
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

FÁBIO JOSÉ INFORSATO

**Fungos de sedimentos marinhos da Antártica:
diversidade e prospecção de enzimas.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em ciências Biológicas – Microbiologia aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP/Rio Claro)

Coorientador: Prof. Dr. André Rodrigues (UNESP/Rio Claro)

Rio Claro – SP

2017

FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO DE ENZIMAS

FÁBIO JOSÉ INFORSATO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em ciências Biológicas – Microbiologia aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette
(UNESP/Rio Claro)

Coorientador: Prof. Dr. André Rodrigues
(UNESP/Rio Claro)

Rio Claro – SP
2017

589.2 Inforsato, Fábio José
I43f Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas / Fábio José Inforsato. - Rio Claro, 2017
134 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Lara Durães Sette
Coorientador: André Rodrigues

1. Fungos. 2. Leveduras. 3. Lipases. 4. Proteases. 5. Extremófilos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas

AUTOR: FÁBIO JOSÉ INFORSATO


ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

COORDENADOR: ANDRE RODRIGUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas


Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2017

Dedico esse trabalho aos meus pais José e Márcia Inforsato. Obrigado pelo amor incondicional, dedicação e esforço durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por tudo o que Ele fez na minha vida e por me ajudar durante todo o caminho.

A prof. Dra. Lara Durães Sette, minha orientadora, por todos os conhecimentos passados e pela amizade.

Ao prof. Dr. André Rodrigues, meu coorientador, pela ajuda na realização desse trabalho.

A prof. Dra. Nádia Regina do Nascimento (LAFS, IGCE/UNESP, Rio Claro); Prof. Dra. Célia Regina Montes (NUPEGEL, ESALQ, Piracicaba) e a aluna de doutorado Bruna Gomes Rossin pelo auxílio na caracterização dos sedimentos marinhos do presente estudo.

Aos amigos do laboratório (Gabriela, Juliana, Lídia, Igor, Lia, Emília, Marina e Pedro) pela amizade, apoio e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia (Tássio, Luana, Alexandre, Beto, Fátima e Ângela) que auxiliaram e colaboraram no presente trabalho.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

A FAPESP pelo financiamento do trabalho através do projeto 2013/19486-0 e pela confiança em nosso trabalho.

A todos os docentes, técnicos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia que auxiliaram e contribuíram de alguma forma durante esses dois anos.

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio, ajuda, incentivo e compreensão.

A UNESP pela estrutura e a confiança depositada para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os micro-organismos que habitam o continente Antártico podem apresentar produção de compostos de interesse industrial e ambiental com propriedades específicas por estarem adaptados às condições adversas da Antártica. Dentre os compostos produzidos por micro-organismos da Antártica podemos destacar as enzimas adaptadas ao frio. O presente trabalho teve como objetivo principal estudar a diversidade dos fungos filamentosos e leveduriformes isolados de cinco amostras de sedimentos marinhos da Antártica, bem como prospectar as enzimas lipase e protease. Para o isolamento dos fungos duas estratégias foram aplicadas (com e sem enriquecimento das amostras). Para ambas as estratégias, os sedimentos marinhos foram diluídos em solução salina e após homogeneização inoculados em placas de Petri contendo quatro diferentes meios de cultura (PDA, BSA, PDA diluído 10x, MA), as quais foram incubadas a 5 e 15°C. Um total de 226 isolados foi recuperado, sendo 60 fungos filamentosos e 166 leveduras. A maioria dos fungos foi isolada a 15°C (68%). De acordo com os dados de sequenciamento e análise filogenética, representantes de oito gêneros e quatro espécies de fungos filamentosos foram isolados das amostras de sedimentos marinhos. Os gêneros *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* foram os mais abundantes (40,00%), seguidos pelo gênero *Cadophora* (6,67%), *Cladosporium* (5,00%), *Toxicocladosporium*, *Pseudocercospora*, *Pestalotiopsis* e *Paraconiothyrium* (1,67%). Para as leveduras, representantes de nove gêneros e 13 espécies foram recuperadas das amostras, sendo a espécie *Metschnikowia australis* (45,18%) a mais abundante, seguida por representantes do gênero *Mrakia* (21,68%), *Cryptococcus* e *Glaciozyma* (7,83%), *Meyerozyma* e *Holtermanniella* (5,42%), *Rhodotorula* (4,21%), *Cystobasidium* (1,80%) e *Phenoliferia* (0,60%). Alguns dos fungos filamentosos identificados no presente trabalho não haviam sido ainda reportados em ambientes Antárticos (*Toxicocladosporium*, *Pseudocercospora* e *Paraconiothyrium*). As análises de diversidade revelaram que a amostra A5 coletada no Refúgio 2 (20 m, 0,1°C) apresentou a maior riqueza de espécies, enquanto a amostra A2 coletada no Botany Point (24,7 m, 0,6°C) se mostrou mais diversa. Com relação à diversidade β , as amostras A5 e A6 coletadas na mesma região geográfica (Refúgio 2) apresentaram o maior compartilhamento de espécies (42,3%). Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produção de lipase e protease. Os resultados revelaram que a levedura 6A-1C2II (*M. australis*) apresentou a maior atividade lipolítica (0,88 U.mL⁻¹) e o fungo filamentoso 4A-1C615III

(*Pseudogymnoascus* sp.) a maior atividade proteolítica (6,21 U.mL⁻¹). Ambos os isolados foram submetidos aos estudos de avaliação de diferentes fatores na produção das enzimas visando maximização da produção enzimática. Após a condução de planejamentos experimentais do tipo Plackett-Burman (PB), a produção de lipase por *M. australis* 6A-1C2II aumentou 1,36 vezes e a produção de protease por *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III 4,72 vezes. Nos experimentos de validação das condições otimizadas, as médias das triplicatas apresentaram valores inferiores aos alcançados nos planejamentos. A condução do presente trabalho permitiu a ampliação do conhecimento sobre a diversidade de fungos e leveduras que habitam os sedimentos marinhos da Antártica. Em adição, resultou na obtenção de isolados de fungos filamentosos e leveduras de ambiente extremo, os quais estão sendo mantidos na coleção de pesquisa associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) e poderão ser utilizados em estudos futuros de prospecção e aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Antártica, diversidade de fungos, enzimas adaptadas ao frio, planejamento experimental.

ABSTRACT

Microorganisms that inhabit the Antarctic continent can produce compounds of industrial and environmental interest with specific characteristics, since they are adapted to the adverse conditions in Antarctica. Among the compounds that are produced by Antarctic microorganisms we can enhance the cold-adapted enzymes. The main objective of this research was to study the diversity of filamentous fungi and yeasts from five Antarctic marine sediments samples, as well as to prospect lipase and protease enzymes. Two strategies were applied for fungal isolation (with and without enrichment of the samples). For both strategies, the sediments were diluted with saline solution and after homogenization the dilutions were inoculated in Petri dishes containing four different culture media (PDA, BSA, PDA diluted 10x, and MA), which were incubated at 5 and 15 °C. The total amount of isolates recovered was 226, being 60 fungi and 166 yeasts. Most of the fungi were isolated at 15°C (68%). According to sequencing data and phylogenetic analyses, eight genera and four species of filamentous fungi were isolated from the marine sediment samples. The genera *Penicillium* and *Pseudogymnoascus* were the most abundant (40.00%); followed by genus *Cadophora* (6.67%), *Cladosporium* (5.00%), *Toxicocladosporium*, *Pseudocercospora*, *Pestalotiopsis*, and *Paraconiothyrium* (1.67%). Representatives of nine genera and thirteen yeast species were recovered from the sediment samples, the species *Metschnikowia australis* was the most abundant (45.18%), followed by isolates from genus *Mrakia* (21.68%), *Cryptococcus* and *Glaciozyma* (7.83%), *Meyerozyma* and *Holtermanniella* (5.42%), *Rhodotorula* (4.21%), *Cystobasidium* (1.80%), and *Phenoliferia* (0.60%). Some of the fungi identified in the present work were not reported in Antarctic environments before (*Toxicocladosporium*, *Pseudocercospora* e *Paraconiothyrium*). The diversity analyses showed that the sample A5 collected from Refúgio 2 (20 m, 0.1°C) presented higher species richness, while sample A2 that was collected from Botany Point (24,7 m, 0.6°C) was the most diverse. According to β diversity data, the samples A5 and A6 that were collected in the same geographic region (Refúgio 2) showed the higher species sharing (42.3%). The capacity to produce lipase and protease were evaluated. The results revealed that the yeast 6A-1C2II (*M. australis*) presented the best lipolytic activity (0.88 U.mL⁻¹) and the fungus 4A-1C615III (*Pseudogymnoascus* sp.) the best proteolytic activity (6.21 U.mL⁻¹). Both isolates were submitted to the evaluation of different factors in the enzyme production

process aiming the enzymatic production maximization. After the conduction of Plackett-Bruman (PB) experimental designs, the lipase production by *M. australis* 6A-1C2II increased 1.36 times and the protease production by *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III increased 4.72 times. In the optimized conditions validation experiments, results from the triplicates averages were lower than that one reached during the experimental designs. This work allowed the improvement in the knowledge of fungal diversity in the Antarctic marine sediments ecosystem. In addition, resulted in the obtaining of fungi and yeasts from extreme environment, which are being maintained in the research culture collection associated to the Central of Microbial Resources (CRM-UNESP) and can be used in future studies related to prospection and biotechnology application.

