



ANDRÉ OHARA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS
SILVESTRES DE BIOMAS DO ESTADO DE SÃO PAULO
COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASE E
VITAMINAS DO COMPLEXO B**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ANDRÉ OHARA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES DE
BIOMAS DO ESTADO DE SÃO PAULO COM POTENCIAL PARA
PRODUÇÃO DE LIPASE E VITAMINAS DO COMPLEXO B**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO ANDRÉ OHARA E
ORIENTADO PELA PROF.^a DR.^a GABRIELA ALVES MACEDO.

Assinatura do orientador (a)

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

Oh1i Ohara, André, 1989-
Isolamento e seleção de leveduras silvestres de biomas do Estado de São Paulo com potencial para produção de lipase e vitaminas do complexo B / André Ohara. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Bioprospecção. 2. Leveduras. 3. Lipase. 4. Biotina. 5. Riboflavina. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Screening of wild yeasts from Sao Paulo biomes with potential to the production of lipase and B vitamins

Palavras-chave em inglês:

Bioprospection

Yeasts

Lipase

Biotin

Riboflavin

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Derlene Attili de Angelis

Marta Cristina Teixeira Duarte

Data de defesa: 21-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

PROF.^a DR.^a GABRIELA ALVES MACEDO
ORIENTADORA

PROF.^a DR.^a DERLENE ATTILI DE ANGELIS
CPQBA/UNESP
(MEMBRO TITULAR)

PROF.^a DR.^a MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE
CPQBA/UNICAMP
(MEMBRO TITULAR)

PROF.^a DR.^a JULIANA AZEVEDO LIMA PALLONE
FEA/UNICAMP
(MEMBRO SUPLENTE)

PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS
UFSCar/ARARAS
(MEMBRO SUPLENTE)

RESUMO

A bioprospecção de micro-organismos representa um grande potencial tecnológico para produção de biocompostos de interesse comercial. Dentre estes compostos estão as enzimas lipolíticas, como as lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) que apresentam um enorme potencial para aplicações biotecnológicas. Outro tipo de biocomposto de relevante interesse comercial são as vitaminas do complexo B, as quais possuem função essencial na atividade de enzimas que regulam reações do metabolismo. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi isolar e selecionar linhagens de leveduras do solo de diferentes biomas do Estado de São Paulo com potencial para produção de lipase e de vitaminas do complexo B (biotina e riboflavina). Para tanto, foram isoladas 132 leveduras de amostras de solos provenientes da Mata Atlântica e da região de transição (Mata Atlântica e Cerrado). Essas linhagens foram depositadas na coleção de micro-organismos do laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA-UNICAMP, que já contava com 300 leveduras provenientes da região de Cerrado. As 432 linhagens presentes na coleção foram então avaliadas quanto ao potencial para a produção de lipase extracelular através de seleção em meio sólido diferencial e cultivo em meio líquido, sendo a atividade de lipase determinada no sobrenadante por titulometria de neutralização. O potencial para a produção de biotina e riboflavina extracelular foi avaliada por meio de seleção em meio de cultivo líquido, sendo as concentrações das vitaminas determinadas no sobrenadante por espectrofotometria e fluorimetria. Desta forma 33 leveduras apresentaram potencial para produção de lipase alcançando valores de atividade enzimática que variaram de 6,51 U/mL a 21,44 U/mL. Em relação à produção das vitaminas do complexo B, 38 linhagens apresentaram concentrações de biotina no sobrenadante do cultivo que variaram de 0,28 µg/mL a 18,61 µg/mL e 64 linhagens apresentaram concentrações de riboflavina que variaram de 0,03 µg/mL a 0,77 µg/mL. A linhagem RP.C153 apresentou potencial para produção de lipase e riboflavina, enquanto a linhagem RP.J1308 para produção de lipase e biotina. A linhagem RP.C153 foi classificada como *Pichia caribbica* e a linhagem RP.J1308 como *Candida oleophila*.

Palavras chave: Bioprospecção, leveduras, lipase, biotina e riboflavina.

ABSTRACT

The bioprospection of microorganisms represents a great technological potential for the production of biocompounds of commercial interest. Among these compounds are the lipolytic enzymes, such as lipases (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) which have currently a huge potential for biotechnological applications. B vitamins are another type of biocompound with relevant commercial interest, which have essential role in the activity of enzymes that regulate metabolic reactions in living organisms. Therefore, the aim of this work was to isolate and select strains of yeasts from the soil of different biomes present in the State of São Paulo for the biotechnological production of lipase and B vitamins (biotin and riboflavin). Thus, 132 yeasts were isolated from soil samples of the Atlantic Forest (Ilha Bela - SP) and the transition region between the Atlantic Forest and Savanna (Campinas - SP). These strains were deposited in the collection of microorganisms of the Food Biochemistry Laboratory FEA - UNICAMP, which already had 300 yeasts from the Savanna region (Ribeirão Preto - SP). Therefore 432 strains present in the collection were then evaluated for their potential to produce extracellular lipase by selection on solid selective differential and liquid medium culture, and the enzyme activity in the supernatant was determined by neutralization titration. The potential production of extracellular biotin and riboflavin was assessed by selection in medium liquid culture, and the concentrations of those vitamins were measured in the supernatant by spectrophotometry and fluorimetry. Therefore 33 yeasts demonstrated potential for the production of lipase, reaching values of enzymatic activity ranging from 6.51 U/mL to 21.44 U/mL. In relation to the production of B vitamins, 38 strains presented concentrations of biotin in the supernatant culture ranging from 0.28 µg/mL to 18.61 µg/mL and 64 strains demonstrated concentrations of riboflavin ranging from 0.03 µg/mL to 0.77 µg/mL. The strain RP.C153 presented potential for production of lipase and riboflavin, while strain RP.J1308 for production of lipase and biotin. The RP.C153 strain was classified as *Pichia caribbica* and RP.J1308 strain as *Candida oleophila*.

Keywords: Bioprospection, yeasts, lipase, biotin and riboflavin.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 BIOPROSPECÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	4
1.2 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE RIBOFLAVINA E BIOTINA PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL.....	7
1.2.1 Fluorimetria na determinação de riboflavina	10
1.3 ENZIMAS MICROBIANAS DE INTERESSE INDUSTRIAL	10
1.4 LIPASES DE LEVEDURAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	11
1.5 TAXONOMIA MOLECULAR DE LEVEDURAS	13
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	15
2.3 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE	17
2.3.1 Triagem semiquantitativa em meio sólido diferencial.....	17
2.3.2 Análise quantitativa com ensaio de atividade enzimática	18
2.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE VITAMINAS DO COMPLEXO B	19
2.4.1 Determinação de Biotina por espectrofotometria com o reagente HABA/Avidin.....	19
2.4.2 Determinação de Riboflavina por espectrofotometria	20
2.4.3 Determinação de Riboflavina por fluorimetria	21
2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS RP.C153 E RP.J1308.....	21
2.5.1 Extração do DNA de levedura	21
2.5.2 Amplificação e sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do DNA ribossômico.....	22

2.5.3	Análise das sequências e filogenia.....	23
2.6	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1	CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	24
3.2	SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE LIPASE	26
3.2.1	Seleção inicial em meio sólido diferencial	26
3.2.2	Análise quantitativa da produção de lipase.....	27
3.3	SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE BIOTINA	28
3.4	SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE RIBOFLAVINA	30
3.4.1	Seleção inicial por espectrofotometria.....	30
3.4.2	Avaliação da produção de riboflavina por fluorimetria.....	31
3.5	IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE LIPASE, BIOTINA E RIBOFLAVINA.....	37
3.5.1	Análise das sequências e análise filogenética das linhagens RP.J1308 e RP.C153.....	37
3.5.2	Produção de lipase por leveduras pertencentes ao clado de <i>Pichia</i> <i>guilliermondii</i> e do gênero <i>Candida</i>	39
3.5.3	Produção de vitaminas do complexo B por leveduras pertencentes ao clado de <i>Pichia guilliermondii</i> e do gênero <i>Candida</i>	39
4.	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXOS.....	52

Dedico este trabalho aos meus pais Milton e Terezinha, ao meu irmão Eduardo e a Deus por estar presente em minha vida me iluminando em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo pela orientação, ensinamentos, amizade e pela confiança depositada em meu trabalho. Meu respeito, admiração e referência profissional e pessoal para meu crescimento.

Aos meus colegas de laboratório, Bia, Bruna, Camilo, Cíntia, Dani, Débora, Elaine, Erica, Fabiano, Fabiola, Fernanda, Giba, Giulia, Gyorgy, Haroldo, Isa, Jessika, Joelise, José Valdo, Julia, Leonardo, Liege, Livia Dias, Livia Rosas, Marcela, Paula, Paulinha, Ricardo, Thiago, Val, Vivi, pelo aprendizado, apoio e por terem construído um ambiente de trabalho feliz e acolhedor.

Ao meu amigo Ruann pela dedicação, pelos ensinamentos que enriqueceram significativamente a minha formação pessoal e profissional e pela prontidão em sempre ajudar a todos no laboratório.

A Prof.^a Dr.^a Derlene Attili de Angelis da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria pelo auxílio prestado com identificação das linhagens de leveduras.

A Milena Binatti Ferreira da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria, pela amizade, ajuda e por todos os ensinamentos de microbiologia e biologia molecular que contribuíram significativamente para este trabalho e para minha formação profissional.

Aos professores da FEA/UNICAMP, em especial, a professora Prof.^a Dr.^a Helia Harumi Sato, pelo carinho e ajuda.

A todos os funcionários da FEA/UNICAMP, em especial, ao Marcos A. Castro, pela amizade, atenção e auxílios prestados.

A banca examinadora pela contribuição dada ao trabalho.

A FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

Ao meu pai, Milton, minha mãe Terezinha e meu irmão Eduardo pelo incentivo constante aos estudos e pela confiança depositada durante toda minha vida.

A Camila Utsunomia pela companhia, carinho e dedicação diários, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

A Deus por colocar todos no meu caminho.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa da vegetação do Estado de São Paulo, digitalizado por U.S. Geological Survey's (USGS) EROS Data Center, Sioux Falls, South Dakota (IBGE 1988)	6
Figura 2: Estrutura química da Riboflavina (7,8-dimetil-10- ((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)- 2,3,4,5-tetra-hidroxipentilo)	8
Figura 3: Estrutura química da Biotina (5-[(3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>aR</i>)-2-oxohexahidro-1 <i>H</i> -tieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-yl]ácido pentanoico)	8
Figura 4: Placa de petri dividida em 4 quadrantes para a contagem de UFC	17
Figura 5: Ilustração exemplificando as medidas do diâmetro do halo e da colônia utilizados no cálculo do índice de atividade enzimática	18
Figura 6: Bases químicas da detecção de biotina baseada no equilíbrio HABA/Avidina	20
Figura 7: Halo formado pela deposição de cristais de cálcio ao redor das colônias, demonstrando a possível atividade da lipase	27
Figura 8: Leveduras isoladas das regiões de Cerrado, Mata Atlântica e região de transição Cerrado/Mata Atlântica que apresentaram produção de lipase, biotina e riboflavina	36
Figura 9: Coloração de Gram das linhagens RP.C153 (esquerda) e RP.J1308 (direita) para verificação da pureza das culturas	37
Figura 10: Árvore filogenética comparando a distância da linhagem RP.C153, adotando como grupo externo a espécie <i>Brettanomyces naardenensis</i>	38
Figura 11: Árvore filogenética comparando a distância da linhagem RP.J1308, adotando como grupo externo a espécie <i>Candida natalensis</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bioprospecção de micro-organismos produtores de biocompostos em diferentes ecossistemas.....	4
Tabela 2: Leveduras presentes na literatura recente consideradas potenciais produtores de lipase	13
Tabela 3: Leveduras isoladas de amostras de solo provenientes da região de Mata Atlântica e da região de transição entre Mata Atlântica/Cerrado	24
Tabela 4: Leveduras provenientes da região de Cerrado previamente presentes na Coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos	25
Tabela 5: Índice Enzimático dos isolados que apresentaram formação de halo de deposição dos cristais de cálcio ao redor da colônia	26
Tabela 6: Atividades enzimáticas das lipases produzidas pelos isolados na etapa de seleção quantitativa. As linhagens destacadas apresentaram médias de atividade enzimática superiores a 20 U/mL	27
Tabela 7: Concentrações de biotina presente nos sobrenadantes do cultivo dos isolados em meio líquido	29
Tabela 8: Concentrações de riboflavina determinadas por espectrofotometria no sobrenadante dos cultivos dos isolados em meio líquido	31
Tabela 9: Curvas padrão de riboflavina em diferentes tampões com a faixa de pH variando de 4,0 a 9,0 elaboradas com o método fluorimétrico	32
Tabela 10: Concentrações de riboflavina determinadas por fluorimetria no sobrenadante dos cultivos dos isolados em meio líquido	33
Tabela 11: Comparação dos métodos; espectrofotométrico e fluorimétrico, das linhagens que obtiveram as maiores produções de riboflavina, e linhagens que não apresentaram produção de riboflavina detectada pelo método fluorimétrico	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DCA	Departamento de Ciência de Alimentos
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide solution mix
EC	Enzyme Commission Numbers
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FEA	Faculdade de Engenharia de Alimentos
FMN	Flavina mononucleotídeo
GRAS	generally recognized as safe
HABA	4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice enzimático
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRC	National Research Council
PCR	Polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SP	Estado de São Paulo
UFC	Unidades formadoras de colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USGS	United States Geological Survey's
YMA	Yeast malt agar

INTRODUÇÃO GERAL

Os micro-organismos presentes no ambiente constituem uma reserva inesgotável de diversidade genética e funcional, acumulada durante milhões de anos de evolução adaptativa e inúmeras pressões seletivas. Como consequência o isolamento de micro-organismos se tornou uma importante fonte de produtos biológicos com aplicações em todas as grandes indústrias de alimentos, farmacêuticas, agrícolas, combustíveis entre outras (DIONISI; LOZADA; OLIVERA, 2012).

As enzimas microbianas são biocompostos consideradas como catalisadoras naturais, e atualmente apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas. Estas enzimas são geralmente mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas e animais devido a grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, possibilidade de atingir altos rendimentos, facilidade na manipulação genética, suprimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e o crescimento de micro-organismos em meios de menor custo, o que torna o processo de produção controlado e mais seguro (MOMSIA, et al., 2013).

Entre as enzimas microbianas estão as lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) que apresentam ampla diversidade em suas propriedades e alta afinidade pelo substrato, o que as tornam atrativas para as aplicações industriais. O uso comercial de lipases movimenta um mercado de bilhões de dólares abrangendo uma grande variedade de aplicações (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

As vitaminas do complexo B são biocompostos de relevante interesse industrial já que, apesar de exigidas em pequenas quantidades, são essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A riboflavina ou B₂, importante vitamina pertencente ao complexo B, é um precursor das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), que são requeridas em reações tais como as de oxidação enzimática de carboidratos (AQUARONE, 2001). A biotina por sua vez é um cofator essencial para reações catalisadas por carboxilases, sendo comercializada como alimento ou aditivo alimentar, aditivo cosmético ou produto farmacêutico (SILVA et al., 2005).

O interesse de desenvolver um processo para a produção biotecnológica das vitaminas do complexo B reside na suplementação da ração animal, já que a deficiência de riboflavina e biotina no campo é uma das mais prováveis, pois rações a base de

milho, farelo de soja, cereais e suplementos proteicos não apresentam concentrações de vitaminas do complexo B indicados pelo NRC - *National Research Council*. O consumo de vitaminas em premix para ração animal vem crescendo nos últimos anos no país, sendo estes ingredientes todos importados, o que evidencia a importância da procura por fontes menos onerosas de vitaminas do complexo B (AMARAL; OTUTUMI, 2013).

O estado de São Paulo é constituído em sua grande maioria pelos biomas de Mata Atlântica e Cerrado contando com cerca de 33.307.744 hectares de “Mata Natural”, ou seja, 13,4% de seu território. A importância desses biomas se deve a inclusão de ambos na lista de *hotspots*, que são regiões que concentram os mais altos níveis de biodiversidade na Terra e para tanto necessitam ser estudadas e preservadas (BIOTA FAPESP, 2013).

O solo é constituído por uma enorme diversidade de compostos orgânicos que são fonte de energia e de carbono para os micro-organismos. Para a utilização desses compostos, as espécies de micro-organismos sintetizam e secretam diversas enzimas, metabólitos secundários entre outros biocompostos. Tendo em vista que muitos desses compostos são de interesse industrial, o presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar linhagens de leveduras do solo de diferentes biomas do Estado de São Paulo para produção biotecnológica de lipase e das vitaminas do complexo B (biotina e riboflavina). Para isso as linhagens de leveduras isoladas da Mata Atlântica, da região de transição (Mata Atlântica e Cerrado) e do Cerrado foram purificadas, classificadas e preservadas em ultrafreezer. O potencial para a produção de lipase extracelular foi avaliado através de seleção em meio sólido diferencial e cultivo em meio líquido, sendo a atividade enzimática determinada no sobrenadante por titulometria de neutralização. A produção de biotina e riboflavina extracelular foi avaliada por meio de seleção em meio de cultivo líquido, sendo as concentrações das vitaminas determinadas no sobrenadante por espectrofotometria e fluorimetria.

