cryptococcus, *Pichia* e *Trichosporon* (PARACHIN et al., 2009; BHADRA et al., 2008; BIELY; KREMnický, 1998; LEE et al., 1986).

3.2 Identificação molecular de leveduras produtoras de celulase

Todos os isolados que apresentaram resultados positivos para a produção de celulase e xilanase, em meio sólido, foram identificados como *Cryptococcus laurentii*. Os produtores somente de xilanase foram identificados como *Candida neerlandica*, *Cryptococcus flavescens* e *Cryptococcus humicola*. As leveduras foram identificadas a partir do sequenciamento da região ITS e posterior comparação no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST. As sequências exibiram similaridade superior a 98% (Tabela 3). As colônias e as células das leveduras produtoras de celulase e/ou xilanase podem ser observadas na Figura 3.

Tabela 3 Identificação de leveduras produtoras de celulase e/ou xilanase, isoladas do solo do cerrado de Arcos, Passos e Luminárias, durante a estação seca e chuvosa

Estação	Região	Isolado	% similaridade	Espécie
Chuvosa	Passos ponto E	UFLA CES 519	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 520	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 521	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 522	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 524	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 526	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 547	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 548	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 549	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 550	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 551	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 552	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 553	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 554	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		UFLA CES 555	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
Seca	Passos ponto E	UFLA CES 707	98%	<i>Candida neerlandica</i>
		UFLA CES 708	98%	<i>Candida neerlandica</i>
	Arcos ponto A	UFLA CES 726	100%	<i>Cryptococcus flavescens</i>
	Arcos ponto E	UFLA CES 735	99%	<i>Cryptococcus flavescens</i>
	Passos ponto C	UFLA CES 682	99%	<i>Cryptococcus humicola</i>
	Passos ponto C	UFLA CES 683	100%	<i>Cryptococcus humicola</i>