Keywords: Antarctica, fungal diversity, cold-adapted enzymes, experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da região Antártica e suas três divisões (Antártica Marítima, Península Antártica e Antártica Continental).	15
Figura 2. Representação das estruturas α -hélice e folhas β -preguedas presentes nas enzimas e proteínas.	17
Figura 3. Representação das reações que são catalisadas por lipases (PAQUES & MACEDO, 2006).	18
Figura 4. Reação de hidrólise por lipases não específicas e 1,3 específicas (PAQUES & MACEDO, 2006).	20
Figura 5. Reação geral de transesterificação dando origem ao biodiesel (mistura de ésteres) e glicerol (GERIS <i>et al.</i> , 2007).	21
Figura 6. Reação geral de hidrólise catalisada pelas proteases	22
Figura 7. Local de coleta das amostras, os números representam os pontos de coleta dos sedimentos marinhos citados na Tabela 1.	26
Figura 8. Representação das regiões intergênicas do <i>operon</i> ribossomal ITS-DNA _r utilizadas para a identificação dos fungos filamentosos (Toju <i>et al.</i> , 2012).	30
Figura 9. Representação da região D1/D2-28S na LSU (<i>Large Subunit</i>) utilizada para a identificação das leveduras (adaptado de Toju <i>et al.</i> , 2012).	30
Figura 10. Estrutura química do corante Rodamina B.	35
Figura 11. Número de isolados de leveduras (A) e de fungos filamentosos (B) obtidos nos diferentes meios de cultivo com enriquecimento.	40
Figura 12. Número de isolados de leveduras (A) e de fungos filamentosos (B) obtidos nos diferentes meios de cultivo sem enriquecimento.	41
Figura 13. Porcentagem de isolados obtidos nas duas temperaturas utilizadas para o isolamento (5 °C e 15° C).	41
Figura 14. Análise de correspondência das amostras e isolados. Os pontos coloridos representam cada uma das amostras e os azuis à distribuição das espécies.	52
Figura 15. Gráfico obtido com os dados de caracterização dos sedimentos. Cada ponto colorido representa uma amostra de sedimento. Os vetores mostram a influencia de cada parâmetro sobre a distribuição.	53
Figura 16. Atividade de lipase de <i>M. australis</i> 6A-1C2II em diferentes temperaturas de cultivo, utilizando agitação de 150 rpm como constante.	60

- Figura 17.** Atividade de lipase de *M. australis* 6A-1C2II em diferentes agitações a 20°C. 60
- Figura 18.** Atividade de protease de *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III em diferentes temperaturas de cultivo, utilizando agitação de 150 rpm como constante. 60
- Figura 19.** Atividade de protease de *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III em diferentes agitações a 20°C. 61
- Figura 20.** Média das atividades enzimáticas de lipase (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) da levedura *M. australis* 6A-1C2II cultivada nas condições do ensaio 11 do segundo PB (150 rpm; 20 °C). 66
- Figura 21.** Média das atividades enzimáticas de lipase (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) da levedura *M. australis* 6A-1C2II cultivada nas condições do ensaio 12 do segundo PB (150 rpm; 20 °C). 67
- Figura 22.** Média das atividades enzimáticas de protease (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) do fungo filamentosso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III cultivado nas condições do ensaio 3 do segundo PB (150 rpm; 20 °C). 67
- Figura 23.** Média das atividades enzimáticas de protease (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) do fungo filamentosso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III cultivado nas condições do ensaio 13 do segundo PB (150 rpm; 20 °C). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das amostras de sedimentos marinhos coletadas durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015).	27
Tabela 2. Reagentes utilizados na reação de amplificação do DNA da região ITS dos fungos filamentosos.	31
Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de amplificação do DNA da região D1/D2 das leveduras.	31
Tabela 4. Fungos obtidos das amostras de sedimentos marinhos da Antártica.	43
Tabela 5. Índices de diversidade, riqueza e estimador de riqueza de Chao 1.	50
Tabela 6. Tabela de compartilhamento das amostras par a par com a porcentagem de similaridade entre os pares.	51
Tabela 7. Dados de caracterização dos sedimentos marinhos para a análise NMDS.	51
Tabela 8. Atividade lipolítica das leveduras e fungos filamentosos selecionados após cultivo por sete dias a 15°C e 150 rpm.	56
Tabela 9. Atividade proteolítica das leveduras e fungos filamentosos após cultivo por sete dias a 15°C e 150 rpm.	57
Tabela 10. Resultados do primeiro PB para a produção de lipase por <i>M. australis</i> 6A-1C2II após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.	61
Tabela 11. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB16 para a produção de lipase por <i>M. australis</i> 6A-1C2II (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm).	62
Tabela 12. Resultados do segundo PB para a produção de lipase por <i>M. australis</i> 6A-1C2II após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.	62
Tabela 13. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no segundo PB16 para a produção de lipase por <i>M. australis</i> 6A-1C2II (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm).	62
Tabela 14. Resultados do quarto PB para a produção de lipase por <i>M. australis</i> 6A-1C2II após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.	63
Tabela 15. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no quarto PB16 para a produção de lipase <i>M. australis</i> 6A-1C2II (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm).	63
Tabela 16. Resultados do primeiro PB para a produção de protease por <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4A-1C615III após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.	63
Tabela 17. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB20 para a produção de protease (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm) no primeiro planejamento experimental.	64

Tabela 18. Resultados do segundo PB para a produção de protease por <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4A-1C615III após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.	64
Tabela 19. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB16 para a produção de protease (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm) no segundo planejamento experimental.	65
Tabela 20. Resultados do terceiro PB para a produção de protease por <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4A-1C615III após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.	65
Tabela 21. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB16 para a produção de protease (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm) no terceiro planejamento experimental.	65

ABREVIATURAS E SIGLAS

ASW – Artificial Sea Water

CRM - Central de Recursos Microbianos

DCB ou CBD - Ditionito-Citrato-Bicarbonato

EACF - Estação Antártica Comandante Ferraz

HTS – *High Throughput Screening*

LAFS - Laboratório de Análises de Formações Superficiais

LAMAI - Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial

NUPEGEL - Núcleo de Pesquisa em Geoquímica e Geofísica da Litosfera

OPERANTAR - Operação Antártica

PB – Plackett-Burman

PROANTAR - Programa Antártico Brasileiro

TCA – Ácido tricloroacético

Kcat – Constante catalítica

E.C. – Enzyme Commission numbers

EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz

NMDS – Escalonamento multidimensional não métrico (Non-metric multidimensional scaling)