As leveduras que apresentaram potencial para produção de lipase, biotina e riboflavina foram identificadas através de técnicas moleculares. Esta etapa do trabalho foi realizada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), em parceria com a Dra Derlene Attili de Angelis com o objetivo de disseminação das linhagens potenciais produtoras dos biocompostos estudados.

O presente trabalho faz parte do Programa de Pesquisas em Caracterização, Conservação, Recuperação e Uso Sustentável da Biodiversidade do Estado de São Paulo (BIOTA-FAPESP) e está vinculado ao projeto temático “Bioprospecção de

fungos e leveduras silvestres de distintos biomas do Estado de São Paulo visando à produção de enzimas, vitaminas de interesse industrial e compostos bioativos”.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 BIOPROSPECÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

O isolamento de micro-organismos ainda não explorados biotecnologicamente representa grande interesse tecnológico e comercial para produção de ingredientes, tais como enzimas, compostos antimicrobianos, antioxidantes e vitaminas para as inúmeras indústrias brasileiras, as quais, atualmente, possuem grande dependência de insumos importados por falta de indústrias locais para produzi-los e investimento em processos biotecnológicos.

Micro-organismos poucos explorados e de maior diversidade biológica podem ser isolados em locais onde as condições de temperatura, pressão osmótica, pH, salinidade sejam extremos. Uma das mais surpreendentes propriedades dos micro-organismos é a habilidade de adaptar-se a diferentes ecossistemas, incluindo ambientes extremos (Tabela 1). Nesse sentido, Ries e Macedo (2009) relatam a técnica de seleção por “pressão do meio”, isolando e selecionando leveduras que se adaptassem a altas temperaturas para produzir enzimas termoestáveis.

Tabela 1: Bioprospecção de micro-organismos produtores de biocompostos em diferentes ecossistemas.

Bioproduto	Organismo	Ecossistema	Referência
Tanase	Fungos	Caverna Brasileira	Melo et al. (2013)
Riboflavina	Leveduras	Mar	Amornrattanapan, (2013)
Celulases e lipases	Bactérias	Sedimentos marinhos	Odisi et al. (2012)
Biosurfactantes	Bactérias	Ambientes contaminados com petróleo	Cerqueira et al. (2012)
Xilanase	Leveduras	Floresta amazônica	Cadete et al. (2012)
Bacteriocinas	Microalgas	Mar	González-Davis et. al (2012)
Riboflavina	Leveduras	Cerrado	Suzuki, Fleuri e Macedo (2012)
Amilase, celulase e protease	Fungos	Costa da Antártida	Krishnan et al. (2011)
Lipase	Leveduras	Pampas	Bussamara et al. (2010)

De acordo com Bussamara et al. (2010), uma abordagem interessante para a obtenção de novos biocatalisadores é a bioprospecção de micro-organismos a partir de fontes naturais, seguidos por ensaios de seleção funcionais em busca da capacidade enzimática desejada e seleção das melhores linhagens. Até 1980, apenas cerca de 2% de micro-organismos estudados foram testados como fontes de enzimas. Mais recentemente, milhares de amostras microbianas isoladas a partir do solo, foram testadas para a produção de lipases, revelando que 20% eram produtores desta enzima, incluindo os fungos filamentosos e leveduras.

A bioprospecção se tornou uma atividade essencial também para a indústria farmacêutica. De acordo com Firn (2003), cerca de 25% dos fármacos vendidos em países desenvolvidos e 75% dos fármacos comercializados nos países subdesenvolvidos são baseados em químicos sintetizados por organismos vivos. De acordo com o IMS *health – intelligence applied* o mercado farmacêutico global, pode atingir o valor de US\$ 1.1 trilhão no ano de 2014 e as estimativas apontam que em 2017, o mercado brasileiro atingirá R\$87 bilhões de reais em vendas, refletindo assim a importância da descoberta de novas moléculas naturais, princípios ativos com potencial terapêutico (GARY GATYAS, 2013).

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade, contando com um terço do América Latina em território, dispondo de 8,5 milhões km² que abrangem várias zonas climáticas como o trópico úmido no Norte, o semi-árido no Nordeste e áreas temperadas no Sul (GRANJA; VARELLA, 1999). Estas diferenças climáticas levam a grandes variações ecológicas, formando zonas biogeográficas distintas ou biomas: a Floresta Amazônica, maior floresta tropical úmida do mundo; o Pantanal, maior planície inundável; o Cerrado de savanas e bosques; a Caatinga de florestas semiáridas; os campos dos Pampas; e a floresta tropical pluvial da Mata Atlântica. Todas as características mencionadas ilustram o enorme potencial brasileiro para realização das atividades que envolvem a bioprospecção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

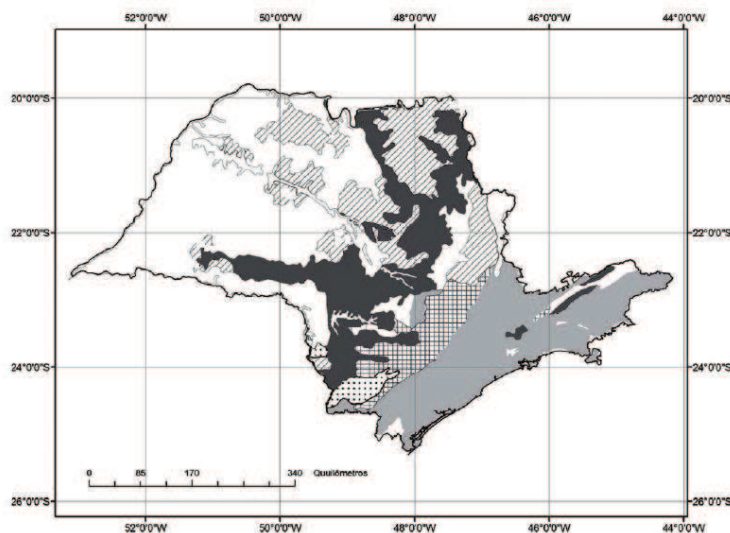


Figura 1: Mapa da vegetação do Estado de São Paulo, digitalizado por U.S. Geological Survey's (USGS) EROS Data Center, Sioux Falls, South Dakota (IBGE 1988); Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Mista, Cerrado, Contato Cerrado – Floresta Estacional Semidecidual, Contato Cerrado – Floresta Ombrófila Densa.

Na região geográfica que o Estado de São Paulo abrange, encontram-se diferentes biomas (figura 1), com locais que atingem altas temperaturas na maior parte do ano, regiões com fontes de águas termais, regiões de mangue que são submetidos constantemente a derramamento de óleo e petróleo, regiões salinas, matas subtropicais, ambientes de cavernas, entre outros. De acordo com Donadio et al. (2009), novas moléculas bioativas podem ainda ser descobertas de fontes microbianas.

Especificamente para este trabalho, as leveduras avaliadas quanto ao potencial para a produção de lipase, biotina e riboflavina eram provenientes dos biomas de Mata Atlântica e Cerrado presentes nas cidades de Ilha Bela, Campinas e Ribeirão Preto. A região de Mata Atlântica na cidade de Ilha Bela inclui locais com cavernas, ambientes úmidos, frios e sem luz (RIBEIRO et al., 2009). A região de cerrado, em Ribeirão Preto, encontram-se solos intemperizados, apresentando pH ácido que varia de 4,3 a 6,2, no qual ocorre o plantio de cana-de-açúcar (KLINK; MACHADO, 2005). A região de Campinas é caracterizada pela transição dos biomas de Mata Atlântica e Cerrado. Estas regiões apresentam solo e clima diferenciados com alta probabilidade de diversidade de espécies microbianas.

1.2 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE RIBOFLAVINA E BIOTINA PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Os micronutrientes são elementos necessários à manutenção das funções bioquímicas de todos os seres vivos, participando de inúmeros processos metabólicos, sendo essenciais para ótima saúde e desempenho do organismo (FÉLIX; MAIORKA; SORBARA, 2009). Dentre os micronutrientes destacam-se as vitaminas, as quais são compostos orgânicos necessários em quantidades mínimas, porém essenciais (WEISS, 2011).

A deficiência de uma ou mais vitaminas pode levar a inúmeros distúrbios metabólicos, enquanto que o aumento na suplementação de certas vitaminas tem efeitos positivos, principalmente quanto à imunidade. Sendo assim a produção comercial de ração animal é baseada no equilíbrio de ingredientes em quantidades adequadas para atingir o perfil nutricional desejado, com objetivo de atingir um nível ótimo entre desempenho e custo e, assim, máxima rentabilidade. Entre os componentes utilizados na formulação de rações estão as vitaminas (FÉLIX; MAIORKA; SORBARA, 2009).

Em relação ao custo como componente de alimentação, as vitaminas, embora em pequenas quantidades, apresentam altos percentuais em relação ao custo total em rações animais. Por exemplo, em dietas de frango de corte as vitaminas representam cerca de 3% do custo total da dieta, sendo que as vitaminas A e E chegam a representar juntas cerca de 50% do custo total (TOLEDO et al., 2006).

As vitaminas do complexo B são essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos organismos, e possuem importante função na atividade de enzimas que regulam reações de metabolismo responsáveis por transformar o alimento em energia (SYBESMA et al., 2004).

A riboflavina ou B₂, vitamina pertencente ao complexo B, é um sólido microcristalino de cor amarelo alaranjada, amargo e inodoro. Decompõe-se rapidamente em meio alcalino e também na presença de luz, embora seja resistente ao calor e aos ácidos. Esta vitamina é um precursor das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), que são requeridas em reações tais como as de oxidação enzimática de carboidratos (AQUARONE, 2001).

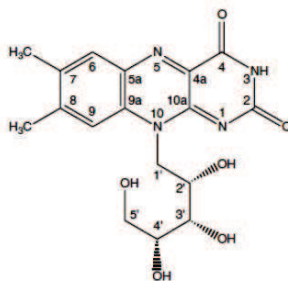


Figura 2: Estrutura química da Riboflavina (7,8-dimetil-10- ((2*R*,3*R*,4*S*)- 2,3,4,5-tetra-hidroxipentilo).

Segundo Amaral e Otutumi (2013) a deficiência de riboflavina no campo é uma das mais prováveis, já que rações a base de milho, farelo de soja, cereais e suplementos proteicos não apresentam os valores mínimos preconizados pelo NRC (*National Research Council*). Assim a deficiência de riboflavina pode ocasionar, por exemplo, em frangos de corte a redução no ganho de peso, diarreia, alta mortalidade e paralisia dos dedos curvos.

A biotina ou vitamina H apresenta-se em pó ou micro agulhas incolores, sendo solúvel em álcool e em água alcalina, apresentando estabilidade à luz e a temperaturas até 100°C quando em solução aquosa ou material seco. Insolúvel em solventes orgânicos comuns, esta vitamina é um cofator essencial para reações catalisadas por carboxilases, sendo comercializada como alimento ou aditivo alimentar, aditivo cosmético ou produto farmacêutico (SILVA et al., 2005; HALVER, 2014).

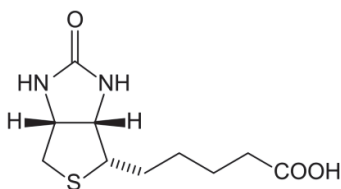


Figura 3: Estrutura química da Biotina (5-[(3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]ácido pentanoico).

Em trabalho realizado por Dakshinamurti (2005) foi constatado que a deficiência de biotina em frangos domésticos foi responsável por malformações congênitas, e de acordo com Burgos, Bohorquez e Burgos (2006) a deficiência desta vitamina na alimentação está relacionada com crescimento debilitado, redução na eficiência de absorção de nutrientes e dermatite bucal.

A produção sintética das vitaminas do grupo B começou nos anos de 1930, com a tiamina e a riboflavina. Já a biossíntese microbiana tem sido explorada desde 1940. A síntese química para produção de vitaminas do complexo B tem como desvantagens a utilização de mais de 10 etapas, alto requerimento de energia, emprego de compostos e subprodutos tóxicos e colaterais, resultando em um processo caro e de alto impacto ambiental (Streit; Entcheva, 2003). Em vista disso, o desenvolvimento de um processo biotecnológico de baixo custo visando à aplicação em ração animal expande as possibilidades de obtenção de um produto com características diferenciadas.

Processos fermentativos já são utilizados para biossíntese de vitaminas, principalmente a cobalamina e a riboflavina, havendo ainda processos patenteados. Por exemplo, *P. denitrificans* é usada exclusivamente em processos industriais para produção de cobalamina pela empresa Sanofi-Aventis (MARTENS et al., 2002). O FDA (*Food and Drug Administration*) também considera como GRAS (*Generally recognized as safe*) algumas vitaminas produzidas biotecnologicamente, como a riboflavina biosintetizada por *Eremothecium ashbyii* e a cobalamina por *Streptomyces griseus*. (USFDA, 2013).

Vitaminas do complexo B podem ser produzidas por diversos micro-organismos sendo que a produção varia entre as espécies e entre linhagens da mesma espécie, sendo dependente de diversos fatores como: tempo, temperatura, pH, substrato, etc.

Dentre os fungos, Cheng et al. (2011), estudaram a produção de riboflavina por *Eremothecium ashbyii*, avaliando os efeitos de diferentes fontes de carbono alcançando uma produção máxima de 3107,59 mg/L de riboflavina. Já Suzuki, Fleuri e Macedo (2012) avaliaram a produção de riboflavina por *Candida sp*, estudando os efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, resultando em uma produção de 105,7 µg/mL de riboflavina. Wei et al. (2012) estudaram o isolamento de *Ashbya gossypii* com ultravioleta, gerando uma linhagem mutante capaz de produzir 8,12 g/L de riboflavina, com potencial para aplicação na produção em escala industrial dessa vitamina.

A produção microbiológica de biotina foi estudada por El-Refai et al. (2010) que demonstraram a eficiência do delineamento experimental multifatorial na produção de biotina por *Rhizopus nigricans*. Já Hong et al. (2006) estudaram a produção de biotina pela levedura *Candida utilis*, utilizando técnicas de recombinação genética para otimizar a produção dessa vitamina. Masuda et al. (1995) também utilizaram micro-organismos recombinantes para produção de biotina (*Escherichia coli* e *Serratia marcescens*) alcançando uma produção máxima de 600 mg/L.

1.2.1 Fluorimetria na determinação de riboflavina

Durante os últimos 20 anos houve um considerável crescimento no uso da fluorescência nas ciências biológicas, sendo o ensaio realizado por fluorimetria uma das principais ferramentas nos campos da bioquímica e biofísica. Com isso a fluorescência é atualmente, uma técnica utilizada amplamente na área da biotecnologia como na citometria de fluxo, diagnósticos médicos, sequenciamento de DNA, ciências forenses, análises genéticas, análises de alimentos, entre outros (LAKOWICZ, 2009).

A fluorescência é uma ferramenta amplamente utilizada na investigação de sistemas vivos a nível molecular e supramolecular. Polímeros, soluções de surfactantes, membranas biológicas, proteínas, ácidos nucleicos e células vivas são exemplos de estruturas que podem ser analisadas por fluorescência. Assim as técnicas baseadas em fluorescência são amplamente utilizadas devido às vantagens oferecidas por esse método em termos de sensibilidade, seletividade e tempo de resposta (VALEUR, 2012).

Além disso, de acordo com Woollard e Indyk (2002), apesar da espectrofotometria (440 nm) ser utilizada amplamente na detecção de riboflavina, a fluorescência é o método mais indicado em análises realizadas com baixas concentrações de riboflavina devido à sensibilidade deste método.

1.3 ENZIMAS MICROBIANAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

O efeito das propriedades catalíticas das enzimas promoveu a introdução destas em inúmeros processos e produtos industriais. Desenvolvimentos recentes no campo da biotecnologia, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e evolução dirigida, forneceram importantes ferramentas no desenvolvimento de novas enzimas, resultando assim no surgimento de enzimas com propriedades aperfeiçoadas de acordo com a sua aplicação e na obtenção de enzimas características para novas áreas de aplicação, nas quais não se utilizava tais catalisadores biológicos (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

A utilização de enzimas em processos industriais vem crescendo a cada ano. Para que uma enzima tenha uso comercial, esta deve apresentar: uma qualidade superior aos produtos geralmente utilizados, tornando possível um menor custo para indústrias, atuando também na obtenção de produtos indisponíveis ou pouco disponíveis (GOMES

et al. 2007). O custo de produção de enzimas ainda é um grande obstáculo para uma aplicação industrial mais ampla. Justifica-se desta forma a produção de enzimas microbianas em resíduos e fermentação em estado sólido de baixo custo, a fim de viabilizar a comercialização destes biocatalisadores (SINGHANIA et al., 2009). A procura de enzimas industriais, particularmente de origem microbiana, é cada vez maior devido às suas aplicações em uma ampla variedade de processos, sendo alternativas atraentes aos métodos químicos que não apresentam alta especificidade.