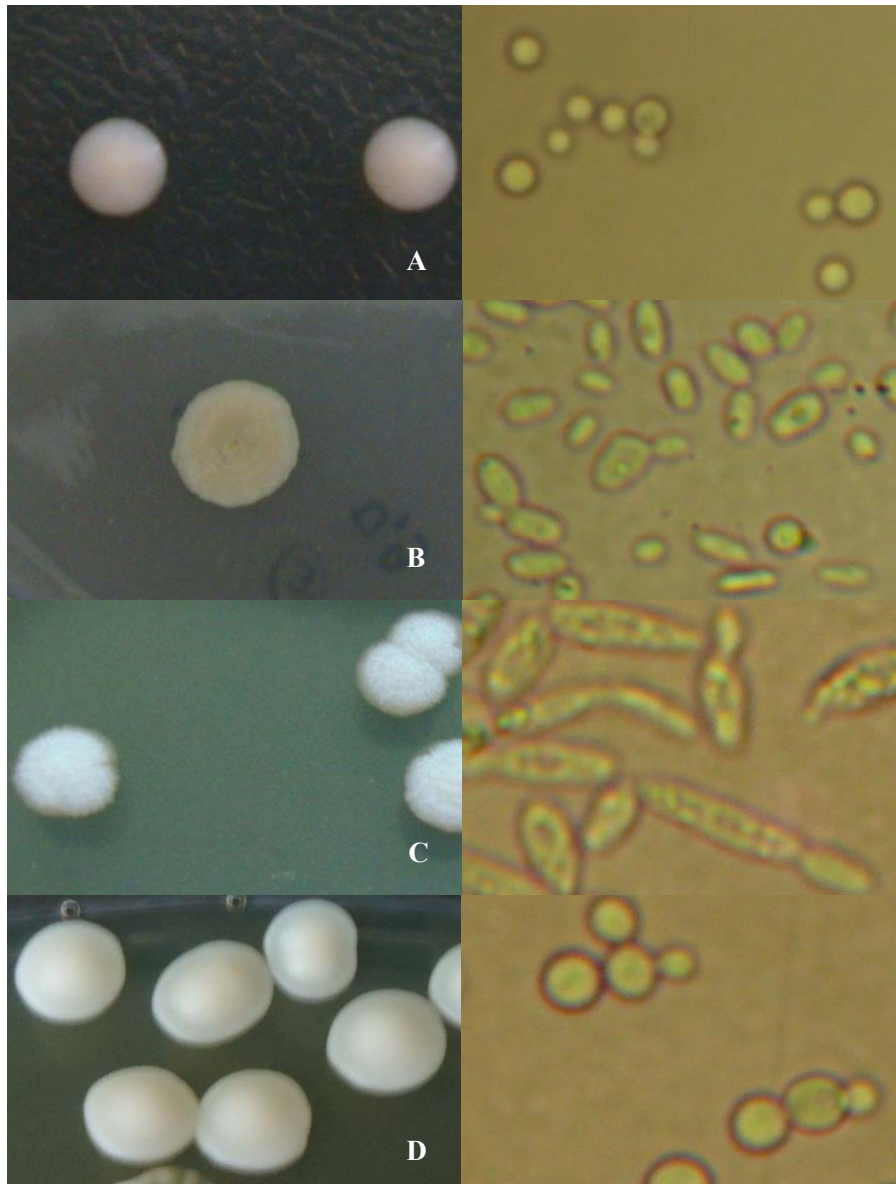


Figura 3 Leveduras produtoras de celulase e/ou xilanase: A – *Cryptococcus laurentii*; B – *C. flavescens*; C – *C. humicola*; D – *Candida neerlandica*

3.3 Perfil enzimático do complexo celulolítico

As enzimas do complexo celulolítico (FPase, 1,4 β D-endoglucanase e β -glicosidase) foram avaliadas para o isolado *Cryptococcus laurentii* UFLA CES 519, selecionado anteriormente por meio do índice enzimático no teste em placas.

3.3.1 Perfil de produção de FPase

A atividade de FPase não foi detectada nos resíduos lignocelulósico e no substrato puro para o isolado *Cryptococcus laurentii* UFLA CES 519. Estes resultados foram similares ao obtido para *Cryptococcus albidus*, em pesquisa realizada por Biely, Vrsanska e Kratky (1980). Estes autores relataram que este microrganismo não produziu enzimas celulolíticas, não sendo capaz de crescer em celulose ou celobiose.

Leite et al. (2007) também não detectaram secreção de exoglucanase por *Aureobasidium pullulans*, quando foi cultivado em farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja e sabugo de milho.

3.3.2 Perfil de produção de 1,4 β D-endoglucanase

Cryptococcus laurentii UFLA CES-Y 519 foi a única espécie produtora de celulase no teste qualitativo realizado em placas. Após a avaliação da produção de endoglucanase nos diversos substratos, houve produção de 0,164 U/mL, quando cultivado em meio nitrogênio levedura base adicionado de 2% farelo de trigo, com atividade específica de 0,014 U μg proteína⁻¹ mL⁻¹. Nos outros substratos, a produção de endoglucanase não foi detectada (Tabela 4).

Tabela 4 Efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de endoglucanase por *Cryptococcus laurentii* UFLA CES-Y 519

Fontes de Carbono	U total U/mL	Proteína total µg/mL	Atividade específica U µg proteína ⁻¹ mL ⁻¹
Bagaço de cana	nd*	0,313	-
Palha de cana	nd	3,885	-
Sabugo de milho	nd	1,527	-
Palha de milho	nd	0,686	-
Farelo de trigo	0,164	11,780	0,014
Casca de cacau	nd	2,023	-
CMC	nd	1,680	-

* nd- não detectado

Kanti e Sudiana (2002) isolaram diversas leveduras do solo com atividade celulolítica e associaram esta atividade à presença da enzima endoglucanase liberada por microrganismos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia* e *Debaryomyces*. Estas leveduras são importantes para a biodegradação dos resíduos lignocelulósicos presentes nestes solos. Outro gênero também identificado como produtor de endoglucanase foi *Aureobasidium (pullulans)*, com produção de 1,05 U mL⁻¹, quando cultivado em farelo de trigo (LEITE et al., 2007).

Neste trabalho, farelo de trigo foi o único substrato a induzir a produção de endoglucanase por *Cryptococcus laurentii*.

3.3.3 Perfil de produção de β-glicosidase

Embora, em muitos trabalhos, haja relatos, principalmente, da eficiente degradação da celulose por fungos filamentosos, como *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *T. lignorum*, *Chrysosporium pruinosum*, *C.lignorum* e *Fusarium solani*,

poucas pesquisas têm sido realizadas na identificação de leveduras produtoras de celulase (THONGEKKAEW et al., 2008).