TAG – Triacilglicerídeos

pNPP - p-nitrofenil palmitato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.1 Ambientes extremos	15
2.1.2 Ambiente Antártico	15
2.2 Fungos da Antártica	16
2.3 Enzimas adaptadas ao frio	16
2.4 Lipases e suas características	17
2.4.1 Aplicações das lipases	20
2.5. Proteases	21
2.5.1 Aplicações das proteases	22
2.6. Processo de otimização da produção de enzimas	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Amostras de sedimentos marinhos	25
4.2. Isolamento dos fungos	27
4.3. Preservação dos isolados	29
4.4. Caracterização taxonômica	29
4.4.1. Extração de DNA	29
4.4.2. Sequenciamento de DNA ribossomal	30
4.5. Diversidade dos fungos isolados e correlação com a composição dos sedimentos	32
4.5.1. Análises de diversidade e estrutura das comunidades	32
4.5.2. Caracterização das amostras de sedimentos marinhos	33
4.5.2.1. Granulometria	33
4.5.2.2. Método Ditionito-Citrato-Bicarbonato (DCB ou CBD)	33
4.5.2.3. Extração Oxalato	34
4.5.2.4. Extração Pirofosfato	34
4.6. Triagem de fungos produtores de lipases e proteases	34
4.6.1. Triagem qualitativa - Lipases	34
4.6.2 Triagem quantitativa - Lipases	35
4.6.3 Triagem qualitativa - Proteases	36
4.6.4 Triagem quantitativa - Proteases	37
4.7. Otimização da produção de lipases e proteases: desenho experimental	37
4.7.1 Planejamento experimental para lipase	38
4.7.2 Planejamento experimental para protease	38
4.7.3 Experimentos de validação	39

5. Resultados e Discussão	39
5.1. Parte 1: Isolamento e identificação molecular dos fungos filamentosos e leveduriformes obtidos das cinco amostras de sedimentos marinhos	40
5.1.1. Resultados	40
5.1.2. Discussão	44
5.2. Parte 2: Análise de diversidade	49
5.2.1. Diversidade α	49
5.2.2. Diversidade β	50
5.2.3. Discussão	54
5.3. Parte 3: Prospecção de fungos produtores de lipases e proteases	55
5.3.1. Resultados	55
5.3.2. Discussão	57
5.4. Parte 4: Avaliação da influência de diferentes fatores na produção de lipase e protease pelos isolados selecionados	59
5.4.1 Resultados	59
5.4.2 Discussão	68
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos que habitam ambientes extremos, com temperaturas muito baixas e outras condições adversas, estão sendo alvo de estudos crescentes, visto que podem produzir compostos diferentes dos já conhecidos com grande eficiência e ao mesmo tempo diminuir a necessidade de reagentes e consumo energético em plantas industriais (GOMES *et al.*, 2007). Nesse contexto, os estudos dos micro-organismos que habitam o continente Antártico são promissores. Além das baixas temperaturas, outras pressões seletivas naturais ocorrem na Antártica, tais como a alta incidência de radiação ultravioleta, o baixo teor de nutrientes e a disponibilidade de água (FELLER, 2013; FURBINO, 2012; SHIVAJI & PRASAD, 2009; SINGH *et al.*, 2011). Esses fatores realizam a seleção de micro-organismos com características únicas; metabolismos e mecanismos enzimáticos adaptados para sua sobrevivência (VAZ *et al.*, 2011).

Assim, os micro-organismos que habitam a Antártica são fontes potenciais de recursos para aplicação biotecnológica, em diversos setores socioeconômicos, incluindo a produção de novos fármacos, enzimas, biopolímeros, entre várias outras biomoléculas de interesse industrial e/ou ambiental. No decorrer das últimas duas décadas, a produção de enzimas por micro-organismos do ambiente antártico tem sido estudada e reportada em literatura (CHAUD *et al.*, 2016; DUARTE *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2015; KRISHNAN *et al.*, 2011; LARIO *et al.*, 2015, NASCIMENTO *et al.*, 2015; VAZQUEZ *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011;).

Os micro-organismos que habitam os ambientes Antárticos desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes e são classificados como psicrófilicos e psicrótróficos (MOYER & MORITA, 2007). Estudos relacionados com a diversidade de fungos da Antártica são recentes e têm sido realizados a partir de amostras marinhas e terrestres. O uso das ferramentas de exploração genética tem permitido avanços nos estudos envolvendo o conhecimento da diversidade microbiana do ambiente antártico em solos, águas e sedimentos (BERLEMONT *et al.*, 2011).

Considerando o acima exposto, o presente trabalho teve como foco principal conhecer a diversidade de fungos em diferentes amostras de sedimentos marinhos, bem como prospectar as enzimas lipases e proteases e realizar estudos para a maximização da atividade para ambas as enzimas.

O ambiente antártico é considerado um dos ambientes mais inóspitos do globo, com temperaturas extremamente baixas, escassa disponibilidade de água, alto índice de radiação UV, ventos fortes e frequentes ciclos de congelamento e degelo da água. Essas pressões ambientais fazem com que os micro-organismos ali presentes desenvolvam mecanismos de desenvolvimento singulares (D'ELIA *et al.*, 2009; ONOFRI *et al.*, 2004; YERGEAU & KOWALCHUK *et al.*, 2008).

2.2 Fungos da Antártica

Os estudos sobre a diversidade de fungos filamentosos e leveduriformes na Antártica são relativamente recentes e de acordo com Carrasco *et al.* (2012), Furbino *et al.* (2014) e Godinho *et al.* (2013) estão sendo intensificados nos últimos anos com o aumento da exploração dessa região por diversas nações. Os principais alvos desses estudos são a microbiota de amostras de solos, rochas, vegetação, pinguineiras e amostras provenientes das geleiras (CONNEL *et al.*, 2008; RUISI *et al.*, 2007). Outra importante fonte de recursos microbiológicos pouco explorada são os sedimentos marinhos, foco do presente estudo.

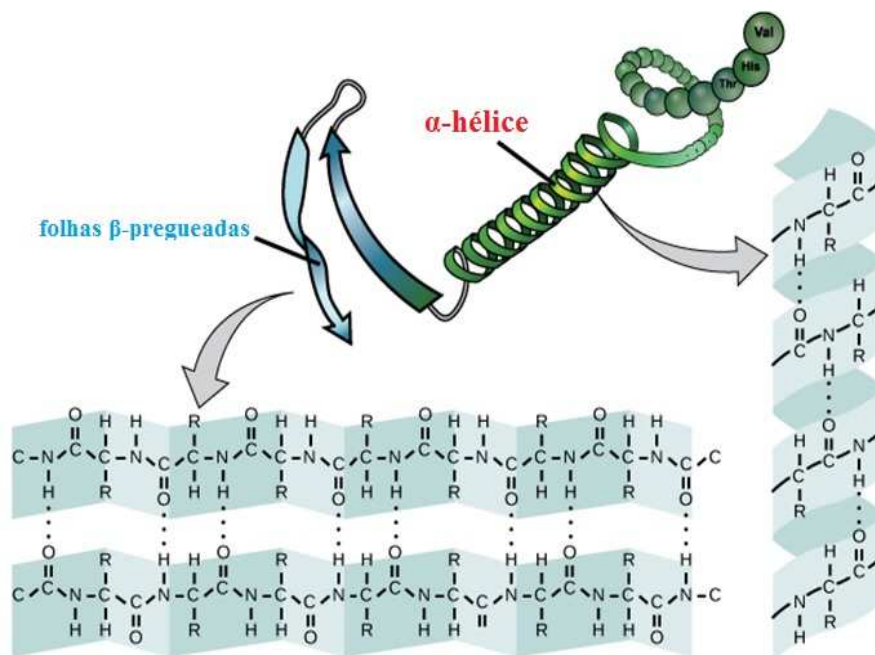
No ambiente antártico são encontrados micro-organismos classificados como psicrófilos e psicrótrófos. Os psicrófilos possuem a capacidade de crescer entre 0 °C e 15 °C, com temperatura máxima menor ou igual 20 °C. Os psicrótrófos (também chamados de psicrotolerantes) podem se desenvolver a 0 °C e a máxima temperatura de crescimento está acima de 20 °C (RUISI *et al.*, 2007).

2.3 Enzimas adaptadas ao frio

As enzimas adaptadas ao frio são importantes elementos na estratégia de sobrevivência nos ecossistemas Antárticos (KRISHNAN *et al.* 2011). Com atuação ótima em baixas temperaturas, em geral, essas enzimas apresentam em sua composição uma quantidade maior de estruturas α -hélice, menor de folhas β -pregueadas e também aminoácidos polares quando comparadas as enzimas mesofílicas e termofílicas (Figura 2). Esses fatores contribuem significativamente para que a estrutura da enzima seja menos rígida, garantindo sua atividade em baixas temperaturas (MADIGAN *et al.*, 2010). Em adição, as enzimas adaptadas ao frio possuem maiores valores de K_{cat} em temperaturas baixas e moderadas do que os valores encontrados nas enzimas produzidas pelos micro-organismos homólogos terrestres. Dentre as propriedades de interesse industrial das enzimas adaptadas ao frio podemos destacar: a redução de custos associados ao consumo de energia, a prevenção de modificações de substratos sensíveis ao calor, a prevenção na geração de produtos e

subprodutos finais indesejáveis, bem como a rápida taxa de inativação (GEORLETTE *et al.*, 2004; SIDDIQUI & CAVICCHIOLI, 2006).