Enzimas importantes na indústria de alimentos são utilizadas com o intuito de influenciar a composição final do produto, obtendo-se este com características sensoriais desejáveis. O interesse no uso de enzimas para o processamento de alimentos ocorre devido à sua especificidade de ação, ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições brandas de pH, temperatura e pressão, fácil controle da reação e pequena toxicidade (OLSEN, 2008).

Um exemplo de enzimas com aplicação industrial ampla e bem estabelecida são as amilases e pectinases, as quais possuem a capacidade de fazer a redução da viscosidade dos sucos de frutas facilitando o processo de clarificação. Outras enzimas dividem o percentual de utilização geral na indústria, sinalizando sua importância. Algumas delas são: Proteases de *Bacillus* sp., com 30% a 35%; Amilase de *Bacillus* sp., com 10% a 12%, Renina bovina, com 10% a 12%; Glicoamilase com presença de 8% a 10%; glicoisomerase com 5% a 7%; renina microbiana 2% a 4%; pectinases 4% a 5%; pancreatina 2% a 4%; papaína e bromelina 4% a 6%; lipases 2% a 3% e 5% a 10% são de outras enzimas. As principais indústrias consumidoras de enzimas são: detergentes, com 40% a 45% do consumo de enzimas industriais; processamento de amido - 20% a 25%; laticínios - 12% a 15%; cervejarias - 2% a 4%; sucos de frutas e vinhos - 3% a 5%; panificação - 1% a 2%; têxtil e papel - 4% a 6%; couro - 1% a 2% e as outras indústrias de 6% a 10% (BORZANI et al., 2001).

1.4 LIPASES DE LEVEDURAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, um importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases e as esterases estão associadas ao metabolismo, à hidrólise dos lipídeos e são amplamente distribuídas na natureza (GONÇALVES, 2007). O crescimento de aplicação comercial desta enzima é

significativo e promissor particularmente na indústria de alimentos nos últimos 35 anos (ARAVINDAN et al., 2007).

As lipases estão entre os mais importantes biocatalisadores que realizam reações tanto em meio aquoso quanto não aquoso, o que se deve principalmente à sua capacidade de utilizar uma ampla gama de substratos, alta estabilidade para extremos de temperatura, pH e solventes orgânicos. As lipases de origem microbiana apresentam uma vasta aplicação, visto que os micro-organismos podem ser facilmente cultivados e suas lipases podem catalisar uma variedade de reações hidrolíticas e sintéticas. As lipases se aplicam a uma variedade de campos da biotecnologia, como nos alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, têxteis, cosméticos, agroquímicos e oleoquímicos das indústrias (NAIK et al., 2010).

As lipases microbianas são as preferidas para aplicações comerciais devido às suas múltiplas propriedades, fácil procedimento de extração, facilidade de manuseio, ampla tolerância do substrato, estabilidade a altas temperaturas e suprimento ilimitado. Possuem uma notável capacidade para realizar uma grande variedade de transformações químicas, regio e enantiosseletivas. Seus substratos naturais são triacilgliceróis com baixa solubilidade em água. As lipases têm sido utilizadas em resolução de fármacos quirais, modificação de gorduras, síntese de substituintes da manteiga de cacau, biocombustíveis, síntese de produtos para cuidados pessoais e realçadores de sabor (NAIK et al., 2010).

De acordo com Treichel et al. (2010) as principais espécies de leveduras produtoras de lipase são *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformans*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichia stewartii*, *Pichia xyloa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis crataegensis* e *Torulaspora globosa*. Apesar das lipases de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* serem amplamente estudadas e aplicadas, existem inúmeras publicações recentes (Tabela 2) constatando a produção de lipase por outras leveduras, o que reforça a importância da bioprospecção de novas espécies produtoras desta enzima.

Tabela 2: Leveduras citadas na literatura recente consideradas potenciais produtores de lipase.

Levedura	Referência
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Potumarthi et al. (2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Dominguez et al. (2003), Lopes et al. (2009), Alonso et al. (2005), Kar et al. (2008), Fickers et al. (2006), Amaral et al. (2007), Darvishi et al. (2011)
<i>Candida utilis</i>	Grbavcic et al. (2007)
<i>Trichosporon asahii</i>	Kumar e Gupta (2008)
<i>Candida rugosa</i>	Benjamin e Pandey (2001), Rajendran, Palanisamy, Thangavelu (2008), Boareto et al. (2007), Puthli, Rathod e Pandit (2006), Zhao et al. (2008)
<i>Candida cylindracea</i>	Kim e Hou (2006), D'Annibale et al. (2006), Salihu et al. (2011)
<i>Candida sp</i>	He e Tan (2006)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Liu et al. (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ciafardini, Zullo e Iride (2006)
<i>Williopsis californica</i>	Ciafardini, Zullo e Iride (2006)
<i>Debaryomyces sp</i>	Papagora, Roukas e Kotzekidou (2013), Bussamara et al. (2010)
<i>Mrakia blollopis</i>	Tsuji et al. (2013)

Segundo Gonçalves (2007) as lipases apresentam ampla aplicação tecnológica, desta forma verifica-se a necessidade da pesquisa por novas cepas de micro-organismos produtores. De acordo com Bussamara et al., (2010) embora a maioria dos estudos de lipases de leveduras abordar as espécies acima mencionadas, existem algumas leveduras produtoras de lipase emergentes, que representam uma esperança para a inovação biotecnológica nesta área. Constata-se também a necessidade de se avaliar leveduras com relação à atividade lipolítica, principalmente por apresentarem características específicas que diferem das lipases provenientes de fungos filamentosos.

1.5 TAXONOMIA MOLECULAR DE LEVEDURAS

Desde a descoberta, a mais de cem anos atrás, que as leveduras existem em uma variedade enorme de espécies, a identificação correta das leveduras tem sido um requisito primordial para pesquisadores em vários campos da ciência. O conhecimento das espécies de micro-organismos proporciona acesso a sua filogenia e taxonomia

permitindo a previsão das suas características fisiológicas. A identificação de novas espécies de forma correta é essencial, prevenindo desta forma que informações errôneas apareçam nas bases de dados em biologia molecular (SPENCER et al., 2011).

Em relação aos alimentos, as leveduras são conhecidas pelas contribuições benéficas à sociedade, principalmente nos processos fermentativos associados à produção de pão, bebidas alcoólicas entre outros produtos. Contudo as leveduras podem causar a deterioração dos alimentos, e em determinadas ocasiões, esta atividade não desejada, não é percebida ou estimada tornando-se um problema para as indústrias (FLEET, 1992). Sendo assim, destaca-se a importância da identificação precisa das espécies de leveduras já que é essencial diferenciar as linhagens que causam a deterioração dos alimentos das espécies que apresentam atividade benéfica ao produto. Profissionais da medicina, por exemplo, necessitam da identificação precisa de leveduras para determinar o tratamento correto das espécies patogênicas, e a legislação de patentes também requer uma determinação precisa das espécies de leveduras relevantes (SPENCER et al., 2011).

As análises de sequência de DNA transformaram a maneira com que as leveduras são identificadas. As comparações das sequências de genes disponibilizam ferramentas capazes de diferenciar espécies que apresentam alta proximidade, bem como também táxons distantes, e assim bancos de dados são criados, expandidos e disponibilizados para utilização futura (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

O rDNA (DNA ribossômico) é amplamente empregado em estudos envolvendo taxonomia de micro-organismos, devido à presença de regiões de DNA codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes taxas, e também pelo fato dos ribossomos estarem presentes em todos os organismos, a partir de uma origem evolutiva comum (MAUTONE et al., 2010). A região D2 da subunidade maior do rRNA (RNA ribossômico) foi inicialmente examinada e definida como capaz de distinguir espécies que apresentam alta proximidade, estas espécies foram descritas por meio de experimentos de cruzamentos genéticos e reassociação de DNA. Este trabalho foi expandido, incluindo as regiões D1 e D2, sendo aplicado em todas as espécies de leveduras da classe ascomiceto, resultando desta forma em uma ferramenta rápida para identificação de espécies de leveduras. Posteriormente Fell et al. (2000) desenvolveram um banco de dados complementar para identificação de leveduras da classe basidiomiceto (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

100 amostras de solo, flores, frutos foram coletadas da Mata Atlântica no Parque Estadual da cidade de Ilha Bela (SP) e da região de transição entre Mata Atlântica e na região de transição Cerrado – Mata Atlântica presente na região de Campinas. Autorização de acesso e de remessa de amostras de componente do patrimônio genético nº 010662/2013-8 (Anexo A).

As amostras foram colocadas em frascos esterilizados e transportadas ao laboratório. Foram realizadas diluições seriadas em soluções de água estéril (10 mL), utilizando-se inicialmente 1 g de cada amostra. Alíquotas de cada diluição foram plaqueadas através da técnica de semeadura em superfície no meio de cultura Agar extrato de levedura (YMA) suplementados com clorofenicol (50 ppm, grau farmacêutico) para inibição de crescimento bacteriano. As placas de Petri foram mantidas em estufa a 30°C de 24 a 72 horas. A cada 24 horas, foram observadas e retiradas colônias puras para *slants* do mesmo meio de cultivo em tubos inclinados. Os tubos por sua vez, foram incubados a 30°C até crescimento favorável da linhagem.

2.2 CLASSIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

As linhagens de leveduras foram conservadas em meio (YMA) para caracterização morfológica. O número de colônias puras obtidas foi contado e cada uma recebeu um número sequencial. Estas linhagens foram incorporadas à coleção de micro-organismos selvagens do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, DCA, FEA.

Para preservação em ultrafreezer, de acordo com Hunter-Cevera e Belt (1996) e Snell (1991) as leveduras foram inoculadas em placas contendo meio ágar - extrato de levedura (YMA) e incubadas a 30°C. Após o período de incubação foi verificado a pureza da cultura através da coloração de Gram e observação macroscópica da cultura. Posteriormente a verificação da pureza, uma suspensão celular foi realizada raspando delicadamente a superfície de crescimento da cultura e inoculando em tubo estéril contendo 10 mL de glicerol 10%. O tubo foi homogeneizado e foram distribuídos

aproximadamente 1 mL da suspensão em cada criotubo, o qual foi colocado no congelador por (-20°C) por cerca de 20 minutos. Esse resfriamento tem a função de permitir que o crioprotetor envolva inteiramente as células, aumentando a sua ação de proteção. Após o resfriamento o criotubo foi transferido para ultrafreezer (-80°C) sendo acondicionados adequadamente para armazenamento das culturas.

A contagem das unidades formadoras de colônia foi realizada concomitantemente à preparação dos criotubos de congelamento. A partir da suspensão original (que foi preservada), foram retirados 100 µl e homogeneizados em tubo contendo 900 µl de ágar 0,1% (diluição 10⁻¹). Da solução resultante foram retirados 100 µl (divido em três gotas) e inoculados no primeiro quadrante em uma placa (dividida em quatro quadrantes) contendo o meio ágar - extrato de levedura (YMA).

Foram transferidos 10 µl do tubo contendo a diluição (10⁻¹) e homogeneizados em tubo contendo 990 µl de ágar 0,1% (10⁻³). Inoculando assim 100 µl da solução resultante (divido em três gotas) no segundo quadrante.

Para o terceiro quadrante, foram transferidos 10 µl do tubo contendo a diluição (10⁻³) e homogeneizados em tubo contendo 990 µl de ágar 0,1% (10⁻⁵). Inoculando as três gotas da solução resultante.

E por fim no último quadrante foram transferidos 10 µl do tubo contendo a diluição (10⁻⁵) e homogeneizados em tubo contendo 990 µl de ágar 0,1% (10⁻⁷). Inoculando assim 100 µl da solução resultante (divido em três gotas).

Após a secagem das gotas, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e a estimativa de viabilidade da cultura foi feita por meio de contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (Figura 4). Diluições contendo 10 a 30 colônias foram escolhidas para a contagem. A equação a seguir é utilizada para estimativa do número de UFC/mL.

$$N^0 \text{ de colônias / mL} = (n^0 \text{ de colônias em } 0,1 \text{ mL} = 3 \text{ gotas}) \times 10 \times (\text{fator de diluição}) / 1 \text{ mL de suspensão inoculada no criotubo}$$

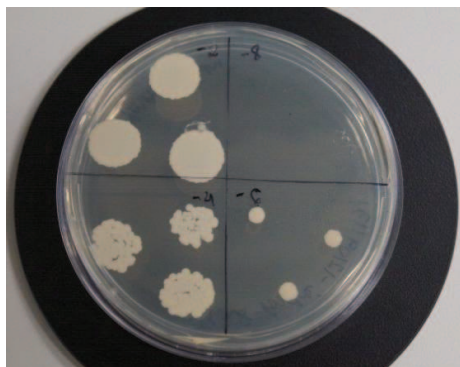


Figura 4: Placa de petri dividida em 4 quadrantes para a contagem de UFC.

A checagem da pureza da cultura a ser preservada foi realizada pela sua observação microscópica, através da coloração de gram. A pureza também é checada por observação macroscópica das colônias na placa de contagem no pré-congelamento. O ágar presente na suspensão tem a função de evitar que as gotas se espalhem na placa.

O processo de pré-congelamento para estimativa do número de UFC/mL foi realizado a cada três meses para checagem da eficiência do processo de preservação das culturas.

2.3 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE

2.3.1 Triagem semiquantitativa em meio sólido diferencial

As linhagens isoladas de leveduras foram inoculadas em placas de petri em 15 mL de meio sólido diferencial, para a verificação da síntese e da estimativa da produção de lipase. O meio foi composto de: 15,0 g de Agar-agar; 10,0 g de peptona; 5,0 g de NaCl; 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 mL de Tween 80 para 1,0 L de água (SIERRA, 1957). Depois que os micro-organismos foram incubados por 48 horas na temperatura de 30°C, as placas foram colocadas em geladeira (4°C) por mais 48 horas. A detecção da atividade da lipase foi baseada na observação de um halo formado ao redor das colônias, sendo o índice de atividade enzimática (IE), determinado pela relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo (figura 5), segundo Hankin e Anagnostakis (1975).

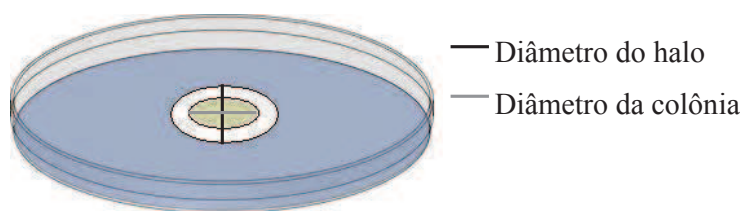


Figura 5: Ilustração exemplificando as medidas do diâmetro do halo e da colônia utilizados no cálculo do índice de atividade enzimática

$$IE = \text{Diâmetro do halo} / \text{Diâmetro da colônia}$$

2.3.2 Análise quantitativa com ensaio de atividade enzimática

A análise quantitativa da produção de lipase foi realizada com o meio de cultura líquido descrito por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), composto de 5% de água de maceração de milho, 1% de óleo de soja, 1% de óleo de oliva e 0,5% de nitrato de amônio. Assim 1 mL de suspensão de células, obtida por adição de 5 mL de água destilada estéril a culturas dos micro-organismos em tubo de ensaio inclinado contendo extrato de levedura (YMA) e incubado por 72 horas a 30⁰C, foram adicionados a frascos com 75 mL do meio descrito e foram incubados a 30⁰C com agitação de 150 rpm por 48 horas em agitador orbital New Brunswick G-25 em duplicata para cada micro-organismo. Após o desenvolvimento das culturas, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm à temperatura de 10⁰C, por 15 minutos em centrífuga Hitachi Himac CRGII. No sobrenadante foi medida a atividade da lipase.

A atividade lipolítica das lipases foi mensurada em um sistema composto por: 5 mL de emulsão composto por óleo de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (proporção de 25% de óleo de oliva para 75% de solução de goma); 2 mL de tampão Fosfato pH 7,0, 0,1 mol/L e 1 mL de sobrenadante. O sistema foi incubado a 37⁰C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada com a adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1, em volume), e os ácidos graxos liberados titulados contra solução de NaOH 0,05 mol/L. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto, por 1 mL do sobrenadante, nas condições descritas.