A produção de β -glicosidase pelo isolado UFLA CES-Y 519 foi influenciada pelas diferentes fontes de carbono utilizadas (Tabela 5). Os substratos que apresentaram melhor produção foram farelo de trigo (7,165 U/mL), palha de cana (0,713 U/mL) e palha de milho (0,630 U/mL). Considerando a atividade específica, bagaço de cana e palha de milho apresentaram os melhores resultados para a produção desta enzima, com valores de 0,983 U $\mu\text{g proteína}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ e 0,919 U $\mu\text{g proteína}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, respectivamente, mostrando que tais substratos apresentam maior potencial indutor. Em adição às vantagens obtidas com os mais elevados valores de atividade específica, acrescenta-se o menor custo destes resíduos em comparação ao farelo de trigo.

Tabela 5 Efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de β -glicosidase por *Cryptococcus laurentii* UFLA CES-Y 519

Fontes de Carbono	U total U/mL	Proteína total $\mu\text{g/mL}$	Atividade específica U $\mu\text{g proteína}^{-1} \text{ mL}^{-1}$
Bagaço de cana	0,307	0,313	0,983
Palha de cana	0,713	3,885	0,184
Sabugo de milho	nd*	1,527	-
Palha de milho	0,630	0,686	0,919
Farelo de trigo	7,165	11,780	0,608
Casca de cacau	0,342	2,023	0,169
CMC	0,134	1,680	0,080

* nd- não detectado

Leite et al. (2007) avaliaram a produção de β -glucosidase por *Aureobasidium pullulans* em diversos resíduos lignocelulósicos e encontraram farelo de trigo como o melhor substrato indutor, com produção de 1,3 U mL^{-1} . A espécie utilizada neste trabalho (*Cryptococcus laurentii* UFLA CES-Y 519)

apresentou maior produção de enzima ($7,165 \text{ U mL}^{-1}$), quando comparada aos resultados obtidos por estes autores para o mesmo substrato.

Essa atividade de β -glicosidase pode ser devido ao fato de a maioria das espécies de leveduras que ocorrem em solos possuir amplo espectro de habilidade metabólica, permitindo a utilização de vários produtos resultantes da degradação de plantas e de outros microrganismos. Além disso, quase todas as leveduras do solo podem crescer em presença de celobiose como fonte de carbono, produzida durante a quebra da celulose (SLÁVIKÓVA; KOSIKOVÁ; MIKULÁSOVÁ, 2002). Dessa forma, mesmo que as β -glicosidases não atuem diretamente sobre a celulose, elas convertem a celobiose e a celooligossacarídeo, produzidas pelas endo e exoglucanase, a glicose (JOB; SUKUMARAN; JAYACHANDRAN, 2010).

3.4 Enzimas do complexo xilanolítico

3.4.1 Perfil de produção de xilanase

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados da produção de xilanase das quatro espécies de leveduras em diferentes fontes de carbono utilizadas como indutores da produção de enzimas. A maioria das fontes de carbono induziu a produção enzimática nas diferentes espécies de leveduras avaliadas. Não foi detectada a produção de xilanase para todos isolados em palha de cana e para três isolados em sabugo de milho. Dentre as leveduras selecionadas, *Cryptococcus laurentii* se destacou em todos os substratos, apresentando melhor produção de xilanase em meio contendo xilana ($2,137 \text{ U mL}^{-1}$) e farelo de trigo ($1,580 \text{ U mL}^{-1}$). Apesar da maior atividade enzimática verificada no substrato farelo de trigo, em termos de UI/mL, sua atividade específica foi inferior à

obtida para o substrato bagaço de cana, evidenciando maior potencial indutor deste último.

Tabela 6 Efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase por quatro espécies de leveduras (*Cryptococcus laurentii*-UFLA CES 519, *Cryptococcus flavescens*-UFLA CES 735, *Cryptococcus humicola*-UFLA CES 683 e *Candida neerlandica*-UFLA CES 707)

Fontes de	Isolado	U total	Proteína Total	Atividade específica
Carbono		U/mL	µg/mL	U µg prot. ⁻¹ mL ⁻¹
Bagaço de cana	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,155	0,313	0,494
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0,156	1,554	0,100
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,151	0,883	0,171
	<i>Candida neerlandica</i>	0,080	0,313	0,257
Palha de cana	<i>Cryptococcus laurentii</i>	nd*	3,885	-
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	nd	2,605	-
	<i>Cryptococcus humicola</i>	nd	2,290	-
	<i>Candida neerlandica</i>	nd	2,604	-
Sabugo de milho	<i>Cryptococcus laurentii</i>	nd	1,527	-
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	nd	2,829	-
	<i>Cryptococcus humicola</i>	nd	0,283	-
	<i>Candida neerlandica</i>	0,015	0,369	0,041
Palha de milho	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,154	0,686	0,224
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0,075	2,002	0,037
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,058	0,922	0,063
	<i>Candida neerlandica</i>	0,016	0,305	0,053
Farelo de trigo	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1,580	11,780	0,134
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0,394	10,215	0,039
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,292	10,215	0,029
	<i>Candida neerlandica</i>	0,318	10,215	0,031