Figura 2. Representação das estruturas α -hélice e folhas β -pregueadas presentes nas enzimas e proteínas.



Fonte: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure>; adaptado pelo autor.

Apesar dos fungos que habitam o ambiente antártico serem capazes de produzir todas as classes de enzimas, as hidrolases são possivelmente as mais conhecidas e com alto potencial de aplicação industrial (CARRASCO *et al.*, 2012; FENICE *et al.*, 1997; KRISHNAN *et al.*, 2011). A seguir, estão apresentadas informações sobre as hidrolases que foram foco do presente estudo: lipases e proteases.

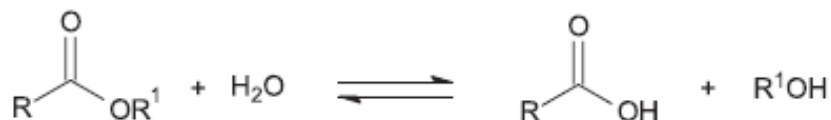
2.4 Lipases e suas características

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas de ocorrência natural e produzidas por animais, vegetais e micro-organismos. Sua principal função é a hidrólise enzimática de triacilglicerídeos (TAG). Essas enzimas catalisam várias reações, podendo fazer a quebra total ou parcial das moléculas de triacilglicerol, dando origem a diacilglicerol, ácidos graxos livres, glicerol ou monoacilglicerol (VAKHLU & KOUR, 2006; ZHANG *et al.*, 2011). Uma característica singular das lipases verdadeiras é capacidade de atuar na interface água/óleo. Por essa definição, enzimas que atuam em ésteres hidrossolúveis (esterases) e outras enzimas

que atuam em diferentes lipídeos (acilidrolases, tioesterases, entre outras) são excluídas desse grupo (BROCKMAN, 1984). Na Figura 3 estão representadas as diversas reações catalisadas por lipases.

Figura 3. Representação das reações que são catalisadas por lipases (PAQUES & MACEDO, 2006).

Hidrólise



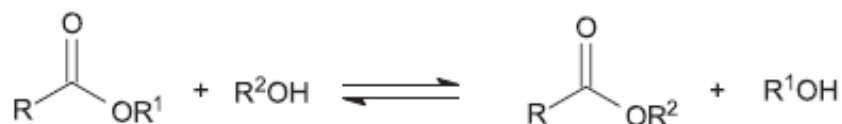
Esterificação



Interesterificação



Alcólise



Acidólise



Aminólise



Lactonização



Em geral essas enzimas possuem peso molecular de 40 a 50 kDa. Formadas por uma porção glicosídica (glicoproteínas), a parte hidrofóbica dessa porção circunda o sítio ativo.

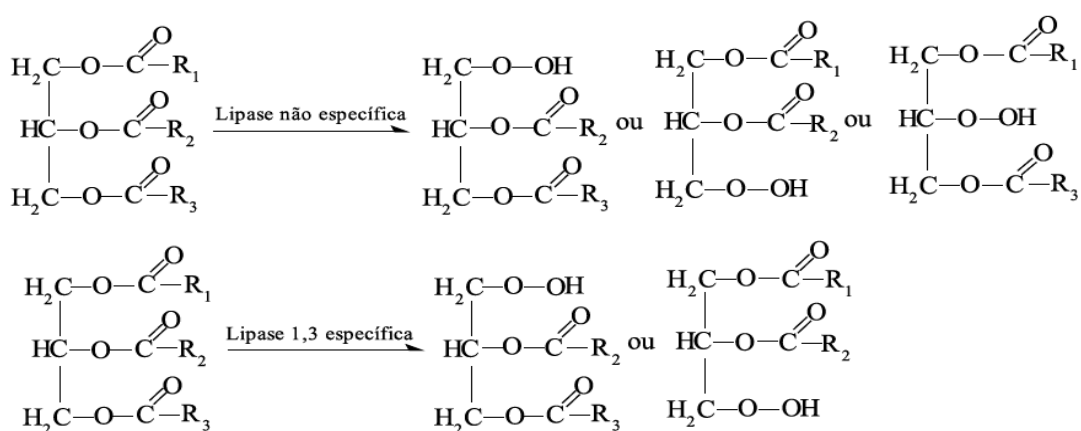
Industrialmente as lipases de fonte microbiana são as mais utilizadas devido: i) à simplicidade no processo de isolamento por serem, em geral, extracelulares; ii) são relativamente mais estáveis em soluções aquosas próximas à neutralidade à temperatura ambiente; iii) apresentam faixa ótima de atividade entre 30 e 40°C. Em geral, apresentam propriedades diversificadas quando comparadas com lipases provenientes de outras fontes, tais como plantas e animais (BORGSTON & BROKMAN, 1984; CASTRO *et al.*, 2004). Essas características são generalizadas, muitas delas irão variar de acordo com a origem do micro-organismo do qual foram isoladas. Outra grande vantagem desse grupo enzimático é a enantiosseletividade, aspecto muito importante para áreas correlacionadas à química orgânica e farmacêutica, devido à possibilidade de preparação de enantiômeros puros (COSTA & AMORIM, 1999; PALOMO, 2008; SILVA, 2011). As lipases intracelulares atuam em processos vitais para manutenção da célula: degradação de reservas energéticas e manutenção das membranas celulares. Já as extracelulares são voltadas para a degradação de substratos para assimilação celular como fonte de carbono (KOBBLITZ & PASTORE, 2004).

Os principais gêneros de leveduras produtores de lipases são: *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Yarrowia*. Lipases provenientes do gênero *Candida* são as mais exploradas no âmbito industrial. É importante ressaltar que para produção de lipases por representantes desse gênero é necessário adicionar ao meio de cultura um indutor como fonte de carbono: azeite de oliva, ácido oleico, glicerol ou outro indutor compatível (DAMASO *et al.*, 2008; GORDILO *et al.*, 1995; VAKHLU & KOUR, 2006). Os fungos filamentosos também possuem capacidade de produção dessas enzimas e são conhecidos por possuírem elevada capacidade de assimilação de substratos e pela facilidade em secretar, em grandes quantidades, enzimas extracelulares para realizar a degradação de um determinado composto. Várias patentes de processos envolvendo lipases de fungos filamentosos são encontradas na literatura, visto a facilidade de extrair e purificar essas enzimas, sem que seja necessária a lise celular. Alguns gêneros relatados como produtores de lipases são: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Beauveria*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (MESSIAS *et al.*, 2011; VAKHLU & KOUR, 2006).

As lipases microbianas estão divididas de acordo com a especificidade ao substrato em três grupos: i) Lipases 1,3 específicas: nesse grupo ocorre a hidrólise de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 dos acilgliceróis. Como exemplo de micro-organismos que possuem lipases desse grupo temos *Rhizopus delemar* e *Aspergillus niger*; ii) Lipases não específicas: realizam a hidrólise de TAG a ácidos graxos livres e glicerol aleatoriamente, não

demonstrando especificidade à natureza do grupo acil. São exemplos desse grupo as lipases provenientes de *Penicilium cyclopium*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*; iii) Lipases ácido graxo específicas: possuem especificidade com os grupos acilas nas moléculas de TAG. Exemplo desse grupo é a lipase do *Geotrichum candidum* (MACRAE & HAMMOND, 1985). Na Figura 4 estão esquematizadas as reações das lipases não específicas e as 1,3 específicas.

Figura 4. Reação de hidrólise por lipases não específicas e 1,3 específicas (PAQUES & MACEDO, 2006).