Cálculo de atividade enzimática:

$$U = \Delta \mu\text{mols de ácido oleico liberado} / \text{Tempo de reação (min)} \times \text{Volume de sobrenadante (mL)}$$

$\Delta \mu\text{mols de ácido graxo liberado} = \text{Volume de NaOH titulado contra amostra} - \text{Volume de NaOH titulado contra o branco composto de H}_2\text{O destilada}.$

Tempo de reação = 30 minutos

Volume de sobrenadante = 1 mL

2.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE VITAMINAS DO COMPLEXO B

As linhagens isoladas foram inoculadas, por meio de uma alçada simples, em meio líquido conforme descrito por Strzelczyk, Dahm e Pachlewski (1991), contendo: glicose, 20.0 g; maltose, 5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 0.5 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; $\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COO})_3\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$, (1% solução), 0.5 mL; ZnSO_4 (0.2% solução), 0.5 mL; tiamina 50 μg ; H_2O destilada, 1000 mL. Cada linhagem foi cultivada em frascos contendo 25 mL do meio descrito acima, durante 72 horas em agitador orbital Brunswick G-25 a 150 rpm, 30⁰ C. Posteriormente a biomassa foi separada do meio de cultura com centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos em centrífuga Hitachi Himac CRGII. A determinação da concentração de biotina e riboflavina foi realizada no sobrenadante.

2.4.1 Determinação de Biotina por espectrofotometria com reagente HABA/Avidin

O reagente HABA/Avidin H2153 (Sigma-Aldrich[®]) foi utilizado para a determinação espectrofotométrica de biotina. O ensaio é baseado na ligação do corante HABA com avidina e na habilidade da biotina de substituir o corante em proporções estequiométricas (Figura 6). Essa troca de ligantes é acompanhada por uma mudança na absorbância a 500 nm que possui um coeficiente de extinção conhecido.

Desta forma foram pipetados 900 μL do reagente HABA/Avidin em uma cubeta de 1 mL e em seguida foi realizada a leitura a 500 nm em espectrofotômetro Beckman

DU-640. Adicionou-se 100 µL de sobrenadante, misturando-o por inversão, para ser realizada uma segunda leitura a 500 nm. Nos casos de amostras coloridas, um branco foi preparado: diluindo-se 100 µL do meio com 900 µL de água destilada pra então ser feita a leitura a 500 nm.

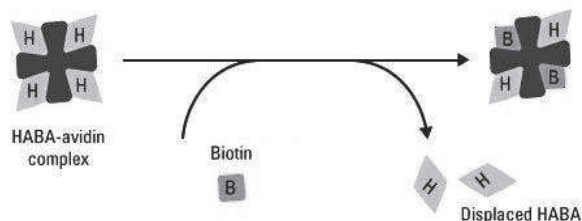


Figura 6: Bases químicas da detecção de biotina baseada no equilíbrio HABA/Avidina.

Cálculo da concentração de biotina:

$$a) \Delta \text{ Absorbância } 500 \text{ nm} = 0.9 A^{(\text{Haba/avidin}/500)} + A^{(\text{branco}/500)} - A^{(\text{Haba/avidin+amostra}/500)}$$

sendo 0.9 = fator de diluição da HABA/avidin com relação à adição da amostra.

$$A^{(\text{branco}/500)} = 0,0360 \text{ obtido através da média das leituras feitas no Espectrofotômetro.}$$

$$b) \mu\text{mol biotina} / \text{mL} = (\Delta \text{ Absorbância } 500 \text{ nm} / 34) \times 10$$

sendo 34 = mmol/L coeficiente de extinção a 500 nm.

10 = fator de diluição da amostra na cubeta.

2.4.2 Determinação de Riboflavina por espectrofotometria

Semelhante à Goodwin (1955) e Ming, Pizarro e Park (2003) uma alíquota de 0,8 mL do sobrenadante foi misturada com 0,2 mL de NaOH 1N e 0,4 mL da solução resultante foi neutralizada com tampão Fosfato de Potássio 0,1 mol/L (pH 6,0). Posteriormente foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro Beckman DU-640 a 440 nm.

2.4.3 Determinação de Riboflavina por fluorimetria

O presente trabalho adotou a estratégia realizar a seleção inicial das leveduras produtoras de riboflavina pelo método espectrofotométrico e posteriormente, realizar uma avaliação mais sensível das linhagens que apresentaram riboflavina no sobrenadante utilizando o método fluorimétrico.

Com isso a concentração de riboflavina no sobrenadante foi determinada pelo método adaptado de Knorr et al. (2007), no qual diferentes concentrações de riboflavina foram diluídas em tampão acetato pH 5,0, 0,1 mol/L (elaboração de curva padrão) e pipetados em microplaca preta de 96 poços com fundo plano e volume de trabalho de 280 μ L, realizando as leituras em fluorímetro FLUOstar OPTIMA - BMG Labtech.

A concentração de riboflavina foi diretamente relacionada com os valores de fluorescência obtidos a um comprimento de onda de excitação (485 nm) e emissão (520 nm). Os sobrenadantes foram diluídos também em tampão acetato pH 5,0, 0,1mol/L e, após a leitura em fluorímetro nas mesmas condições descritas anteriormente, a concentração de riboflavina foi determinada pela comparação dos valores de fluorescência com a curva padrão.

2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS RP.C153 E RP.J1308

2.5.1 Extração do DNA de levedura

De acordo com Sampaio et al. (2000) e Almeida (2005), em um microtubo de 2 mL foram colocadas de duas a três espátulas de esferas de vidro (Sigma), 500 μ l de solução de lise (Tris 50 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, NaCl 250 mmol/L e SDS 0,3%, pH 8,0 e esterilizada por filtração) e duas alças com as células da levedura a ser identificada. O microtubo foi agitado em vortex por 4 minutos e incubado em banho-maria por uma hora a 65°C. O procedimento de agitação em vortex e incubação em banho-maria foi realizado novamente e posteriormente o microtubo foi centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm. Após a centrifugação, a fase aquosa foi recuperada (aproximadamente 400 μ l) e transferida para um microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 600 μ l de isopropanol a fase recuperada e o microtubo foi armazenado a -20°C por 60 minutos. Posteriormente foi realizada uma centrifugação por 5 minutos a 40C a 12.000 rpm, e o pellet foi lavado com 300 μ l de etanol 70% previamente

armazenado em freezer. A centrifugação e a lavagem com etanol foram repetidas, e o microtubo com o pellet foi deixado em estufa a 30°C para secagem. Após a secagem o pellet foi resuspenso em 50 µl de água MilliQ. Por fim foram acrescentados 2,0 µl de RNase e o microtubo foi incubado em banho-maria a 37°C durante uma hora.

Os testes de quantificação do DNA foram realizados em gel de agarose 1% adicionado do corante *SYBR® Green*. Aliquotas de 2 µL de cada amostra foram misturadas com 2 µL de tampão (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose). O DNA foi quantificado no gel por comparação com um padrão de DNA de concentração conhecida λ-DNA (50 ng/µL). Após corrida eletroforética, o gel foi observado sob luz ultravioleta e, a intensidade de fluorescência das amostras de DNA, comparada com a do padrão.

2.5.2 Amplificação e sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do DNA ribossômico

A reação de PCR (*polimerase chain reaction*) para amplificação da região D1/D2 do gene 26S rDNA das linhagens RP.C153 e RP.J1308 foi realizada utilizando os primers NL1 5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' e NL4 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3' em termociclador GeneAmp PCR System 9700. Desta forma 1 µL do DNA obtido foi adicionado a uma mistura contendo, 2,5 µL do tampão de reação 10x (Promega), 0,2 µL de dNTP's (50 mmol/L cada), 0,75 µL de MgCl₂ (Promega), 0,5 µL do primer NL1 (5 mmol/L), 0,5 µL do primer NL4 (5 mmol/L), 0,4 µL da enzima Taq DNA polimerase (Promega) e 15,5 µL de H₂O deionizada. A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e alongamento a 72°C por 1 minuto, seguido pela incubação final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente os produtos da PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% adicionado do corante *SYBR® Green*, sendo o gel observado sob luz ultravioleta para verificação da reação de amplificação (BAUTISTA-GALLEGO et al, 2011).

Após a confirmação da amplificação, os produtos da PCR foram purificados com auxílio do Kit (*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification GE®*), sendo os produtos submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%, para

verificação da purificação. Assim os produtos da purificação foram submetidos à reação de sequenciamento que foi realizada com o kit BigDye (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante, e os produtos foram sequenciados no sequenciador Genetic Analyzer 3500 XL (Applied Biosystems).

2.5.3 Análise das sequências e filogenia

As sequências do gene 26s do DNA ribossômico foram montadas com o programa DNA Baser - Sequence Assembler. As sequências de DNA foram analisadas através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível no website do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). A identificação das espécies foi baseada no escore máximo, na identidade e no valor de cobertura. A árvore filogenética foi elaborada com o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) disponível no site (<http://www.megasoftware.net/>) (KUMAR; TAMURA; NEI, 1994).

A etapa de identificação molecular dos isolados RP.C153 e RP.J1308 foi realizada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) presente no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em parceria com a Dra Derlene Attili de Angelis com o objetivo de disseminação das linhagens potenciais produtoras dos biocompostos analisados.

2.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em duplicata e triplicata, empregando a média e desvio padrão para a análise dos resultados. Quando necessária à comparação entre os valores, foi aplicado o teste de Tukey.

A árvore filogenética foi gerada utilizando o método estatístico *neighborjoining* (KUMAR; TAMURA; NEI, 1994).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Em trabalho de campo foram coletadas 37 amostras de solo da Mata Atlântica no Parque Estadual da cidade de Ilha Bela e 16 amostras da região de transição entre Mata Atlântica e Cerrado presente na cidade de Campinas, sendo isoladas dessas amostras 68 leveduras provenientes da Mata Atlântica e 64 da região de transição (Tabela 3), as quais passaram a integrar a Coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos FEA-UNICAMP que já contava com 300 micro-organismos (Tabela 4) provenientes do solo de diferentes plantações de cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo, e que foram isolados em trabalho realizado por Suzuki, Fleuri e Macedo (2012). As leveduras provenientes da região de Ribeirão Preto, Ilha bela e Campinas foram identificadas com as letras (RP), (IB) e (C) respectivamente e classificadas com numeração e letra de acordo com as amostras de solo das quais foram isoladas.

Tabela 3: Leveduras isoladas de amostras de solo provenientes da região de Mata Atlântica e da região de transição entre Mata Atlântica/Cerrado.

Mata Atlântica - Ilha Bela									
IB.01A	IB.01B	IB.03A	IB.03B	IB.04A	IB.04B	IB.04C	IB.05A	IB.07A	IB.07B
IB.08A	IB.08B	IB.10A	IB.10B	IB.11A	IB.12A	IB.12C	IB.13A	IB.14A	IB.14B
IB.15A	IB.16A	IB.17A	IB.17B	IB.17C	IB.21A	IB.23A	IB.23B	IB.23C	IB.26B
IB.26C	IB.27A	IB.27B	IB.27C	IB.28B	IB.29A	IB.29B	IB.29E	IB.31B	IB.31D
IB.32B	IB.32C	IB.32D	IB.33A	IB.33B	IB.33C	IB.34A	IB.35A	IB.35B	IB.36A
IB.37A	IB.39A	IB.40B	IB.41A	IB.41B	IB.41C	IB.41D	IB.45A	IB.45B	IB.45C
IB.46A	IB.46B	IB.47A	IB.47C	IB.47D	IB.48A	IB.50A	IB.50B		
Mata Atlântica/Cerrado - Campinas									
C.01A	C.01B	C.01C	C.01D	C.02A	C.02B	C.03A	C.03B	C.03C	C.03D
C.03E	C.03F	C.04A	C.04B	C.04C	C.04D	C.05A	C.05B	C.05C	C.05D
C.06A	C.07A	C.07B	C.08A	C.08B	C.08C	C.08D	C.09A	C.09B	C.09C
C.09D	C.09E	C.09F	C.10A	C.10B	C.10C	C.10D	C.11A	C.13A	C.13B
C.13C	C.13D	C.13E	C.14A	C.14B	C.14C	C.14D	C.14E	C.14F	C.14G
C.14H	C.14I	C.14J	C.14K	C.15A	C.15B	C.15C	C.15E	C.16A	C.16B
C.16C	C.16D	C.16E	C.16F						

Tabela 4: Leveduras provenientes da região de Cerrado previamente presentes na Coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

Cerrado - Ribeirão Preto						
RP.A208	RP.A238	RP.A242	RP.A246	RP.A248	RP.A249	RP.A250
RP.A251	RP.A252	RP.A253	RP.A254	RP.A256	RP.A259	RP.A260
RP.A261	RP.B131	RP.B200	RP.B212	RP.B229	RP.C144	RP.C146
RP.C147	RP.C148	RP.C149	RP.C151	RP.C153	RP.C154	RP.C155
RP.C156	RP.C159	RP.C163	RP.C166	RP.C170	RP.C171	RP.C173
RP.D58	RP.D64	RP.D72	RP.D83	RP.E12	RP.E16	RP.E17
RP.E1	RP.E19	RP.E22	RP.E235	RP.F208	RP.F265	RP.F269
RP.C162	RP.D65	RP.D74	RP.D77	RP.E10	RP.E13	RP.E226
RP.G21	RP.G22	RP.G25	RP.G26	RP.G27	RP.G30	RP.G31
RP.G33	RP.G34	RP.G35	RP.G36	RP.G37	RP.G40	RP.H03
RP.H130	RP.H205	RP.H21	RP.I102	RP.I108	RP.I27	RP.I30
RP.I72	RP.J1135	RP.J1206	RP.J1207	RP.J1215	RP.J1222	RP.J1238
RP.J1308	RP.J1430	RP.J1512	RP.J1541	RP.J1628	RP.J1631	RP.J1701
RP.J1717	RP.J1718	RP.K1436	RP.K1639	RP.K1729	RP.LNA	RP.LNB
RP.LSc1	RP.LRr2	RP.LRr3	RP.LSc4	RP.M17	RP.M19	RP.M19
RP.M20	RP.M20B	RP.M20L	RP.M21	RP.M22	RP.M23	RP.M24
RP.M25	RP.M26	RP.M27	RP.M28	RP.N04	RP.N08	RP.N10
RP.N12	RP.N13	RP.N17	RP.N19	RP.O131	RP.O132	RP.O139
RP.O141	RP.O143	RP.O144	RP.O58	RP.O59	RP.O61	RP.O64
RP.O73	RP.P118	RP.R71	RP.R85	RP.T150	RP.X158	RP.A1.41
RP.A1.42	RP.A1.44	RP.A1.46	RP.A1.58	RP.A1.61	RP.A1.62	RP.A1.63
RP.P03	RP.P130	RP.P168	RP.P205	RP.P02	RP.Q110	RP.Q198
RP.Q216	RP.Q32	RP.Q91	RP.Q93	RP.Q99	RP.R93	RP.R96
RP.SC	RP.T146	RP.T147	RP.T149	RP.T154	RP.T155	RP.T156
RP.T163	RP.T168	RP.T171	RP.T173	RP.U11	RP.V89	RP.W06
RP.X134	RP.X136	RP.X140	RP.X142	RP.X146	RP.X148	RP.X149
RP.X150	RP.X151	RP.X153	RP.X153	RP.X154	RP.X155	RP.X157
RP.Y162	RP.Y164	RP.Y166	RP.Y173	RP.Y175	RP.YSC	RP.Z102
RP.Z103	RP.Z104	RP.Z105	RP.Z107	RP.Z109	RP.Z110	RP.Z111
RP.Z113	RP.Z114	RP.Z117	RP.Z118	RP.Z123	RP.Z124	RP.A1.60
RP.E1.129	RP.E1.204	RP.E1.206	RP.E1.212	RP.E1.213	RP.E1.218	RP.E1.220
RP.E1.227	RP.E1.229	RP.F1.100	RP.F1.176	RP.F1.177	RP.F1.189	RP.F1.83
RP.F1.85	RP.F1.86	RP.F1.88	RP.F1.91	RP.F1.99	RP.G1.16	RP.G1.186
RP.G1.190	RP.G1.196	RP.G1.33	RP.G1.34	RP.G1.40	RP.G1.41	RP.G1.45
RP.G1.46	RP.H1.130	RP.H1.131	RP.H1.219	RP.I1.26	RP.I1.27	RP.I1.29
RP.I1.30	RP.I1.33	RP.I1.39	RP.I1.42	RP.I1.43	RP.I1.46	RP.I1.48
RP.I1.49	RP.I1.50	RP.J1.130	RP.J1.130	RP.J1.208	RP.J1.210	RP.J1.219
RP.J1.234	RO.J1.235	RP.J1.SC	RP.J1.SC	RP.K1.23	RP.L1.153	RP.L1.176
RP.L1.177	RP.L1.178	RP.L1.207	RP.L1.212	RP.L1.213	RP.U08	RP.U68
RP.V21	RP.Y161	RP.Y174	RP.YSC	RP.YSC	RP.Z119	RP.I1.31
RP.I1.34	RP.I1.36	RP.I1.37	RP.I1.38	RP.I1.44	RP.I1.45	RP.J1.177
RP.J1.226	RP.J1.228	RP.K1.10	RP.K1.11	RP.K1.12	RP.K1.16	RP.K1.17
RP.K1.19	RP.K1.20	RP.K1.21	RP.K1.22	RP.K1.23	RP.K1.24	

3.2 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE LIPASE

3.2.1 Seleção inicial em meio sólido diferencial

A seleção semiquantitativa foi realizada com os 432 micro-organismos presentes na coleção, sendo que 80 (tabela 5) apresentaram a formação de um halo de cristais de cálcio ao redor da colônia (figura 7), evidenciando uma possível produção de lipase extracelular.