Tabela 6, conclusão

Fontes de	Isolado	U total	Proteína Total	Atividade específica
Carbono		U/mL	µg/mL	U µg prot.⁻¹ mL⁻¹
Casca de cacau	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,230	2,023	0,114
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0,207	23,043	0,009
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,093	10,601	0,009
	<i>Candida neerlandica</i>	0,125	2,023	0,062
Xilana	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2,137	1,888	1,132
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0,628	5,125	0,123
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,386	1,724	0,224
	<i>Candida neerlandica</i>	0,361	2,303	0,157

* nd- não detectado

Bastawde, Puntambekar e Gokhale (1994) avaliaram a produção de xilanase e β -xilosidase por fermentação submersa de levedura isolada de madeira em decomposição. A maior produção de xilanase foi obtida em meio acrescido com xilana (220 UI mL^{-1}) ou farelo de trigo (150 UI mL^{-1}) a 1%. Apesar de a concentração de enzimas obtida por estes autores serem maiores, os melhores substratos para a produção de enzimas foram os mesmos encontrados neste trabalho. Outras fontes de carbono solúvel avaliadas por estes autores, como xilose, arabinose, galactose e maltose, também induziram a produção de xilanase, variando de $40\text{-}62 \text{ UI mL}^{-1}$, enquanto glicose, lactose, glicerol e sacarose não induziram a produção desta enzima.

Outros autores também relataram produção de xilanase por leveduras. Parachin et al. (2009) obtiveram 120 U mL^{-1} de atividade enzimática, utilizando *Cryptococcus flavus* isolada de folhas e flores do cerrado em meio otimizado contendo xilana e sulfato de amônio (1,34%). A espécie *Aureobasidium pulullans* já foi relatada como produtora de xilanase por Leite et al. (2007).

Bastawde, Puntambekar e Gokhale (1994) avaliaram a influência de diferentes concentrações de xilana na produção de xilanase e obtiveram os melhores resultados com xilana a 4% (570 UI mL^{-1}). No presente trabalho, concentrações mais elevadas de xilanase também podem ser obtidas otimizando a concentração do substrato indutor.

3.4.2 Perfil de produção de β -xilosidase

Em relação ao perfil de produção de β -xilosidase, todos os isolados apresentaram valores inferiores a $0,002 \text{ U mL}^{-1}$. Entre as quatro espécies de leveduras avaliadas, *Candida neerlandica* foi a que apresentou melhores resultados nos resíduos palha de milho ($0,00178 \text{ U mL}^{-1}$) e farelo de trigo

(0,000802 U mL⁻¹). A melhor atividade específica permaneceu para esta espécie em palha de milho com valor de 0,005840 U µg proteína⁻¹ mL⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7 Efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de β -xilosidase por quatro espécies de leveduras (*Cryptococcus laurentii*-UFLA CES 519, *Cryptococcus flavescens*-UFLA CES 735, *Cryptococcus humicola*-UFLA CES 683 e *Candida neerlandica*-UFLA CES 707)

Fontes de Carbono	Isolado	U total U/mL	Proteína Total $\mu\text{g/mL}$	Atividade específica U $\mu\text{g prot.}^{-1} \text{ mL}^{-1}$
Bagaço de cana	<i>Cryptococcus laurentii</i>	nd*	0,313	-
	<i>Cryptococcus</i>	6,26E-05	1,554	0,000040
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,000158	0,883	0,000179
	<i>Candida neerlandica</i>	4,91E-06	0,313	0,000016
Palha de cana	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,000519	3,885	0,000134
	<i>Cryptococcus</i>	0,000136	2,605	0,000052
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,000293	2,290	0,000128
	<i>Candida neerlandica</i>	nd	2,604	-
Sabugo de milho	<i>Cryptococcus laurentii</i>	nd	1,527	-
	<i>Cryptococcus</i>	nd	2,829	-
	<i>Cryptococcus humicola</i>	nd	0,283	-
	<i>Candida neerlandica</i>	0,000334	0,369	0,000903
Palha de milho	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,000139	0,686	0,000202
	<i>Cryptococcus</i>	9,81E-05	2,02	0,000049
	<i>Cryptococcus humicola</i>	0,000369	0,922	0,000400
	<i>Candida neerlandica</i>	0,00178	0,305	0,005840
Farelo de trigo	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,00055	11,780	0,000047
	<i>Cryptococcus</i>	0,000108	10,215	0,000011
	<i>Cryptococcus humicola</i>	7,48E-05	10,215	0,000007
	<i>Candida neerlandica</i>	0,000802	10,215	0,000079