2.4.1 Aplicações das lipases

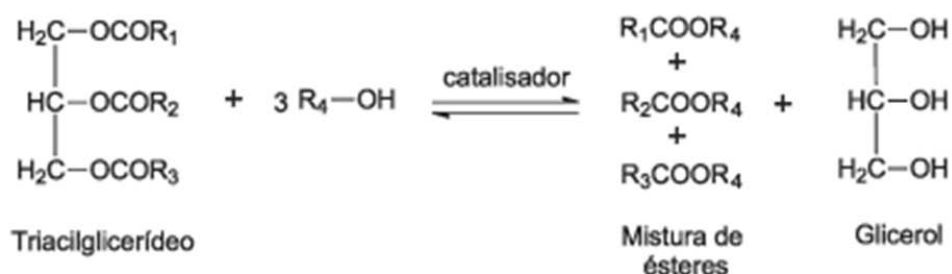
As lipases apresentam uma grande gama de aplicações na indústria alimentícia e beneficiamento de laticínios, tais como, modificação de sabor e aroma (*flavour*), textura, diminuição do teor de gordura saturada no leite e seus derivados, entre outras (CARVALHO *et al.*, 2003; FERREIRA-DIAS *et al.*, 2013; RAJENDRAN *et al.*, 2009).

Na indústria de produtos de limpeza as lipases são adicionadas a detergentes e sabões com a finalidade de potencializar a ação desses produtos na remoção de resíduos de óleos e gorduras (VAKHLU & KOUR, 2006; SIDDIQUI & CAVICCHIOLI, 2006).

Devido às buscas por fontes alternativas de combustíveis, as lipases ganham grande destaque devido sua habilidade de transesterificação (Figura 5). A mistura de ésteres geradas na reação de transesterificação é o biodiesel (CASTIGLIONI, 2009). Segundo a ANP (Agencia Nacional do Petróleo) o crescimento da produção desse combustível está acelerado, sendo que no ano de 2015 foram produzidos 3,9 bilhões de litros, um crescimento de 15% se comparado com 2014 (Fonte: <http://www.canalbioenergia.com.br/producao-de-biodiesel-no-brasil-cresceu-15-em-2015/>).

Além das aplicações industriais as lipases possuem importância no contexto ambiental, pois é possível a aplicação das lipases diretamente ou de micro-organismos produtores para o tratamento de rejeitos industriais; derramamento de petróleo e seus derivados; limpeza de caixas de gordura; diminuição da carga orgânica de águas contaminadas provenientes de matadouros de animais, entre outras (DAMASO *et al.*, 2008, FEITOSA *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2008).

Figura 5. Reação geral de transesterificação dando origem ao biodiesel (mistura de ésteres) e glicerol (GERIS *et al.*, 2007).



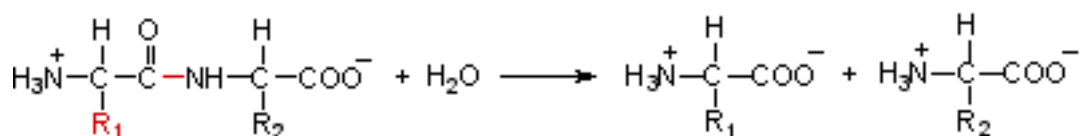
As lipases com atuação em temperaturas baixas são de interesse na síntese de intermediários orgânicos quirais termossensíveis e também na resolução de misturas racêmicas em indústrias farmacêuticas, apresentando vantagem nas etapas de produção de fármacos, pois é necessário que esses processos ocorram em temperaturas amenas devido à instabilidade de seus intermediários (COSTA & AMORIM, 1999; MOURE, 2009).

2.5. Peptidases (Proteases)

Peptidases (E.C 3.4.X.X.), também conhecidas como proteases, são enzimas que realizam a hidrólise de ligações peptídicas de outras proteínas ou peptídeos (Figura 6). Essas enzimas são de vital importância para processos fisiológicos e também patológicos, além de serem aplicadas em diversas áreas industriais (MURI, 2014; SILVA *et al.*, 2013). As proteases têm funções intracelulares e extracelulares, as intracelulares podem atuar na degradação e reciclagem de aminoácidos, bem como participar de processos inibitórios (degradando determinada proteína responsável por uma etapa reacional) e sistemas de defesa (atuando como anticorpos na presença de um determinado antígeno); as extracelulares têm como principal atuação a degradação de substratos complexos à peptídeos menores ou aminoácidos para que os mesmos sejam assimilados pela célula. São bem versáteis e podem

clivar proteínas em peptídeos menores ou até mesmo a aminoácidos livres, sendo divididas em exo e endopeptidases. As exopeptidases são responsáveis pela hidrólise das ligações nas extremidades C ou N terminais nas cadeias polipeptídicas e as endopeptidases realizam a clivagem em regiões internas das cadeias polipeptídicas (MURI, 2014). Além dessa divisão, existe a classificação das proteases de acordo com a natureza química de seu sítio catalítico ou também do mecanismo de ação, podendo ser: i) serina; ii) cisteína; iii) aspártico; iv) treonina e v) metalo-proteases (BARRET, 1994; MURI, 2014).

Figura 6. Reação geral de hidrólise catalisada pelas proteases



Fonte: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/proteases2.htm>

Fungos filamentosos e leveduriformes apresentam elevada produção de proteases (*e.g. Aspergillus, Fusarium, Penicillium e Saccharomyces*), sendo esta dependente das condições de cultivo do micro-organismo, incluindo a temperatura e o tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio (RODARTE *et al.*, 2011). A secreção de proteases para o meio é ligada diretamente à fonte de nitrogênio. Em geral, para desencadear a produção dessa enzima o fungo necessita que o meio de cultivo contenha proteínas como fonte de nitrogênio, preferencialmente sem outros sais nitrogenados que possam inibir sua produção (BRAGA *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2013; VAZQUEZ *et al.*, 2008).

2.5.1 Aplicações das proteases

Proteases estão entre as enzimas mais utilizadas nas indústrias, sendo responsáveis por aproximadamente 60-65% (em massa) do comércio mundial de enzimas. Vários ramos industriais utilizam proteases, dentre eles podemos destacar: i) indústria de limpeza; ii) indústria alimentícia; iii) indústria de beneficiamento do couro; iv) tratamento de resíduos; v) indústria farmacêutica (COTARLET *et al.*, 2011; MURI, 2014; SANTOS *et al.*, 2013).

Para a produção de sabões e detergentes um dos componentes essenciais são as proteases. Essas enzimas auxiliam na remoção de resíduos provenientes das secreções corporais, de sangue, alimentos, entre outros, potencializando a ação de tais produtos. Sua

ação nos detergentes e sabões ocorre de forma conjunta com outras enzimas tais como: amilases, celulasas e lipases (RAO *et al.*, 1998).

As proteases podem ser utilizadas para melhoria do sabor dos alimentos, pois resíduos de aminoácidos de prolina e outros aminoácidos nas extremidades das proteínas podem acarretar em sabores amargos. Devido sua alta especificidade, algumas proteases são utilizadas justamente para remover esses resíduos de aminoácidos (BHASKAR *et al.*, 2007; FITZGERALD & O'CUINN, 2006).

As proteases adaptadas ao frio podem ser úteis nas indústrias de carnes e cerveja. O amaciamento da carne realizado por proteases ocorre em temperaturas baixas devido à necessidade de preservação do produto. O processo de clarificação da cerveja também utiliza proteases e ocorre durante a maturação em temperatura próximas a 0 °C. Nessa etapa, a atuação das proteases adaptadas ao frio é importante, pois realizam a hidrólise de proteínas insolúveis presentes no produto modificando seu aspecto de opaco para translúcido (de LIMA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2015).

A indústria de laticínios também utiliza em larga escala proteases, principalmente para a coagulação do leite (RAO *et al.*, 1998). Na panificação as proteases provenientes do fungo *Aspergillus oryzae* (atual *Aspergillus flavus*) agem sobre o glúten presente no trigo alterando a textura da massa e também reduzem o tempo para a realização da mistura e consequentemente o custo de produção (BON *et al.*, 2008).

O tratamento do couro é um processo que utiliza muitos compostos tóxicos e seus efluentes possuem alta carga de metais pesados. É possível a utilização de proteases para realizar a hidrólise de proteínas não colágenas e não fibrosas do couro. Esse processo dispensa a adição de sulfeto de sódio, o qual quando utilizado é um dos constituintes dos efluentes, com potencial contaminação ambiental (RAO *et al.*, 1998).

Os matadouros geram muitos resíduos ricos em proteínas, tais como sangue e fluídos animais, tecidos, cartilagens, penas, chifres, entre outros. Esses resíduos não podem ser aproveitados diretamente pelas indústrias, mas é possível via tratamento enzimático realizar a hidrólise das proteínas que os constituem, gerando aminoácidos e peptídeos menores que podem ser adicionados às rações animais como suplementos proteicos (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1997).