Tabela 5: Índice enzimático dos isolados que apresentaram formação de halo de deposição dos cristais de cálcio ao redor da colônia.

Isolado	IE*	Isolado	IE*	Isolado	IE*	Isolado	IE*
RP.A241	1,20	RP.O131	1,33	IB.31B	2,43	IB.48A	2,29
RP.A242	1,60	RP.K1.12	2,00	IB.32C	1,83	C.01C	2,00
RP.A251	1,33	RP.k1.19	2,00	IB.32D	1,75	C.01D	1,80
RP.A253	1,33	IB.03A	1,50	IB.33A	2,00	C.02A	2,20
RP.A256	1,25	IB.03B	2,14	IB.33B	1,86	C.02B	3,00
RP.A261	1,38	IB.04B	3,00	IB.33C	2,25	C.03B	2,30
RP.B131	1,75	IB.05A	2,33	IB.34A	1,38	C.04B	2,00
RP.B200	1,43	IB.07B	2,00	IB.35A	2,00	C.05B	1,80
RP.B212	1,25	IB.08B	1,25	IB.35C	1,71	C.05C	2,00
RP.C149	1,33	IB.10A	2,50	IB.39A	2,33	C.08A	1,60
RP.C151	2,25	IB.12C	1,60	IB.40A	1,50	C.08C	1,80
RP.C154	1,29	IB.17B	2,00	IB.40B	2,17	C.09B	1,10
RP.C166	1,25	IB.17C	2,00	IB.41A	2,80	C.10A	1,50
RP.C153	2,67	IB.21A	2,43	IB.41D	1,11	C.10C	1,80
RP.F208	1,80	IB.23A	3,00	IB.45A	1,50	C.13A	1,50
RP.G37	1,67	IB.23C	2,33	IB.45C	1,70	C.13B	1,50
RP.J1308	2,43	IB.27A	1,88	IB.46A	2,71	C.14A	3,50
RP.J1631	1,43	IB.27B	1,67	IB.46B	1,57	C.14B	1,90
RP.M201	2,20	IB.29A	1,75	IB.47A	1,38	C.15C	2,40
RP.O61	1,43	IB.29B	1,67	IB.47D	1,89	C.15E	1,70

*IE= índice de atividade enzimática, estimado pela relação: diâmetro do halo / diâmetro da colônia.

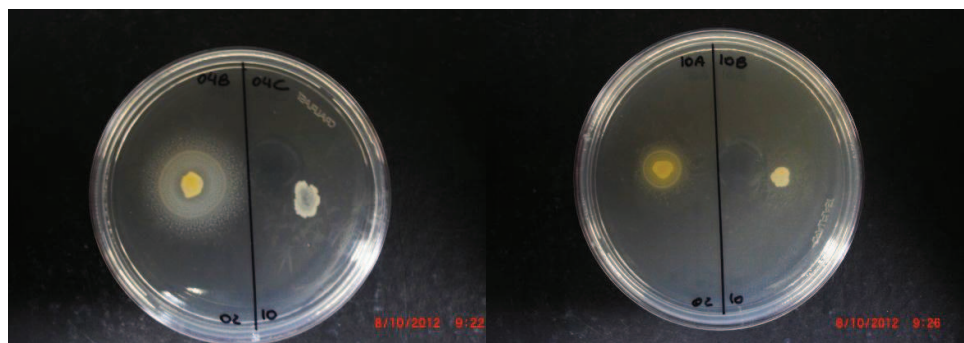


Figura 7: Halo formado pela deposição de cristais de cálcio ao redor das colônias, demonstrando a possível atividade da lipase (esquerda). Linhagem que não apresentou formação de halo ao redor da colônia (direita).

3.2.2 Análise quantitativa da produção de lipase

O meio utilizado por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004) foi utilizado para seleção quantitativa das linhagens que obtiveram o índice de atividade enzimática superior a 2. Assim o cultivo de cada isolado foi realizado em duplicata, sendo a atividade enzimática determinada no sobrenadante. Os valores de atividade enzimática foram estimados de acordo com a curva padrão (Anexo B), que foi elaborada com a titulação de ácido oleico (padrão analítico Synth[®]) em diferentes concentrações, contra solução de NaOH 0,05 mol/L (Tabela 6).

Tabela 6: Atividades enzimáticas das lipases produzidas pelos isolados na etapa de seleção quantitativa. As linhagens destacadas apresentaram médias de atividade enzimática superiores a 20 U/mL.

Isolado	Atividade enzimática	Isolado	Atividade enzimática	Isolado	Atividade enzimática
IB.03B	7,55 ± 0,49 ^{d,e,f}	IB.41A	17,62 ± 0,98 ^{a,b,c}	IB.35A	20,74 ± 1,47^a
IB.04B	10,67 ± 0,98 ^{d,e}	RP.C151	12,76 ± 0,00 ^{b,c,d,e}	IB.39A	21,44 ± 2,46^a
IB.05A	8,24 ± 2,46 ^{d,e,f}	RP.C153	13,45 ± 0,00 ^{b,c,d}	IB.40B	21,09 ± 1,96^a
IB.07B	9,29 ± 0,98 ^{d,e,f}	RP.K1.19	Não detectado	IB.46A	22,13 ± 1,47^a
IB.10A	6,51 ± 0,98 ^{e,f}	C.15C	11,37 ± 0,98 ^{c,d,e}	IB.48A	21,79 ± 0,98^a
IB.17B	6,51 ± 0,00 ^{f,g}	C.01C	17,97 ± 0,49 ^{a,b}	RP.J1308	22,13 ± 0,49^a
IB.17C	7,55 ± 0,00 ^{d,e,f}	C.02A	18,66 ± 0,49 ^{a,b}	RP.K1.12	20,05 ± 0,49^{a,b}
IB.21A	4,08 ± 2,46 ^{f,g}	C.03B	18,31 ± 0,98 ^{a,b}	RP.M201	20,4 ± 0,98^a
IB.23A	7,90 ± 3,44 ^{d,e,f}	C.02B	Não detectado	C.05C	20,49 ± 1,47^a
IB.33A	17,62 ± 0,98 ^{a,b,c}	IB.23C	20,74 ± 0,98^a	C.04B	21,09 ± 0,98^a
IB.33C	17,97 ± 1,47 ^{a,b}	IB.31B	20,40 ± 0,98^a	C.14A	20,74 ± 0,49^a

^{a, b, c} Resultados apresentados como a média da concentração da atividade enzimática (U/mL) (n=2) ± desvio padrão. As médias com letras diferentes apresentaram diferença significativa com p>0,05.

Os resultados de atividade enzimática apresentados são promissores já que 13 linhagens isoladas apresentaram médias de atividade enzimática superiores a 20 U/mL. Em trabalho realizado por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), após a otimização do meio de cultura (o mesmo meio utilizado no presente trabalho) para a produção de lipase por *Geotrichum* sp. foi obtida uma atividade enzimática de 20 U/mL, evidenciando dessa forma o grande potencial das leveduras isoladas neste trabalho, para estudos futuros em relação a produção, otimização e caracterização das lipases produzidas.

Outro micro-organismo que apresta inúmeras aplicações na produção de lipase é a levedura *Candida cylindracea*. Em trabalho realizado por Muralidhar et al. (2001) no qual foi avaliada a otimização da produção de lipase pela técnica de superfície de resposta, foram alcançados valores de 17,30 U/mL utilizando glicose como fonte de carbono e 47,25 U/mL utilizando óleo de oliva como fonte de carbono.

Em trabalho realizado por Najjar et al. (2011) no qual diferentes composições de meios de cultura foram avaliados para produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica*, foi alcançada uma atividade máxima de lipase de 214 U/mL (utilizando a técnica pH-stat com tributirina e óleo de oliva para determinação da atividade enzimática), o que demonstra também o enorme potencial que as leveduras possuem para a produção dessa enzima.

3.3 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE BIOTINA

Os 432 micro-organismos da coleção também foram analisados quanto ao potencial para produção de biotina. Para tanto, após o cultivo e centrifugação, foram realizadas três diluições de todos os sobrenadantes correspondentes a cada linhagem utilizando água destilada, sendo a determinação da concentração de biotina realizada em triplicada para cada diluição. As três diluições foram realizadas variando a concentração do sobrenadante em 50% v/v; 30% v/v e 20% v/v. Os resultados apresentados a seguir, na tabela 7, correspondem à média da concentração de biotina nas diferentes diluições realizadas.

As concentrações de biotina determinadas na tabela 7 foram estimadas de acordo com a curva padrão (Anexo C), que foi elaborada com a leitura de D-Biotina (padrão

analítico Sigma-Aldrich[®]) em diferentes concentrações, a 500 nm de acordo com o kit HABA/Avidin (Sigma-Aldrich[®]).

Tabela 7: Concentrações de biotina presente nos sobrenadantes do cultivo dos isolados em meio líquido.

Isolado	Biotina µg/mL	Isolado	Biotina µg/mL	Cepa	Biotina µg/mL
IB.03B	0,28 ± 0,01 ^g	RP.C154	0,28 ± 0,12 ^g	RP.H21	3,95 ± 0,50 ^f
IB.16A	0,28 ± 0,01 ^g	RP.C156	18,61 ± 0,15 ^a	RP.J1.228	0,28 ± 0,13 ^g
IB.27B	0,28 ± 0,01 ^g	RP.D65	0,28 ± 0,02 ^g	RP.J1308	11,28 ± 0,07 ^c
IB.46B	7,61 ± 0,08 ^c	RP.D74	7,61 ± 0,40 ^c	RP.L1.177	0,28 ± 0,09 ^g
RP.A1.41	0,28 ± 0,01 ^g	RP.D77	11,28 ± 0,20 ^c	RP.L1.207	0,28 ± 0,24 ^g
RP.A1.60	18,61 ± 0,15 ^a	RP.E1.229	3,95 ± 0,12 ^f	RP.U08	0,28 ± 0,56 ^g
RP.A238	0,28 ± 0,01 ^g	RP.E10	18,61 ± 0,01 ^a	RP.X136	0,28 ± 0,01 ^g
RP.A242	7,61 ± 0,02 ^c	RP.E13	7,61 ± 0,01 ^c	RP.Y161	0,28 ± 0,01 ^g
RP.A250	11,28 ± 0,42 ^c	RP.E17	11,28 ± 0,12 ^c	RP.Y164	0,28 ± 0,05 ^g
RP.A252	14,95 ± 0,18 ^b	RP.E22	7,61 ± 0,01 ^c	RP.Z111	3,95 ± 0,12 ^f
RP.A254	0,28 ± 0,12 ^g	RP.E226	7,61 ± 0,01 ^c	RP.Z113	18,61 ± 0,01 ^a
RP.A256	0,28 ± 0,01 ^g	RP.F208	0,28 ± 0,03 ^g	RP.Z118	3,95 ± 0,03 ^f
RP.B131	3,95 ± 0,01 ^f	RP.F265	14,95 ± 0,12 ^b		

^{a, b, c} Resultados apresentados como a média da concentração de biotina presente no sobrenadante das leveduras avaliadas (n=3) ± desvio padrão. As médias com letras diferentes apresentaram diferença significativa com p>0,05.

Após o cultivo em meio líquido, 38 isolados apresentaram biotina no sobrenadante (Tabela 7). Destas linhagens, 34 foram isoladas das amostras de solo provenientes da região de Ribeirão Preto e 4 da Mata Atlântica. As linhagens provenientes da região de Campinas não apresentaram produção de biotina extracelular.

Os trabalhos desenvolvidos nas últimas décadas, envolvendo a produção biotecnológica de biotina, trabalham em sua grande maioria utilizando as técnicas de DNA recombinante. Em trabalho desenvolvido por Masuda et al. (1995) utilizando linhagens de *Serratia marcescens* obtidas por mutagênese, foi alcançada uma produção de biotina 600 mg/L de meio de cultura. Em patente desenvolvida por Kanzaki et al. (2001) uma linhagem recombinante de *E. coli* resistente a treonina foi capaz de produzir 970 mg/mL. Os melhores resultados de produção desta vitamina foram reportados na patente desenvolvida por Bower et al. (2001) os quais utilizaram linhagens recombinantes de *B. subtilis* resistentes a ácido 5-(3-tienil) pentanóico e com o gene *bio*

(gene responsável pela síntese de biotina) superexpresso. Este trabalho alcançou uma produção de biotina superior a 1g/L de meio de cultura.

De acordo com Streit e Entcheva (2003) apesar dos rendimentos alcançados nos estudos acima estarem bem próximos de uma produção rentável, nenhuma das linhagens mencionadas conseguem produzir biotina o bastante para tornar a produção biotecnológica viável. Deve ser levado em consideração que, em muitos destes estudos, ocorreu adição de precursores da biotina durante o cultivo e a fermentação foi realizada em um meio complexo tornando o processo oneroso.

Outros fatores que dificultam a produção microbiológica de biotina são a instabilidade dos plasmídeos nas linhagens recombinantes, a possibilidade de efeitos tóxicos de alguns metabólitos e também o custo dos processos de purificação (HONG et al., 2006). Desta forma destaca-se a importância da bioprospecção de novas linhagens de micro-organismos para a produção de biotina bem como estudos abordando a otimização de produção, análise de metabólitos tóxicos, técnica do DNA recombinante e purificação desta vitamina.

3.4 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE RIBOFLAVINA

3.4.1 Seleção inicial por espectrofotometria

A presença de Riboflavina foi detectada no sobrenadante do cultivo de 64 linhagens das 432 testadas (tabela 8), destas linhagens 20 foram isoladas das amostras coletadas da região da Mata Atlântica, 41 da região de Ribeirão Preto e 3 da região de Campinas. As concentrações de Riboflavina foram estimadas de acordo com a curva padrão (Anexo D), que foi elaborada com a leitura de Riboflavina (padrão analítico Sigma-Aldrich®) em diferentes concentrações a 440 nm.

Tabela 8: Concentrações de riboflavina determinadas por espectrofotometria no sobrenadante dos cultivos dos isolados em meio líquido.

Isolado	Riboflavina µg/mL	Isolado	Riboflavina µg/mL	Isolado	Riboflavina µg/mL
IB.03B	6,97	RP.A1.60	5,29	RP.M21	5,62
IB.04B	10,67	RP.A251	5,62	RP.M22	5,29
IB.07B	5,66	RP.B212	5,29	RP.M25	5,29
IB.08B	5,29	RP.B248	6,97	RP.N17	5,62
IB.10A	11,01	RP.C.Leb	6,3	RP.N19	6,97
IB.10B	11,64	RP.C153	11,68	RP.O141	5,96
IB.12A	11,31	R.PC156	5,96	RP.O144	5,62
IB.12C	7,64	RP.C162	10,34	RP.O64	5,96
IB.14A	6,97	RP.C170	5,62	RP.O73	6,63
IB.21A	9,33	RP.C173	5,62	RP.D58	11,68
IB.23B	5,96	RP.E17	14,71	RPD64	7,98
IB.23C	6,63	RP.E226	5,29	RP.D65	5,62
IB.26B	12,36	RP.E235	6,97	RP.D72	5,29
IB.27A	6,3	RP.F265	7,98	RP.D77	5,62
IB.33A	7,64	RP.F269	5,96	RP.D83	6,63
IB.34A	6,3	RP.II.45	5,96	RP.E01	13,03
IB.41B	5,62	RP.J1.SC	5,29	RP.E10	5,29
IB.41C	14,71	RP.J1135	5,62	RP.E12	7,64
IB.41D	5,29	RP.K1.12	6,63	RP.E16	5,29
IB.47D	5,62	RP.LSc	5,62	C.14A	11,01
RP.A1.41	5,96	RP.M17	5,96	C.12B	14,04
				C.12C	15,39

3.4.2 Avaliação da produção de riboflavina por fluorimetria

As 64 leveduras presentes na tabela 8 foram então, novamente cultivadas no mesmo meio líquido utilizado na seleção inicial e as análises fluorimétricas foram realizadas no sobrenadante de cada cultura. Após o cultivo, o pH do meio de cultura de todas as linhagens foi mensurado, apresentando valores que variavam de 4,0 a 5,8.