Tabela 7, conclusão

Fontes de	Isolado	U total	Proteína Total	Atividade específica
Carbono		U/mL	µg/mL	U µg prot.⁻¹ mL⁻¹
Casca de cacau	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,000491	2,023	0,000243
	<i>Cryptococcus</i>	nd	23,043	-
	<i>Cryptococcus humicola</i>	nd	10,601	-
	<i>Candida neerlandica</i>	nd	2,023	-
Xilana	<i>Cryptococcus laurentii</i>	nd	1,888	-
	<i>Cryptococcus</i>	nd	5,125	-
	<i>Cryptococcus humicola</i>	nd	1,724	-
	<i>Candida neerlandica</i>	nd	2,303	-

* nd- não detectado

Os baixos valores de β -xilosidase encontrados neste trabalho podem ser devido à localização intracelular ou no espaço periplasmático desta enzima. Bastawde, Puntambekar e Gokhale (1994) também detectaram baixos níveis β -xilosidase ($0,1 \text{ U mL}^{-1}$) produzidos por uma levedura isolada de madeira em decomposição. Biely, Vrsanska e Kratky (1980) pesquisaram a produção desta enzima por *Cryptococcus albidus* e também obtiveram baixos valores quando foi cultivada em xilana de madeira de faia ($0,0106 \text{ U mL}^{-1}$) ou em glicose ($0,0004 \text{ U mL}^{-1}$). Nesse estudo sobre localização celular de β -xilosidase em *Cryptococcus albidus* foi constatado que esta enzima está presente intracelularmente. Em contrapartida, ela já foi localizada no interior e fora da célula, em *Trichosporon cutaneum* (HRMOVÁ, 1984) e, em *Aureobasidium pullulans*, é secretada no meio, junto com xilanase. Estes autores concluíram que a produção β -xilosidase é muito baixa, quando comparada com xilanase, o que coincide com os resultados encontrados neste trabalho.

Para a degradação de xilobiose ou de xilotriose em *C. albidus*, estes substratos são transportados para o interior da célula através de um sistema de transporte ativo chamado β -xilosidase permease e convertidos a xilose pela enzima β -xilosidase (BIELY; VRSANSKA; KRATKY, 1980; BIELY e KREMICKY, 1998).

Dentre os diversos resíduos disponíveis para a produção de enzimas, o farelo de trigo tem se mostrado promissor (BANSAL et al., 2012; DELABONA et al., 2012; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Neste trabalho, o farelo de trigo foi o melhor indutor em relação a U total para a maioria das enzimas analisadas. Farelo de trigo é um substrato complexo rico em proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gorduras (6%) e vitamina B. Pelo fato de ser uma boa fonte de nitrogênio, tem sido utilizada em misturas com bagaço de cana de açúcar para a produção de celulase. A composição deste substrato, provavelmente, favoreceu o crescimento e a produção de enzimas pelas

leveduras. Entretanto, o resíduo bagaço de cana e palha de milho apresentou atividade específica superior à do farelo de trigo. Além disso, estes resíduos apresentam menor custo, quando comparados ao farelo de trigo, sendo promissores para a produção de enzimas.

4 CONCLUSÃO

Foram obtidas 307 leveduras do solo do cerrado e os isolados produtores de celulase e/ou xilanase ficaram restritos a poucos gêneros. Todas as espécies do gênero *Cryptococcus* isoladas neste trabalho (*C. laurentii*, *C. flavescens* e *C. humicola*) apresentaram atividade enzimática para, pelo menos, uma das enzimas. Dentre estes isolados, *Cryptococcus laurentii* foi produtor de celulase e xilanase e os outros isolados de *Cryptococcus* e a espécie *Candida neerlandica* produziram apenas enzimas do complexo xilanolítico

Em relação às enzimas do complexo celulolítico, a levedura *Cryptococcus laurentii* (UFLA CES 519) foi a espécie que se destacou na produção de β -glicosidase, com melhor resposta em atividade específica constatada nos resíduos bagaço de cana e palha de milho. A atividade de endoglucanase foi detectada apenas no substrato farelo de trigo e não houve produção de exoglucanase em nenhum resíduo lignocelulósico ou sintético para este isolado.