Enzimas proteolíticas apresentam várias aplicações clínicas, sendo uma aplicação muito importante o tratamento da doença celíaca (intolerância ao glúten). Essa doença acomete pessoas que não conseguem assimilar as proteínas do glúten. O glúten está presente

em praticamente todos os alimentos a base de trigo, centeio e também a cevada (SHAN *et al.*, 2002; SHAN *et al.*, 2004). A grande causadora desse problema é a proteína gliadina, sendo essa o principal alvo do tratamento. Como a gliadina possui regiões ricas em prolina e glutamina é possível realizar terapia com a suplementação de prolil-endopeptidases e também prolil-oligopeptidases, ambas encontradas em micro-organismos, plantas e também em animais (SHAN *et al.*, 2004). Outra importante aplicação das proteases nesse setor é como inibidores de proteínas virais e também o estudo das proteases de vírus e entendimento de seus mecanismos de ação. Os vírus como HIV, DENV (responsável pela dengue) e o HCV (hepatite C) são alguns dos mais estudados e as descobertas realizadas sobre as proteases desses vírus foram fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores que são usados nos tratamentos de pessoas infectadas (MURI, 2014).

Tanto proteases quanto as lipases produzidas por fungos da Antártica podem ser consideradas potenciais novas fontes de recursos biotecnológicos para aplicação no tratamento de efluentes industriais ricos em gorduras e proteínas como é o caso das indústrias avícolas, um importante ramo do agronegócio, tendo atingido 1,606 milhão de toneladas de carne de frango no período de janeiro e maio de 2014, totalizando a receita de US\$ 3,1 bilhões. O Brasil está entre os três maiores produtores mundiais ao lado da China e Estados Unidos, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal-ABPA (<http://www.abpa-br.org/>).

2.6. Processo de otimização da produção de enzimas

Inúmeros fatores influenciam a produção enzimática: pH; temperatura, agitação, quantidade de luz, aeração, entre outros. Alguns métodos avaliam experimentalmente uma variável ou fator por vez, chamado de procedimento “*one-at-a-time*”. Esse procedimento não avalia interações, sejam elas sinérgicas ou antagônicas, entre as variáveis estudadas.

O delineamento experimental é a técnica que sana o problema do procedimento “*one-at-a-time*”, pois permite com que as variáveis com efeitos significativos possam ser avaliadas simultaneamente, sejam esses efeitos positivos ou negativos (RODRIGUES & IEMMA, 2005). O delineamento consiste em uma série de testes com as variáveis selecionadas. No presente estudo o delineamento escolhido foi o *Plackett-Burman*. Esse delineamento é classificado como fatorial fracionado de dois níveis, tendo arranjos em tamanhos múltiplos de quatro. Esses arranjos são positivos (+1) para os níveis superiores e negativos (-1) para os níveis inferiores (MONTGOMERY, 2001; PLACKETT & BURMAN, 1946). Os testes

podem ser iniciados mesmo sem grandes informações sobre quais as variáveis são fundamentais para o sistema. O método proposto por Plackett e Burman (1946) é interessante para abordagem em ensaios iniciais (*screening*) das variáveis com influência estatística, principalmente quando há pouco ou nenhum conhecimento dos fatores que irão interferir no processo (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal conhecer a diversidade de fungos isolados de diferentes amostras de sedimentos marinhos da Antártica, bem como prospectar as enzimas lipase e protease e realizar estudos para a otimização das atividades enzimáticas.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar, purificar e preservar os fungos filamentosos presentes nas amostras de sedimentos marinhos da Antártica.
- Avaliar a diversidade encontrada nas amostras e correlacionar a mesma com a composição dos sedimentos.
- Prospectar as enzimas lipase e protease e selecionar os fungos melhores produtores.
- Avaliar a influência de diferentes fatores na produção das enzimas estudadas visando à otimização da atividade enzimática dos fungos melhores produtores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras de sedimentos marinhos

As amostras de sedimentos marinhos utilizadas no presente trabalho foram coletadas durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015) pela Profa. Lara Durães Sette no âmbito do projeto PROANTAR/CNPq intitulado "A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção - MICROSFERA" sob a coordenação da Profa. Vivian Pellizari (IO/USP). As amostras foram coletadas em triplicata utilizando uma draga Van Venn, que ao retornar do fundo oceânico contendo o sedimento em seu interior, foi aberta em cima de tampa de marfinita limpa alocada no assoalho do barco. Antes de realizar a coleta, a temperatura da parte mais interna do sedimento marinho foi determinada e parte do material foi transferido para sacos plásticos esterilizados (comumente utilizados para a coleta de solos e sedimentos) com auxílio de espátula asséptica. Os sacos com as amostras de sedimentos foram colocados em cooler e transportados para o Laboratório de Química dos

Módulos Emergenciais da Estação Antártica Comandante Ferraz, onde permaneceram armazenados sob refrigeração de 4°C. O transporte das amostras ao Brasil foi realizado sob-refrigeração.

Na Figura 7 é possível ver a localização da Estação Antártica Comandante Ferraz na Ilha Rei George (*King George Island*). Também nessa figura há uma ampliação da região com os locais onde as coletas foram realizadas. Os pontos precisos com os dados de GPS das coletas juntamente com dados relevantes das amostras estão apresentados na Tabela 1.

Figura 7. Local de coleta das amostras, os números representam os pontos de coleta dos sedimentos marinhos citados na Tabela 1.



Tabela 1. Dados das amostras de sedimentos marinhos coletadas durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015).

Local	Data	Hora	GPS (XX°Y.YYY')	Profundidade (m)	T (°C)
Botany Point (A2)	21/jan/15	10:00	62° 05.734'S 58° 19.919'W	21,7	0,8
				20,4	0,6
				32,0	0,4
EACF (A3)	21/jan/15	11:22	62° 05.130'S 58° 23.356'W	23,4	0,7
				21,4	0,3
				24,0	0,4
Punta Ullman (A4)	19/jan/15	10:15	62° 05.015'S 58° 20.987'W	20,3	0,5
				19,4	0,3
				21,2	0,1
Refúgio 2 Sedimento (A5)	16/jan/15	10:35	62° 04.373'S 58° 25.335'W	19,7	0,2
				19,1	0,0
				21,4	0,1
Ref. 2 entre marés (A6)	16/jan/15	10:25	62° 04.341'S 58° 25.233'W	Superficial	2,4

4.2. Isolamento dos fungos

A primeira etapa do projeto consistiu em isolar fungos provenientes das amostras de sedimentos marinhos coletadas na Antártica, que foi realizada utilizando duas abordagens: com enriquecimento e sem enriquecimento.

A primeira abordagem consistiu em realizar o enriquecimento das amostras visando o isolamento de micro-organismos com potencial para produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas. Para tanto, foram utilizados os indutores azeite de oliva 1,5% (v/v) e Tween 80 1,5% (v/v) para lipases e *Skim Milk* para proteases 2% (m/v). Alíquotas de 25 g das amostras de sedimentos foram transferidas para Erlenmeyers contendo 225 mL de água do mar artificial (ASW, contendo em g.L⁻¹: 10,83 de MgCl₂.6H₂O; 1,51 de CaCl₂.2H₂O; 0,02 de SrCl₂.6H₂O; 23,93 de NaCl; 4,01 de Na₂SO₄; 0,68 de KCl; 0,20 de NaHCO₃; 0,10 de KBr e 0,03 de H₃BO₃) e a fonte indutora. Esse procedimento foi realizado em duplicata e as

amostras foram incubadas durante um período de dez dias sob agitação de 150 rpm e em duas temperaturas diferentes (5 °C e 15 °C). Após o período de incubação, foram utilizadas as diluições 10^{-1} e 10^{-3} para inoculação nos meios de cultura sólidos. Alíquotas de 200 μ L das diluições foram transferidas para quatro meios diferentes em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (método de espalhamento), as quais foram incubadas a 5 °C e a 15 °C por 30 dias.