Desta forma foi constatada a necessidade de avaliar a interferência do pH na fluorescência intrínseca de riboflavina, já que tal interferência poderia afetar a determinação da concentração da vitamina no sobrenadante dos cultivos. Como mostram as curvas padrão de riboflavina elaboradas em diferentes soluções tampões de pH's distintos (Tabela 9), e de acordo com Weber (1950), a fluorescência de riboflavina não apresentou diferenças significativas na faixa de pH entre 4,0 e 7,0.

Tabela 9: Curvas padrão de riboflavina em diferentes tampões com a faixa de pH variando de 4,0 a 9,0 elaboradas com o método fluorimétrico.

Riboflavina µg/mL	pH					
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Branco	4,00 ± 0,00 ^a	3,67 ± 0,58 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	4,50 ± 0,71 ^a	4,33 ± 0,58 ^a	3,50 ± 0,71 ^a
0,20	30,33 ± 2,08 ^a	33,33 ± 1,15 ^a	30,667 ± 2,82 ^a	31,333 ± 2,52 ^a	25,00 ± 2,00 ^b	20,33 ± 0,58 ^b
0,40	44,67 ± 2,58 ^a	52,67 ± 3,21 ^{a,b}	43,67 ± 6,11 ^{a,b}	55,00 ± 4,36 ^{a,b}	25,33 ± 3,05 ^c	33,00 ± 1,00 ^c
0,60	76,00 ± 2,83 ^a	72,00 ± 6,01 ^a	73,00 ± 2,65 ^a	77,67 ± 1,53 ^a	58,667 ± 1,53 ^b	42,00 ± 2,65 ^c
0,70	82,5 ± 4,95 ^a	88,667 ± 5,86 ^a	85,333 ± 3,05 ^a	80 ± 8,54 ^{a,b}	65,33 ± 5,13 ^b	49,67 ± 2,08 ^c
0,80	92,00 ± 1,00 ^a	88,50 ± 0,71 ^a	67,00 ± 9,90 ^c	98,67 ± 3,51 ^b	75,33 ± 1,53 ^{b,c}	59,00 ± 1,00 ^c
0,90	97,00 ± 9,90 ^a	109,33 ± 8,14 ^a	108,00 ± 8,49 ^{a,b}	110,67 ± 6,81 ^a	82,33 ± 4,62 ^{b,c}	66,67 ± 3,21 ^c
1,00	97,33 ± 2,31 ^a	122,00 ± 5,29 ^{a,b}	114,50 ± 4,95 ^b	128,67 ± 0,58 ^a	95,33 ± 4,73 ^c	75,00 ± 1,73 ^d
R ²	0,97	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99

^{a, b, c} Resultados apresentados como a fluorescência intrínseca de riboflavina em diferentes tampões com a faixa de pH variando de 4,0 a 9,0 (n=3) ± desvio padrão. As médias com letras diferentes apresentaram diferença significativa com p>0,05.

Entretanto em pH 8,0 e 9,0 houve uma diminuição significativa da fluorescência, indicando a supressão da fluorescência de riboflavina em meio alcalino.

Após a confirmação de que os valores de pH dos meios de cultura, verificados após o cultivo das linhagens (valores que variavam de 4,0 a 5,8) não influenciaria na fluorescência de riboflavina, a concentração da vitamina foi determinada no sobrenadante de cada cultivo. Para tanto foram realizadas três diluições de todos os sobrenadantes correspondentes a cada linhagem, utilizando tampão acetato pH 5,0, 0,1 mol/L, sendo a determinação da fluorescência realizada em triplicada para cada diluição. As três diluições foram realizadas variando a concentração do sobrenadante em 50% v/v; 30% v/v e 20% v/v. Os resultados apresentados a seguir, na tabela 10, correspondem à média da concentração de riboflavina nas diferentes diluições citadas. As concentrações de riboflavina foram estimadas de acordo com a curva padrão elaborada com a leitura de riboflavina (padrão analítico Sigma-Aldrich®) em diferentes

concentrações, a um comprimento de onda de excitação (485 nm) e emissão (520 nm) (Anexo E).

Tabela 10: Concentrações de riboflavina determinadas por fluorimetria no sobrenadante dos cultivos dos isolados em meio líquido.

Isolado	Riboflavina µg/mL	Isolado	Riboflavina µg/mL	Isolado	Riboflavina µg/mL
IB.03B	0,18 ± 0,05 ^{d,e,f,g,h,i}	RP.A1.60	0,07 ± 0,05 ^{g,h,i,j}	RP.M21	0,05 ± 0,02 ^j
IB.04B	0,17 ± 0,04 ^{e,f,g,h,i}	RP.A251	0,07 ± 0,05 ^{g,h,i,j}	RP.M22	0,05 ± 0,02 ^j
IB.07B	Não detectado	RP.B212	0,06 ± 0,04 ^{i,j}	RP.M25	0,08 ± 0,04 ^{g,h,i,j}
IB.08B	0,10 ± 0,05 ^{f,g,h,i,j}	RP.B248	Não detectado	RP.N17	0,08 ± 0,02 ^{g,h,i,j}
IB.10A	0,13 ± 0,03 ^{f,g,h,i,j}	RP.C.Leb	Não detectado	RP.N19	0,06 ± 0,04 ^{i,j}
IB.10B	0,77 ± 0,07 ^a	RP.C153	0,36 ± 0,05 ^{b,c}	RP.O141	0,08 ± 0,03 ^{g,h,i,j}
IB.12A	0,45 ± 0,06 ^b	RP.C156	0,06 ± 0,04 ^{h,i,j}	RP.O144	0,07 ± 0,04 ^{h,i,j}
IB.12C	0,18 ± 0,03 ^{d,e,f,g,h,i}	RP.C162	0,14 ± 0,04 ^{f,g,h,i,j}	RP.O64	0,20 ± 0,02 ^{d,e,f,g}
IB.14A	0,11 ± 0,04 ^{f,g,h,i,j}	RP.C170	0,10 ± 0,05 ^{f,g,h,i,j}	RP.O73	0,15 ± 0,05 ^{e,f,g,h,i,j}
IB.21A	0,18 ± 0,05 ^{d,e,f,g,h,i}	RP.C173	Não detectado	RP.D58	0,09 ± 0,03 ^{g,h,i,j}
IB.23B	0,15 ± 0,05 ^{e,f,g,h,i,j}	RP.E17	0,12 ± 0,04 ^{g,h,i,j}	RP.D64	0,15 ± 0,04 ^{f,g,h,i,j}
IB.23C	Não detectado	RP.E226	0,11 ± 0,03 ^{f,g,h,i,j}	RP.D65	0,18 ± 0,05 ^{d,e,f,g,h,i}
IB.26B	0,25 ± 0,05 ^{d,e}	RP.E235	0,07 ± 0,03 ^{g,h,i,j}	RP.D72	Não detectado
IB.27A	Não detectado	RP.F265	Não detectado	RP.D77	Não detectado
IB.33A	0,13 ± 0,02 ^{f,g,h,i,j}	RP.F269	0,07 ± 0,03 ^{g,h,i,j}	RP.D83	0,29 ± 0,08 ^{c,d}
IB.34A	0,07 ± 0,04 ^{h,i,j}	RP.I1.45	Não detectado	RP.E1	0,36 ± 0,05 ^{b,c}
IB.41B	Não detectado	RP.J1.SC	0,11 ± 0,03 ^{f,g,h,i,j}	RP.E10	0,04 ± 0,03 ^j
IB.41C	0,21 ± 0,06 ^{d,e,f}	RP.J1135	Não detectado	RP.E12	0,11 ± 0,04 ^{g,h,i,j}
IB.41D	Não detectado	RP.K1.12	0,05 ± 0,03 ^j	RP.E16	0,08 ± 0,04 ^{g,h,i,j}
IB.47D	0,16 ± 0,06 ^{d,e,f,g,h,i,j}	RP.LSc	0,11 ± 0,03 ^{f,g,h,i,j}	C.14A	0,08 ± 0,04 ^{g,h,i,j}
RP.A1.41	0,07 ± 0,04 ^{h,i,j}	RP.M17	0,08 ± 0,03 ^{g,h,i,j}	C.12B	0,04 ± 0,04 ^{g,h,i,j}
				C.12C	0,03 ± 0,03 ^{f,g,h,i,j}

^{a, b, c} Resultados apresentados como a concentração de riboflavina presente no sobrenadante das leveduras avaliadas (n=3) ± desvio padrão.

Pode-se destacar então a considerável diferença entre os métodos fluorimétrico e espectrofotométrico, já que os valores de concentração de riboflavina apresentam grande variação quando comparados, o que demonstra uma significativa diferença na sensibilidade de cada detecção. No procedimento espectrofotométrico, as amostras são manipuladas com maior frequência, reduzindo a precisão da análise, além de outros

componentes do sobrenadante (meio rico em compostos orgânicos e inorgânicos) poderem influenciar na leitura de absorbância a 440 nm. No método fluorimétrico tal interferência é minimizada, já que dois comprimentos de onda (emissão e excitação) são utilizados para detecção da molécula alvo (riboflavina) fluorescente, tornando o método mais seletivo.

Tabela 11: Comparação dos métodos; espectrofotométrico e fluorimétrico, das linhagens que obtiveram as maiores produções de riboflavina, e linhagens que não apresentaram produção de riboflavina detectada pelo método fluorimétrico.

Isolado	Método de detecção	
	Riboflavina µg/mL (Espectrofotometria)	Riboflavina µg/mL (Fluorimetria)
IB.10B	11,64	0,77
IB.12A	11,31	0,45
RP.E01	13,03	0,36
RP.C153	11,68	0,36
IB.07B	5,66	Não detectado
IB.23C	6,63	Não detectado
IB.27A	6,3	Não detectado
IB.41B	5,62	Não detectado
IB.41D	5,29	Não detectado
RP.B248	6,97	Não detectado
RP.C.Leb	6,3	Não detectado
RP.C173	5,62	Não detectado
RP.F265	7,98	Não detectado
RP.II.45	5,96	Não detectado
RP.J1135	5,62	Não detectado
RP.D72	5,29	Não detectado
RP.D77	5,62	Não detectado

Apesar da diferença entre os métodos, algumas linhagens como IB.10B e IB.12A, que foram isoladas de Mata Atlântica e as linhagens RP.E01 e RP.C153 isoladas da região de Cerrado, apresentaram concentrações de riboflavina superiores aos demais isolados em ambos os métodos de detecção. Além disso, das 64 linhagens que apresentaram a riboflavina no sobrenadante de acordo com método espectrofotométrico, apenas 13 não tiveram a presença de riboflavina detectada pelo método fluorimétrico, indicando a viabilidade da espectrofotometria na realização da seleção inicial (tabela 11).

A produção industrial de riboflavina pela via biotecnológica utiliza, atualmente,

micro-organismos mutantes selecionados de *Candida famata* dep8, *Bacillus subtilis*, e o fungo filamentoso *Ahbya gossypi*. A levedura *Candida famata* (também conhecida como *Candida flareri*, *Torolopsis candida*), tem sua habilidade para produção de riboflavina amplamente estudada, sendo considerada a levedura com maior potencial para produção desta vitamina sob a limitação de ferro. Espécies selvagens de *Candida famata* conseguem acumular cerca de 600 µg/mL no meio de cultivo enquanto que outras leveduras acumulam até no máximo 2 µg/mL (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

Um aspecto que pode restringir a produção de riboflavina por alguns fungos e leveduras é o fato de a parede celular de ambos possuir em sua constituição quitina, um polímero de N-acetilglicosamina com ligações β-1,4 encontrada em carapaças de insetos e crustáceos (FLEURI; SATO, 2005). A riboflavina e derivados de riboflavina penetram eficientemente na camada hidrofóbica de quitina e atua, como inibidores de quitinase, podendo ser utilizada no controle de artrópodes, alguns nematoides e fungos. A quitinase possui grande importância principalmente para os insetos que realizam o processo de ecdise (mudança do exoesqueleto), no qual a quitinase é responsável por degradar o antigo exoesqueleto antes que o novo seja formado (MACK; GRILL, 2006).

Evidencia-se desta forma a importância do isolamento de novas linhagens de micro-organismos para a produção desta vitamina, já que a literatura relata poucas espécies capazes de produzir riboflavina de forma rentável. As leveduras avaliadas no presente trabalho apresentam então características condizentes com os dados da literatura, com a produção de riboflavina variando de $0,03 \pm 0,03$ µg/mL a $0,77 \pm 0,07$ µg/mL.

Assim, de acordo com os resultados obtidos durante a seleção de leveduras produtoras de lipase, biotina e riboflavina, foi possível isolar dos biomas de Mata Atlântica, Cerrado e da região de transição destes biomas, uma quantidade significativa de leveduras com potencial para produção dos biocompostos analisados (Figura 8).

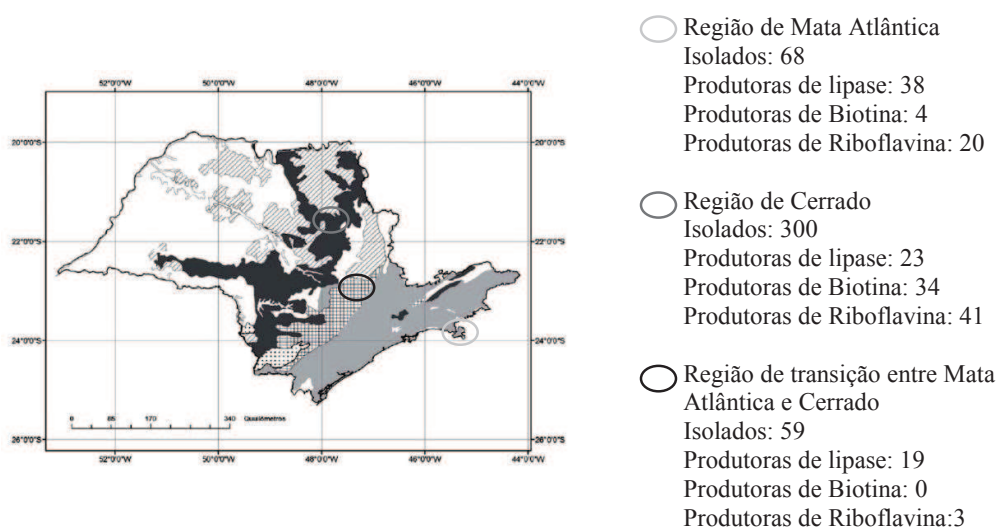


Figura 8: Leveduras isoladas das regiões de Cerrado, Mata Atlântica e região de transição Cerrado/Mata Atlântica que apresentaram produção de lipase, biotina e riboflavina.

O presente trabalho evidenciou também o potencial dos biomas (Cerrado, Mata Atlântica, Manguezal) presentes no estado de São Paulo para a bioprospecção, justificando assim a sua classificação como *hotspot* devido à grande variedade de organismos presentes nesses ecossistemas. Em 2012, Buzzini e Martini avaliaram o potencial biotecnológico de micro-organismos isolados de amostras de água, solo, insetos e plantas coletados de três diferentes florestas tropicais brasileiras, demonstrando que algumas linhagens possuíam potencial para produção de lipases, esterases e proteases. O solo do Cerrado foi o alvo do estudo realizado por Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006), que isolaram 90 linhagens de fungos produtores de lipase. Em 2005, Machado et al. estudaram fungos isolados de Mata Atlântica na região da Baixada Santista – São Paulo, isolando linhagens com potencial para produção de enzimas lignolíticas. Também em 2005, Tauk-Tornisielo e colaboradores avaliaram micro-organismos isolados de Mata Atlântica na estação ecológica Juréia-Itatins – São Paulo, isolando 1211 linhagens, das quais 67 possuíam potencial para produção de enzimas celulolíticas.

A triagem e a avaliação da produção de lipase também foram realizadas por Goldbeck (2008). Neste trabalho foram isoladas 372 leveduras silvestres a partir de diversas regiões do país, sendo as lipases produzidas pelos isolados caracterizadas quanto à especificidade de substrato, perfil de pH e temperatura, estabilidade térmica e de pH e capacidade biocatalítica de síntese orgânica.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASE, BIOTINA E RIBOFLAVINA

Os isolados RP.J1308 e RP.C153 foram identificados por meio de técnicas moleculares na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) presente no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em parceria com a Dra Derlene Attili de Angelis. O isolado RP.J1308, apresentou uma produção de lipase (22,13 U/mL) e biotina (11,28 µg/mL), enquanto que o isolado RP.C153 apresentou produção de lipase (13,45 U/mL) e riboflavina (0,36 µg/mL).