Cryptococcus laurentii também se destacou na produção de xilanase (atividade específica), quando cultivado em bagaço de cana. Em relação à β -xilosidase, a maior atividade específica foi observada para *C. neerlandica*, quando se utilizou palha de milho como substrato. Entretanto, esta enzima foi detectada em baixas concentrações.

Visto que o custo do substrato tem grande importância na economia de um processo de produção de enzimas, o uso de resíduos agroindustriais como substrato mostrou ser uma alternativa promissora para os microrganismos avaliados. Considerando as atividades de β -glicosidase e xilanase obtida pelas leveduras isoladas do solo do cerrado, os resultados mostram que estes microrganismos podem ser utilizados para a produção de enzimas para aplicação

em processos biotecnológicos. Entretanto, uma etapa de otimização e caracterização dessas enzimas é necessária para seu melhor conhecimento.

Além dessas aplicações industriais, a presença desses microrganismos na natureza tem papel significativo na biotransformação de substâncias orgânicas do solo.

REFERÊNCIAS

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 257-270, 1992.

BANSAL, N. et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, Oxford, v. 32, p. 1341–1346, 2012.

BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKA, U. S. R.; GOKHALE, D. V. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel strain. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 13, p. 220-224, 1994

BHADRA, B. et al. Yeast and yeas-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. **Current Microbiology**, v. 56, p. 489-494, 2008.

BIELY, P.; KREMnickÝ, L. Yeasts degrading celuloze, hemicelluloses and pectin. **Food Technology Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 305-312, 1998.

BIELY, P.; VRSANSKA, M.; KRATKY, Z. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*: Identification and Cellular Localization. **European Journal Biochemistry**, v. 108, p. 313- 321, 1980.

BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 241-271.

DA VINHA, F. N. M. et al. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Duluth**, v. 164, p. 256–267, 2011

DELABONA, P. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DELABONA, P. S. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236– 242, 2013.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: um programa para análises e ensino de estatística. Lavras, 1999. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities, **Pure & Applied Chemistry**, New Delhi, v. 59, n. 2, p. 257—268, 1987.

HRMOVÁ, M. et al. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*. **Archive Microbiology**, v. 138, p. 371- 376, 1984.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 301-306-, 2005

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 6 jun. 2010

JAYAPAL, N. et al. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 14– 24, 2013.

JOB, J.; SUKUMARAN, R. K.; JAYACHANDRAN, K.

KANTI, A.; SUDIANA, I. M. Cellulolytic yeast isolated from soil Gunung Halimun National Park. **Berita Biology**, v. 6, n. 1, 2002.

KASANA, R. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulose on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, Nov. 2008

LEE, H. et al. Utilization of Xylan by yeasts and Its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 320-324, 1986.

LEITE, R. S. R. et al. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136–140, p. 281-288, 2007.

LIAO, H. et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 117–124, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. v. 1, 768 p.

MOREIRA, F. M. S. et al. Differentiation in the fertility of Inceptisols as related to land use in the upper Solimões river region, western Amazon. **Science of the Total Environment**, Volume v. 408, n. 2, p. 349–355, Dec. 2009.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products . **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PARACHIN, N. S. et al. from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces*

cerevisiae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 52–57, 2009.

POLIZELI, M.L.T.M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2-3, p. 225-231, June 2010.

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

SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ufla, 2008. 768 p.

SHAFIQUE, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, A. Solid state fermentation of banana stalk for exoglucanases production. **International Journal of Agriculture & Biology**. v. 6, n. 3, p. 488-491, 2004.

SLÁVIKOVÁ, E.; KOSIKOVÁ, B.; MIKULÁSOVÁ, M. Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 3, p.200-203, Mar. 2002.

SUKUMARAN, R. K. Cellulase production using biomass feed stok and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, Feb. 2009.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 169-179, 2003.

THONGEKKAEW, J. et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 140-146, Aug. 2008.

VANDAMME, E. J. Agro-industrial residue utilization for industrial biotechnology products In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**: utilisation of agro-residues. New York: Springer, 2009. 462 p.