- Batata Dextrose Agar (BDA): 200 g.L⁻¹ de batata, 20 g.L⁻¹ de glicose, 15 g.L⁻¹ de agar.
- Batata Dextrose Agar diluído 10x: 20 g.L⁻¹ de batata, 2 g.L⁻¹ de glicose, 15 g.L⁻¹ de agar.
- Meio seletivo para basidiomiceto (BSA) adaptado: 15 g.L⁻¹ de extrato de malte, 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2 g.L⁻¹ ácido láctico, 15 g.L⁻¹ de agar (ARENZ *et al.*, 2006).
- Marine Agar (MA): 5 g.L⁻¹ peptona, 1 g.L⁻¹ extrato de levedura, 0,1 g.L⁻¹ de citrato férrico, 19,45 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 8,8 g.L⁻¹ de cloreto de magnésio, 3,24 g.L⁻¹ de sulfato de sódio, 1,8 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio, 0,55 g.L⁻¹ de cloreto de potássio, 0,16 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 0,08 g.L⁻¹ de brometo de potássio, 34,0 mg.L⁻¹ de cloreto de estrôncio, 22,0 mg.L⁻¹ de ácido bórico, 4,0 mg.L⁻¹ de silicato de sódio, 1,6 mg.L⁻¹ de nitrato de amônio, 8,0 mg.L⁻¹ de fosfato dissódico, 15 g.L⁻¹ de agar.

A segunda abordagem consistiu em realizar o isolamento sem enriquecimento, ou seja, sem a adição de indutores. Para tanto, alíquotas de 25 g de sedimento foram transferidas para Erlenmeyers contendo 225 mL água do mar artificial (ASW) e foi realizada a homogeneização durante 60 minutos e 150 rpm das amostras nas temperaturas de 5 °C e 15 °C. Posteriormente as diluições 10^{-1} e 10^{-3} foram utilizadas para inoculação nos mesmos meios de cultura sólidos utilizados na etapa de enriquecimento. Foram retiradas alíquotas de 200 μ L das diluições e essas foram transferidas para placas de Petri de 15 cm de diâmetro (método de espalhamento), as quais foram incubadas a 5 °C e a 15 °C. Para realizar o isolamento de fungos nas duas abordagens descritas acima um total de 120 placas de Petri (15 cm de diâmetro) foi utilizado.

A todos os meios foram adicionados sulfato de estreptomicina (0,001%) e cloranfenicol (0,01%) visando inibição do crescimento de bactérias. O crescimento de colônias tanto de leveduras como de fungos filamentosos foram acompanhados diariamente e as colônias que se desenvolveram foram purificadas em novas placas de Petri nas mesmas condições de cultivo.

4.3. Preservação dos isolados

Após a purificação as colônias de fungos filamentosos foram preservadas pelos métodos de Castellani (em água a 4°C) e criopreservação a -80°C (em glicerol 10%). Para as leveduras foi utilizado o método de criopreservação a -80°C (em glicerol 10%).

4.4. Caracterização taxonômica

4.4.1. Extração de DNA

A extração do DNA das leveduras foi realizada seguindo os protocolos de Sampaio *et al.* (2001) e Almeida (2005). Em microtubos de 1,5 mL foram adicionadas esferas de vidro (um quarto do volume do microtubo) com tratamento de superfície (Sigma) e 500 µL de solução de lise contendo EDTA 50 mM; Tris 50 mM; SDS 0,3%; NaCl 250 mM e pH 8,0 (todos os reagentes utilizados foram dissolvidos em água ultrapura Milli-Q), a qual foi posteriormente esterilizada por filtração. As leveduras foram transferidas para os microtubos com o auxílio de uma alça de inoculação. A mistura foi agitada em vortex por 4 min e colocada em banho-maria (65°C) por 60 min. Após esse tempo, foi realizada a centrifugação do conteúdo dos microtubos a 13.000 rpm por 15 min. A fase aquosa (cerca de 400~500 µl) foi transferida para um novo microtubo e estocada em freezer (-20°C).

Para os fungos filamentosos a extração do DNA foi realizada seguindo os protocolos modificados de Möller *et al.* (1992) e Gerardo *et al.* (2004). A etapa inicial de lise mecânica foi realizada da mesma forma como para as leveduras, em microtubos de 1,5 mL contendo esferas de vidro e solução de lise. Os micélios fúngicos previamente cultivados em meio sólido malte (MA2%) foram removidos com cautela para evitar a presença de fragmentos de agar e adicionados aos microtubos contendo a solução acima descrita. Posteriormente, foram adicionados 5 µL de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) e os microtubos ficaram sob agitação no vortex por 4 min. Após esse período a mistura foi colocada em banho-maria (65°C) por 30 min e novamente agitada por 4 min. Foram então adicionados 140 µL de NaCl 5M e 64 µL de CTAB 10%. Os tubos foram invertidos 25 vezes e incubados a 65 °C por 60 minutos em banho-maria. Depois disso, os tubos foram agitados novamente por 4 min e centrifugados a 10.000 rpm por 30 seg. Após a centrifugação foram adicionados 600 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico 24:1(v/v) e os tubos foram invertidos mais uma vez por 25 vezes e centrifugados por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL onde foram adicionados 300 µL de isopropanol 100% gelado e 50 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2, com posterior inversão por 25 vezes. Os microtubos

foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e o isopropanol descartado por inversão única. Foram adicionados 600 µL de etanol 70% gelado e novamente os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. O etanol foi removido por inversão única e os microtubos deixados *overnight* para a secagem completa do etanol residual. Após esse período foram adicionados 30 µL do tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) com posterior agitação e estocagem em freezer (-20°C).

4.4.2. Sequenciamento de DNA ribossomal

Para a identificação dos fungos filamentosos e leveduriformes foi aplicada apenas a taxonomia molecular. Para isso foi utilizado como marcador taxonômico genes ou regiões intergênicas do *operon* ribossomal. As regiões ITS1-5.8S-ITS2 (ITS-DNAr) e D1/D2 (28S DNAr) apresentadas na Figura 8 e 9, foram amplificadas e sequenciadas para os fungos filamentosos e leveduras, respectivamente, e de acordo com Dayo-Owoyemi *et al.* (2013).

Figura 8. Representação das regiões intergênicas do *operon* ribossomal ITS-DNAr utilizadas para a identificação dos fungos filamentosos (Toju *et al.*, 2012).

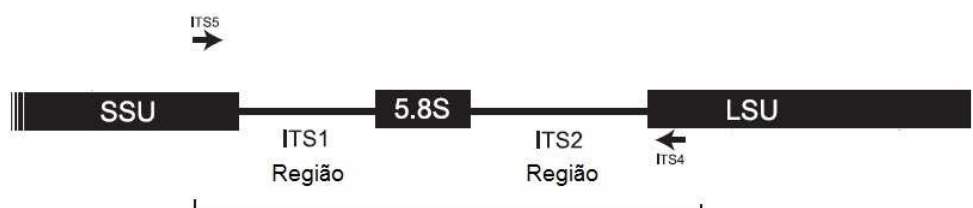
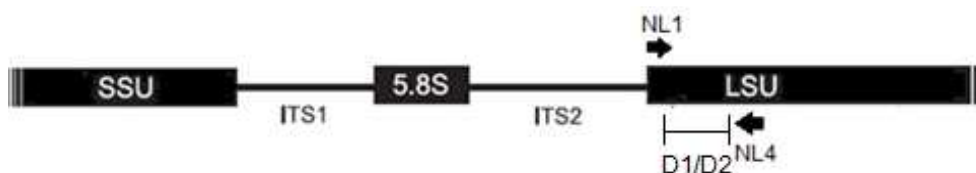


Figura 9. Representação da região D1/D2-28S na LSU (*Large Subunit*) utilizada para a identificação das leveduras (adaptado de Toju *et al.*, 2012).



As reações de amplificação das regiões ITS-DNAr para os fungos filamentosos e D1/D2-28S para as leveduras estão apresentadas na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente. Os DNA extraídos dos fungos filamentosos e das leveduras foram respectivamente diluídos 1:10 e 1:750 em água ultrapura antes de serem adicionados à mistura da reação.

Tabela 2. Reagentes utilizados na reação de amplificação do DNA da região ITS dos fungos filamentosos.

Reagentes	Quantidade (μL)
Água Milli-Q estéril	8,8
Primer ITS4 (10 μM)	1,0
Primer ITS5 (10 μM)	1,0
Buffer 5X	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0
BSA (10 mg/mL)	1,0
Taq (5 U/ μL)	0,2
DNA (1:10)	2,0
Volume final do Mix	23

Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de amplificação do DNA da região D1/D2 das leveduras.