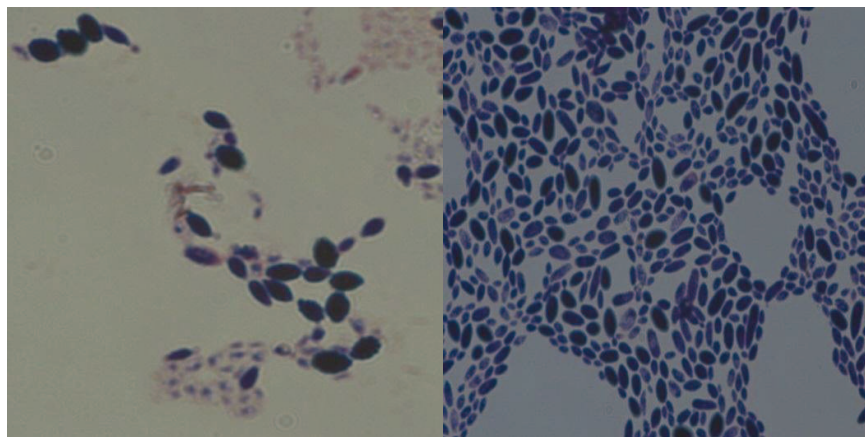


Figura 9: Coloração de Gram das linhagens RP.C153 (esquerda) e RP.J1308 (direita) para verificação da pureza das culturas.

3.5.1 Análise das sequências e análise filogenética das linhagens RP.J1308 e RP.C153

As sequências de DNA ribossômico correspondentes a região D1/D2 do gene 26S foram analisadas através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), sendo que a sequência da linhagem RP.C153 apresentou identidade de 100% e os maiores scores quando comparada a linhagem tipo *Pichia caribbica* NRRLY27274 (figura 10).

De acordo com o UniProt (*Universal Protein Resource*) disponível no website <http://www.uniprot.org/taxonomy/>, *Pichia caribbica* é sinônimo de *Candida fermentati*, enquanto que *Meyerozyma guilliermondii* é sinônimo de *Candida guilliermondii*. De acordo com Vaughan-Martini et al. (2005), *Pichia caribbica* é descrita como o estado ascósporo de *Candida fermentati* e *Pichia guilliermondii*, sendo classificada como pertencente ao clado de *Pichia guilliermondii*. Kurtzman (1998) e

Ahearn (1998) relatam que *Candida guilliermondii* e *Pichia guilliermondii* apresentam uma heterogeneidade complexa consistindo em inúmeros táxons indistinguíveis fenotipicamente. Desta forma, o presente trabalho classifica a linhagem RP.C153 como *Pichia caribbica*, pertencente ao clado de *Pichia guilliermondii*.

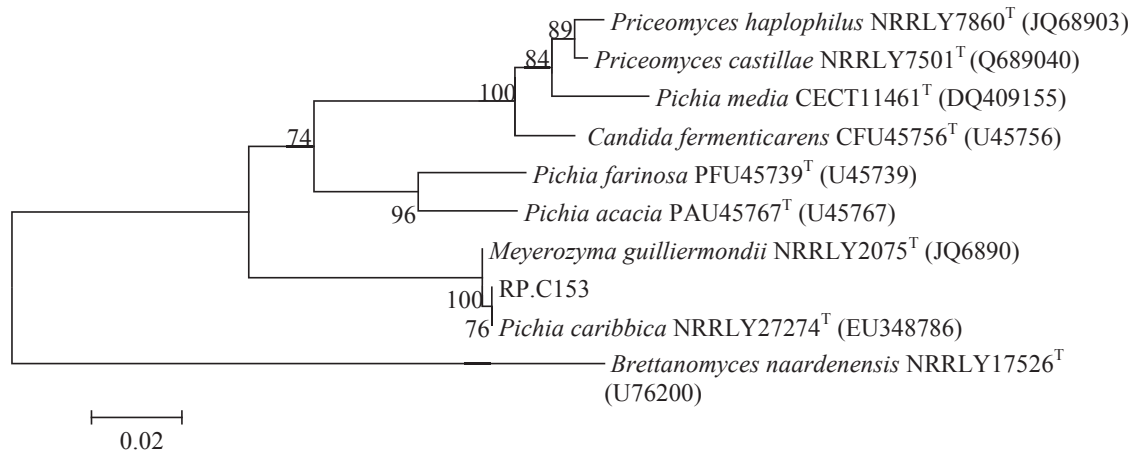


Figura 10: Árvore filogenética comparando a distância da linhagem RP.C153, adotando como grupo externo a espécie *Brettanomyces naardenensis*.

A linhagem RP.J1308 apresentou identidade de 100% e os maiores scores quando comparada a linhagem tipo *Candida oleophila* ATCC28137, desta forma o presente trabalho classificou a linhagem RP.J1308 como *Candida oleophila* (Figura 11).

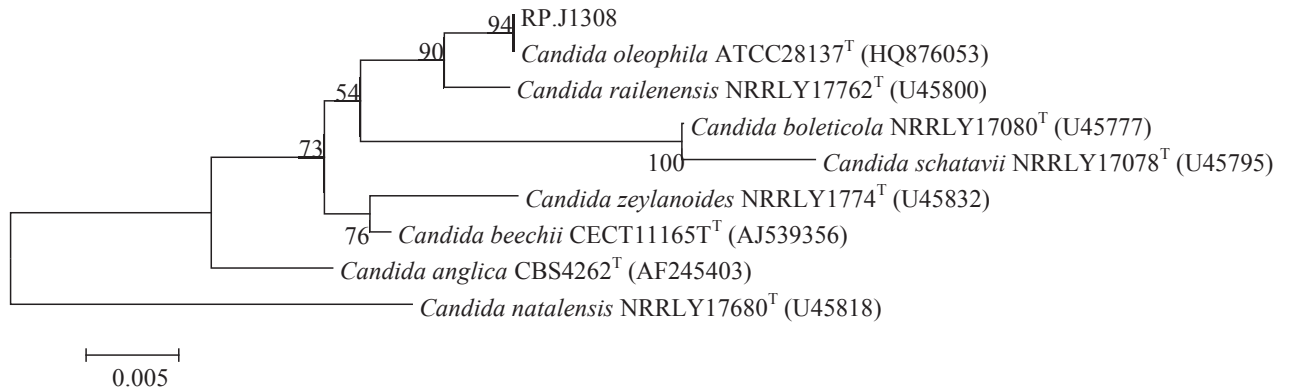


Figura 11: Árvore filogenética comparando a distância da linhagem RP.J1308, adotando como grupo externo a espécie *Candida natalensis*.

3.5.2 Produção de lipase por leveduras pertencentes ao clado de *Pichia guilliermondii* e do gênero *Candida*.

A produção de lipase por espécies pertencentes ao clado de *Pichia guilliermondii* já foi estudada por Wang et al. (2007), LI, Xiao-yu, et al. (2011) e Novotný et al. (1998), com destaque para o último que avaliou a produção de lipase por *Candida guilliermondii* e a influência do óleo de oliva e glicose presentes no meio de cultivo, concluindo que a combinação de ambos os constituintes aumentou consideravelmente a produção da enzima.

Desta forma os resultados apresentados no presente trabalho em relação à linhagem RP.C153 (*Pichia caribbica*) e a linhagem RP. J1038 (*Candida oleophila*) condizem com a literatura já que o meio de cultura utilizado, composto de 5% de água de maceração de milho, 1% de óleo de soja, 1% de óleo de oliva e 0,5% de nitrato de amônio, utilizou a combinação da fonte de carbono com óleo de oliva e soja, apresentando valores de atividades de lipases (13,45 U/mL e 22,12 U/mL, respectivamente) que demonstram o potencial de ambas para a produção desta enzima. Vale ressaltar que o presente trabalho não realizou a otimização da produção de lipase pelos micro-organismos identificados, sendo esta etapa uma sugestão para estudos futuros.

Outro aspecto que evidencia o potencial das leveduras do gênero *Candida* para a produção de lipase foi demonstrado em estudo realizado por He e Tan (2006), que utilizaram a metodologia de superfície de resposta e otimização de meio de cultura para a produção da enzima pelo micro-organismo *Candida* sp. Neste trabalho foi reportada uma atividade de lipase de 6.230 U/mL no cultivo em frascos e 9.600 U/mL no cultivo em biorreator de 5 litros, desta forma esta linhagem de *Candida* sp é a levedura com o maior potencial para a produção de lipase já reportada na literatura.

3.5.3 Produção de vitaminas do complexo B por leveduras pertencentes ao clado de *Pichia guilliermondii* e do gênero *Candida*.

A habilidade de leveduras pertencentes ao clado de *Pichia guilliermondii* e das leveduras do gênero *Candida* de produzir riboflavina ou biotina já foi relatada por Tanner; Vojnovich; Vanlanen (1945), Abbas; Sibirny (2011), Sibirnyi et al. (1977) e Sibirny;

Shavlovsky (1984), Suzuki, Fleuri e Macedo (2012) e Hong et al. (2006). De acordo com Papon et al. (2013), linhagens de *C. guilliermondii* possuem a habilidade de produzir riboflavina em altas concentrações sob deficiência de ferro. A razão para esse aumento de produção ainda não é totalmente conhecido, entretanto Abbas; Sibirny (2011) destacam que a excreção de riboflavina sob deficiência de ferro desempenha um papel importante na redução do íon insolúvel Fe^{3+} para o íon Fe^{2+} , o qual é mais acessível, disponibilizando para as células uma fonte adicional de ferro.

O presente trabalho utilizou, na seleção de leveduras potenciais produtoras de riboflavina, o meio de cultivo proposto por Strzelczyk, Dahm e Pachlewski (1991) que possui em sua constituição Citrato de Ferro III. Desta forma, uma sugestão para estudos futuros, seria ensaios com a redução deste componente, visando o aumento da produção de riboflavina extracelular, utilizando a linhagem *Pichia caribbica*.

Em relação a produção de Biotina, o gênero *Candida* já foi estudado por Hong et al. (2006) e por Suzuki; Macedo; Macedo (2011), sendo alcançadas produções de Biotina extracelular de 1,8 mg/L e 8,3 µg/mL respectivamente. A linhagem isolada no presente trabalho RP.J1308 classificada como *Candida oleophila*, foi capaz de produzir 11,28 µg/mL demonstrando o seu potencial para a produção desta vitamina.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho estendeu os estudos com o isolamento e seleção de 432 linhagens de leveduras para a produção de lipase, biotina e riboflavina. Destas linhagens, 33 apresentaram resultados positivos para a produção de lipase, 38 para biotina e 61 para riboflavina.

Dentre as 33 leveduras que apresentaram potencial para produção de lipase, 19 foram isoladas da Mata Atlântica, 11 do Cerrado e 3 da região de transição destes biomas, alcançando valores de atividade enzimática que variaram de 6,51 U/mL a 21,44 U/mL. Entre as 38 linhagens produtoras de biotina, 34 foram isoladas do Cerrado e 4 da Mata Atlântica, estes isolados produziram biotina em concentrações que variaram de 0,28 µg/mL a 18,61 µg/mL. As 64 linhagens produtoras de riboflavina, das quais 20 foram isoladas da Mata Atlântica, 3 do Cerrado e 41 da região de transição dos biomas, apresentaram concentrações de riboflavina que variaram de 0,03 µg/mL a 0,77 µg/mL.

Destaca-se assim a quantidade de isolados bem como os valores de atividade enzimática e concentrações de biotina e riboflavina que poderão contribuir para estudos futuros relacionados à otimização da produção, aplicação, caracterização dos biocompostos estudados.

Duas linhagens promissoras para a produção de lipase, biotina e riboflavina foram identificadas. O isolado RP.C153 apresentou potencial para produção de lipase e riboflavina, enquanto o isolado RP.J1308 para produção de lipase e biotina. A linhagem RP.C153 foi classificada como *Pichia caribbica* e a linhagem RP.J1308 como *Candida oleophila*.

Desta forma, ambas as linhagens serão depositadas na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e armazenadas na coleção de fungos e leveduras do laboratório de Bioquímica de Alimentos para disseminação do potencial biotecnológico desenvolvido no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n.2, p.321-360, 2011.

AHEARN, D. G. Yeasts pathogenic to humans In: The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds.), pp. 9–12. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

ALMEIDA, J. M. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS microbiology ecology**, v.53, n.2, p.295-303, 2005.

ALONSO, F. O. M. et al. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Journal of the Brazilian Sciences of Chemical Engineering**, v. 22, n.1, p. 9-18, 2005.

AMARAL, P. F. F. et al. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.339-344, 2007.

AMARAL, P. F. G. P.; OTUTUMI, L. K. Deficiência de riboflavina em frangos de corte (*Gallus gallus*) – Relato de caso. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.15, n.1, 2013.

AMORNATTANAPAN, P. Riboflavin production by *Candida tropicalis* isolated from seawater. **Scientific Research and Essays**, v.8, n.1, p.43-47, 2013.

AQUARONE E. Produção de aminoácidos. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. **Biotecnologia Industrial**, v. 3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, p.593, 2001.

ARAVINDAN, R. et al. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v.6, n.2, p.141, 2007.

BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. **International Journal of Food Microbiology** v.147, n.2, p.89-96, 2011.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v.14, n.12, p.1069-1087, 1998.

BIOTA FAPESP (Org.). **O Estado de São Paulo**. Disponível em: http://www.biota.org.br/?page_id=3256. Acesso em: 19 nov. 2013.

BOARETO, A. J. M. et al. A hybrid neural model (HNM) for the on-line monitoring of lipase production by *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.319-327, 2007.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, v.1, p.254, 2001.

BOWER S. et al. Biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. **US Patent** n.6,303,377, 2001.

BURGOS, S.; BOHORQUEZ, D. V.; BURGOS, S. A. Vitamin Deficiency-Induced Neurological Diseases of Poultry. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.9, p.804-807, 2006.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, n.1, p.77-84, 2004.

BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource technology**, v.101 n.1, p.268-275, 2010.

BUZZINI, P.; A. MARTINI. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of applied microbiology**, v.93, n.6, p.1020-1025, 2012.

CADETE, R. M. et al. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian forest. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.62, n.6, p.1438-1440, 2012.

CERQUEIRA, V. S. et al. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.3, p.1203-1222, 2012.

CHENG, X. et al. Improved riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* using glucose and yeast extract. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.70, p.15777-15782, 2011.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, v.23, p.60-67, 2006.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p.881-885, 2006.

D'ANNIBALE, A. et al. Olive-oil wastewaters: A promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v.97, p.1828-1833, 2006.

DAKSHINAMURTI, K. Biotin - a regulator of gene expression. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.16 n.7, p.419-423, 2005.

DARVISHI, F. et al. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New Biotechnology**, v.28, n.6, p.756-760, 2011.

DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVERA, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista argentina de microbiología**, v.44, n.1, p.49-60, 2012.

DOMINGUEZ, A., et al. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v.25, n.15, p.1225-1229, 2003.

DONADIO, S. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of biotechnology**, v.99, n.3, p. 187-198, 2002.

EL-REFAI, H. A. et al. Application of multi-factorial experimental designs for optimization of biotin production by a *Rhizopus nigricans* strain. **The journal of american science**, v.6, p.179-87, 2010.

FÉLIX, A. P.; MAIORKA, A.; SORBARA, J. O. B. Vitamin levels for broiler. **Ciência Rural**, v.39, n.2, 619-626, 2009.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, n.3, p.1351-1371, 2000.

FICKERS, P. et al. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.756-759, 2006.

FIRN, R. D. Bioprospecting—why is it so unrewarding? **Biodiversity & Conservation**, v.12., n.2, p.207-216, 2003.

FLEET, G. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.12, n.1-2, p.1-44, 1992.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v.28, n.5, 871, 2005.

GARY GATYAS. **Biopharma Forecasts & Trends**: MS Forecasts Global Pharmaceutical Market Growth of 5-8% Annually through 2014; Maintains Expectations of 4-6% Growth in 2010. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/ims/>>. Acesso em: 04 dez. 2013.

GOLDBECK, R. Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Dissertação de Mestrado, 70p., 2008.

GOMES, E. et al. Enzimas termoeestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30, n.1, p.136, 2007.

GONÇALVES, F. A. G. Produção de lipases extracelular por leveduras em cultivo submerso. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Dissertação de Mestrado, 66 p., 2007.

GONZÁLEZ-DAVIS, O. et al. Bioprospection of Microalgae and Cyanobacteria as Biocontrol Agents Against *Vibrio campbellii* and Their Use in White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Culture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.43, n.3, p.387-399, 2012.

GOODWIN, T. W. **Modern Methods of Plant Analysis**, vol. 3, p. 272. Ed. Paech, K. & Tracey, M. Heidelberg: Springer Verlag, 1955.

GRANJA, A. F.; VARELLA, M. D. Acesso aos recursos genéticos, transferência de tecnologia e bioprospecção. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v.42, n.2, p.81-98, 1999.

GRBAVCIC, S. Z. et al. Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.72, n.8-9, p.757-765, 2007.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v.89, n.1, p.17-34, 2003.

HALVER, J. E. Fao Corporate Document Repository. **The vitamins**: Water-soluble vitamins. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e07.htm#1.6biotin>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, p.597-607, 1975.

HE, Y. Q.; TAN, T. W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for lipase for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v.43, p.9-14, 2006.

HONG, Y. R. et al. Recombinant *Candida utilis* for the production of biotin. **Applied microbiology and biotechnology**, v.71, n.2, p.211-221, 2006.

HUNTER-CEVERA, J. C.; BELT, A. **Maintaining cultures for biotechnology and industry**. Acesso online via Elsevier, 1996.

JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., & REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v.53, n.1, p.315-351, 1999.

KANZAKI N. et al. Microorganism resistant to threonine analogue and production of biotin. **US Patent 6,284,500**, 2001.

KAR, T. et al. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scaledown approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, p.1053-1059, 2008.

KIM, B. S.; HOU, C. T. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.29, p.59-64, 2006.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v.13, n.4, p.345-351, 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, p.1, p.147-155, 2005.

KNORR, B. et al. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. **Biochemical engineering journal**, v.33, n.3, p.263-274, 2007.

KRISHNAN, A. et al. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. **Polar biology**, v.34, n.10, p.1535-1542, 2011.

KUMAR, S. S.; GUPTA, R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, v.43, p.1054-1060, 2008.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. **Computer applications in the biosciences: CABIOS**, v.10, n.2, p.189-191, 1994.

KURTZMAN, C. P. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds.), p. 273–352. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The yeasts: a taxonomic study**, vol. 1. Acesso Online via Elsevier, 2011.

LAKOWICZ, J. R., ed. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer, 2009.

LI, X. et al. Condition Optimization of Lipase Production from *Pichia guilliermondii* ypy17. **Hubei Agricultural Sciences** v.12, p. 22, 2011.

LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p.445–451, 2008.

LOPES, M. et al. *Yarrowia lipolytica* growth under increased air pressure: Influence on enzyme production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.159, n.1, p.46-53, 2009.

MACHADO, K. M. G. et al. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.3, p.297-300, 2005.

MACK, M.; GRILL, S. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. **Applied microbiology and biotechnology**, v.71, n.3, p.265-275, 2006.

MARTENS, J. H. et al. Microbial production of vitamin B12. **Applied microbiology and biotechnology**, v.58, n.3, p.275-285, 2002.

MASUDA, M. et al. Further improvement of D-biotin production by a recombinant strain of *Serratia marcescens*. **Process Biochemistry**, v.30, n.6, p.553-562, 1995.

MAUTONE, J. N. et al. Phylloplane yeasts as a source of industrially interesting enzymes. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.2, (2010).

MELO, A. G. et al. Screening and identification of tannase-producing fungi isolated from Brazilian caves. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, n.6, p.483-487, 2013.

MING, H.; PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Application of waste activated bleaching earth containing rapeseed oil on riboflavin production in the culture of *Ashbya gossypii*. **Biotechnology Progress**, v.19, p.410-417, 2003.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

MOMSIA, T. et al. A review on “Microbial lipase-versatile tool for industrial applications”. **Evolution**, v.1, n.16, p.2, (2013).

MURALIDHAR, R. V. et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal** v.9, n.1, p.17-23, 2001.

NAIK, S. et al. Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, n.1, p.18-23, 2010.

NAJJAR, A. et al. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied microbiology and biotechnology**, v.89, n.6, p.1947-1962, 2011.

NOVOTNÝ, Č. et al. The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. **Journal of basic microbiology**, v.28, n.4, p.221-227, 1988.

ODISI, E. J. et al. Bioprospection of cellulolytic and lipolytic South Atlantic deep-sea bacteria. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, n.5, p.18, 2012.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, 2013.

PAPON, N. et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current genetics**, p.1-18, 2013.

POTUMARTHI, R. et al. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa*-MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, p.700-710, 2008.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p.287–294, 2006.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of medium components by Plackett–Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.24, n.3, p.436-444, 2008.

OLSEN, H. S. Enzymes in food processing. **Biotechnology Set, Second Edition**, p. 663-736, 2008.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v.142, n.6, p.1141-1153, 2009.

RIES, E. F.; MACEDO, G. A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. **Food Science and Biotechnology**, v.18, 2009.

SALIHU, A. et al. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.69, n.1, p.66-73, 2011.

SAMPAIO, J. P. et al. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.51, n.2, p.687-697, 2001.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (Eds.). **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Springer, p.100-120, 2009.

SIBIRNY, A. A. et al. Hybridization and meiotic segregation in the paraffin-utilizing yeast *Pichia guilliermondii* Wickerham. **Genetika**, n.13, p.314-321, 1977.

SIBIRNY, A.A.; Shavlovsky G.L. Strain *Pichia guilliermondii* ss16-8 accumulating large amounts of riboflavin inside the cells. **Soviet Patent**, 1984.

SIERRA, J.M. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substances. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.23, p.15-25, 1957.

SILVA, D.D.V. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 2: aminoácidos e vitaminas. **Revista Analytica**, v.19, 2005.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.13-18, 2009.

SNELL, J.J.S. **General introduction to maintenance methods**. In: Kirsop, B.E. & Doyle, A. (Eds.) Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2nd ed. London. Academic Press. 1991. pp.21-30.

SPENCER, J., et al. Yeast identification: reassessment of assimilation tests as sole universal identifiers. **Letters in applied microbiology**, v.53, n.5, p.503-508, 2011.

STREIT, W. R.; ENTCHEVA, P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. **Applied microbiology and biotechnology**, v.61, n.1, p.21-31, 2003.

STRZELCZYK, E.; DAHM, H.; PACHLEWSKI, R. B-group vitamins production by mycorrhizal fungi in response to pH (in vitro studies). **Plant and Soil**, v.137, p.237-241, 1991.

SUZUKI, G. T.; FLEURI, L.; MACEDO, G. A. Influence of Nitrogen and Carbon Sources on Riboflavin Production by Wild Strain of *Candida* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.2, p.466-473, 2012.

SUZUKI, G. T.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Medium composition influence on Biotin and Riboflavin production by newly isolated *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.3, p.1093-1100, 2011.

SYBESMA, W. et al. Multivitamin production in *Lactococcus lactis* using metabolic engineering. **Metabolic engineering**, v.6, n.2, p.109-115, 2004.

TANNER F.W., VOJNOVICH C., VANLANEN J.M. Riboflavin production by *Candida* species. **Science**, v.101, p.180-181, 1945.

TAUK-TORNISIELO, S. M., et al. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of basic microbiology**, v.45, n.1, p.72-82, 2005.

TOLEDO, G. S. D. et al. Níveis das vitaminas A e E em dietas de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade; Levels of vitamins A and E on diets of broilers from 1 to 42 days. **Ciência. rural**, v.36, n.2, p.624-629, 2006.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.2, p.182-196, 2010.

TSUJI, M. et al. An Application of Wastewater Treatment in a Cold Environment and Stable Lipase Production of Antarctic Basidiomycetous Yeast *Mrakia blollopis*. **PloS one**, v.8, n.3, e59376, 2013.

USFDA. **Microorganisms e Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List)**.

Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>>. Acesso em: 28 maio 2013.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**. Wiley-Vch, 2012.

VAUGHAN-MARTINI, A. et al. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS yeast research**, v.5, n.4-5, p.463-469, 2005.

WANG, L. et al. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Annals of Microbiology** v.57, n.4, p.495-501, 2007.

WEBER, G. Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide. **Biochemical Journal**, v.47, n.1, p.114, 1950.

WEI, S. et al. Isolation and characterization of an *Ashbya gossypii* mutant for improved riboflavin production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.2, p.441-448, 2012.

WEISS, W. P. **Feed Ingredients Feed Supplements: Vitamins**. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), p.396–402, 2011.

WOOLLARD, D. C.; INDYK, H. E. Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.85, n.4, p.945-951, 2002.

ZHAO, W. et al. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, p.189–195, 2008.

ANEXO A - Autorização de acesso e de remessa de amostras de componente do patrimônio genético nº 010662/2013-8



0937391216111174

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010662/2013-8

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

CNPJ: 460.684.250/0001-33

Representante Legal: GLAUCIA MARIA PASTORE

Cargo/Função: Pró-Reitora de Pesquisa

CPF: 602.929.038-04 **RG:** 54628908

Projeto: Bioprospecção de fungos e leveduras silvestres de distintos Biomas do Estado de São Paulo visando a produção de enzimas, vitaminas de interesse industrial e compostos bioativos.

Coordenador do Projeto: Gabriela Alves Macedo

CPF: 137.671.328-42 **RG:** 201157706 - SSP / SP

Finalidade do projeto: O interesse no desenvolvimento de bioprocessos para a produção e extração de compostos bioativos a partir de fontes naturais aumentou muito nos últimos anos devido ao potencial de aplicação destes compostos na área de alimentos, fármacos, indústria química e outros mercados. Produtos naturais são moléculas orgânicas derivadas de vegetais, animais ou microrganismos e representam o ponto inicial para novos compostos bioativos, tais como: antimicrobianos, antioxidantes, antiproliferativos, vitaminas, e enzimas de interesse em processos industriais. Microrganismos do solo representam uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, sendo que o ponto crítico na descoberta de novas moléculas bioativas desta fonte é o isolamento de grupos de microrganismos pouco explorados e conhecidos que são ao mesmo tempo bons produtores de metabolitos secundários extracelulares. Os objetivos deste projeto incluem o isolamento e seleção de linhagens de fungos e leveduras de diferentes regiões do Estado de São Paulo, e a identificação do potencial destes, para produção de compostos bioativos. Em busca de uma ampla diversidade microbiológica, as amostras para isolamento dos fungos e leveduras serão coletadas nas regiões do Estado de São Paulo com características bem diversas, como: regiões de águas termais, região de Mata Atlântica, incluindo áreas de cavernas de ambientes úmidos, frios e sem luz; regiões do litoral com solo contaminado com hidrocarbonetos e solo salino. Os compostos bioativos que serão investigados incluem: enzimas hidrolíticas de uso industrial; vitaminas do complexo B (biotina e riboflavina) e algumas propriedades bioativas in vitro, incluindo a atividade antimicrobiana; antioxidante e antiproliferativa. As características escolhidas para esta prospecção buscam investigar um amplo espectro de possíveis funções biológicas de moléculas produzidas por estes novos microrganismos, que tenham representado grande potencial de interesse para indústrias diversas de biotecnologia com produtos de alto valor agregado.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: fungi

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletadas 10 g de solo, frutas e folhas caídas no solo.

Local de depósito de subamostra: NÃO INFORMADO

Equipe do projeto: GABRIELA ALVES MACEDO / CPF 137.671.328-42

ERICA BENJAMIM DA SILVA / CPF 387.215.518-04

CINTHIA MARQUES FERNANDES / CPF 363.805.778-07

ANDRE OHARA / CPF 381.523.418-27

PAULA DE PAULA MENEZES BARBOSA / CPF 327.203.078-66

Validade da Autorização: 02/09/2013 a 02/09/2015

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço apg@cnpq.br e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010662/2013-8. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço apg@cnpq.br, preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 29 de Agosto de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 0937391216111174 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.



**Autorização de Acesso e de Remessa de
Componente do Patrimônio Genético**

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.

Brasília, 29 de Agosto de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde
PO 161/2010

Processo: 010662/2013-8

Validade: 02/09/2013 a 02/09/2015

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CNPJ: 460.684.250/0001-33

Pesquisador: Gabriela Alves Macedo

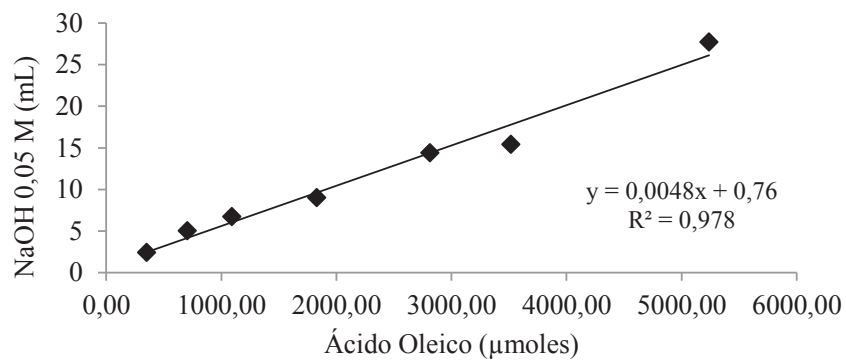
CPF: 137.671.328-42

RG: 201157706 - SSP / SP

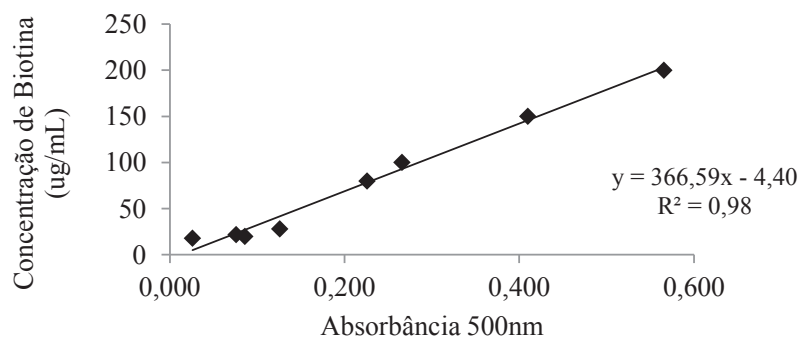
Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página

<http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 9867076345737109 para recuperá-la do banco de dados do CNPq

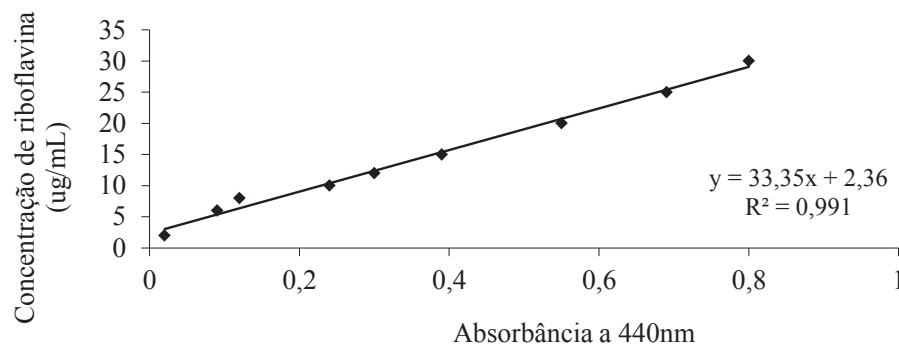
ANEXO B - Curva padrão determinada a partir da titulação de soluções de diferentes concentrações de ácido oleico contra solução de NaOH a 0,05M.



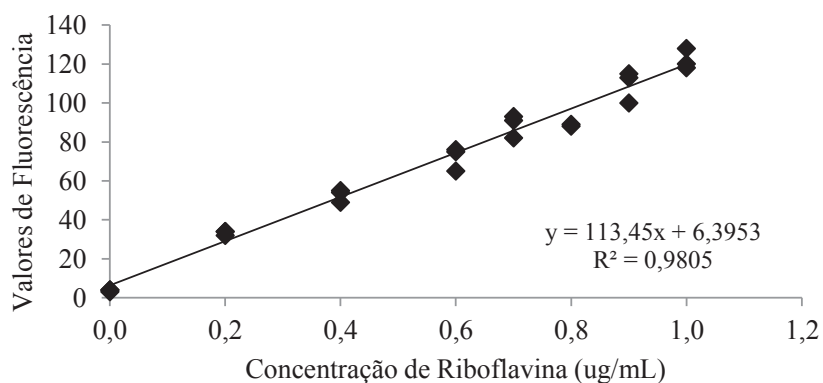
ANEXO C - Curva padrão determinada a partir da leitura a 500nm de soluções de diferentes concentrações de D-Biotina com o reagente HABA/Avidin.



ANEXO D - Curva padrão determinada a partir da leitura a 440nm de soluções de diferentes concentrações de riboflavina.



ANEXO E - Curva padrão determinada a partir da fluorescência com comprimento de onda de excitação (485nm) e emissão (520nm) de soluções de diferentes concentrações de riboflavina.



Os diferentes valores de concentrações de riboflavina, biotina e ácido oleico foram selecionados de acordo com dados de produção biotecnológica de lipase, biotina e riboflavina apresentados nos trabalhos realizados por Suzuki; Fleuri; Macedo (2012), Suzuki, Macedo, Macedo (2011) e Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004).