Reagentes	Quantidade (μL)
Água Milli-Q estéril	6,8
Primer NL1 (10 μM)	1,0
Primer NL4 (10 μM)	1,0
Buffer 5X	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0
Taq (5 U/ μL)	0,2
DNA (1:750)	5,0
Volume final do mix	20,0

Para a amplificação da região ITS-DNAr (fungos filamentosos) foi utilizado o seguinte programa no termociclador (Eppendorf, modelo Mastercycler Pro): 94 °C/3min seguido de 35 ciclos a 94 °C/1min, 55 °C/1min, 72 °C/2min, 10 °C/ ∞ . Para a amplificação da região D1/D2-28S (leveduras) o programa utilizado no termociclador (Eppendorf, modelo Mastercycler Pro) foi o seguinte: 96 °C/3 minutos seguido de 35 ciclos a 96 °C/30 segundos, 61 °C/45 segundos, 72 °C/1 minuto, 10 °C/ ∞ .

A partir das sequências obtidas das regiões ITS-DNAr e/ou D1/D2-28S com cada *primer* foram construídos os *contigs* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e esses foram comparados com as sequências dessa mesma região do *operon* ribossomal de organismos representados na base de dados do *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequências de organismos relacionados à sequência do micro-organismo alvo foram recuperadas do *GenBank* para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011), onde o modelo de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo *Maximum Likelihood* para as reconstruções filogenéticas, com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 replicatas.

4.5. Diversidade dos fungos isolados e correlação com a composição dos sedimentos

4.5.1. Análises de diversidade e estrutura das comunidades

Para as análises de diversidade de fungos filamentosos e leveduras foram utilizados dois índices de diversidade: Shannon-Weiner (H') e o inverso de Simpson ($1/D$). Além disso, o estimador de riqueza Chao-1 foi calculado. Os cálculos foram realizados através do software EstimateS Win910 (COLWELL, 2013). O índice Bray-Curtis foi escolhido para avaliar a diversidade β . Esse índice é utilizado quando há dados ligados a abundância de espécies e não apenas presença e ausência. Por isso foi escolhido para realizar as comparações de similaridade entre as comunidades de cada amostra. A comparação é feita par a par; o número reflete a similaridade entre os indivíduos isolados nas amostras, podendo ser multiplicado por 100 para que o resultado seja transformado em porcentagem.

A estrutura das comunidades (como eles se organizam em termos de diversidade e composição de espécies) foi analisada por escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), utilizando a medida de similaridade de Bray-Curtis, também foi realizada a análise de correspondência. Tais análises foram realizadas através do software Past v. 2.17c (HAMMER *et al.*, 2001) e utilizadas para correlacionar a estrutura da comunidade de fungos com a composição dos sedimentos marinhos dos quais os mesmos foram isolados e ver a distribuição das espécies isoladas nas diferentes amostras de sedimento, respectivamente.

4.5.2. Caracterização das amostras de sedimentos marinhos

As cinco amostras foram submetidas a análises mineralógicas, de pH e granulometria. Essas análises foram realizadas em parceria com a Prof. Dra. Nádia Regina do Nascimento (Laboratório de Análises de Formações Superficiais – LAFS, IGCE/UNESP, Rio Claro) e com a Prof. Dra. Célia Regina Montes (Núcleo de Pesquisa em Geoquímica e Geofísica da Litosfera - *NUPEGEL*, ESALQ, Piracicaba). Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

4.5.2.1. Granulometria

O método utilizado foi o da pipeta de Robinson adaptado por CAMARGO *et al.* (1986). Foram considerados os seguintes intervalos granulométricos: 2-0,2 mm – areia grossa; 0,2-0,05 mm – areia fina; 0,05-0,002 mm – silte e menor que 0,002 mm – argila. Para a remoção de matéria orgânica presente na amostra, foi realizado um pré-tratamento utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em banho-maria na temperatura de 40 °C. A classe textural de cada amostra foi determinada de acordo com o triângulo proposto pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

4.5.2.2. Método Ditionito-Citrato-Bicarbonato (DCB ou CBD)

Esse método é utilizado para extração de óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio presentes em argilas e solos. Atua removendo o ferro/alumínio na forma de hidróxido/óxido amorfo ou óxido cristalino, sem que haja alteração na estrutura original do material. Para realizar a extração via CBD foi preparado o reativo da extração através da diluição de 78,42g de tricitrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇) e 9,34g bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em 1L de água ultrapura (Milli-Q). Em tubos tipo *falcon* foram colocados 50 mL de reativo e 1g de sedimento previamente triturado. Os tubos foram colocados em banho-maria (80°C) por 15 min (agitados manualmente em intervalos de 5 min). Após o período de 15 min, foi adicionado 1,0g de ditionito de sódio e os tubos retornaram para o banho-maria (80°C) por mais 30 min (agitados manualmente em intervalos de 5 min). Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 6 min a 4.200 rpm. O sobrenadante foi filtrado e transferido para um balão volumétrico de 100 mL. Os resíduos que ficaram no fundo dos tubos foram lavados com 25 mL de água ultrapura e novamente centrifugados (6 min, 4.200 rpm), filtrados e transferidos para o balão volumétrico. O volume do balão foi ajustado até 100 mL. As extrações foram armazenadas em tubos plásticos opacos sob-refrigeração.

4.5.2.3. Extração Oxalato

O reativo para essa extração foi feito através da diluição de 10,92 g de ácido oxálico ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) e 16,11g de oxalato de amônia ($C_2H_8N_2O_4$) em 1L de água ultrapura, resultando em uma solução de 0,2M. Foi adicionado 1,0g de sedimento em tubo tipo *falcon* contendo 40 mL da solução contendo o reativo. Os tubos foram embrulhados em papel alumínio (reação fotossensível) e colocados em mesa agitadora durante o período de 4h. Posteriormente, a solução foi centrifugada (6 min, 4.200 rpm). As extrações foram guardadas em tubos plásticos opacos sob refrigeração.

4.5.2.4. Extração Pirofosfato

O reativo para essa extração foi feito através da dissolução de 44,6g de pirofosfato de sódio ($Na_4P_2O_7$) em 1L de água ultrapura. Foi adicionado 0,5g de sedimento triturado em tubo (envolto por papel alumínio) contendo 50 mL do reativo e colocado em mesa agitadora durante o período de uma noite (12h). Após a agitação, a solução foi centrifugada a 18.000 rpm durante 20 min, filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Ao resíduo no fundo do tubo foram adicionados 25 mL de água ultrapura e o mesmo foi novamente centrifugado (20 min, 18.000 rpm). Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado e transferido para o balão volumétrico. O volume do balão foi completado até 100 mL com água ultrapura. As extrações foram armazenadas em tubos plásticos opacos sob refrigeração.

Para a quantificação dos metais o equipamento utilizado foi um espectrômetro por emissão óptica ICP – HORIBA, modelo ULTIMA 2 ICP.

4.6. Triagem de fungos produtores de lipases e proteases

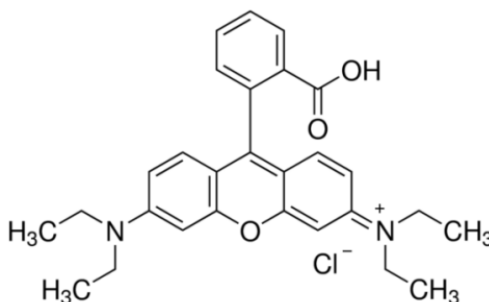
A triagem dos fungos produtores de lipases e proteases ocorreu em duas etapas: i) qualitativa: a partir de um método de médio/alto desempenho (HTS) em meio sólido e, ii) quantitativa: em meio líquido.

4.6.1. Triagem qualitativa - Lipases

A triagem qualitativa foi realizada utilizando a método descrito por Bigey *et al.* (2003). Com esse método é possível ver os halos de degradação formados com o auxílio da luz UV. A Rodamina B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$; Figura 10) é um corante que permite a visualização de reações através de fluorescência. Esse composto interage com os ácidos graxos de cadeia curta que são liberados pela degradação enzimática do azeite de oliva. Cabe ressaltar que por

natureza o azeite de oliva é uma mistura que possui ácidos graxos de cadeia longa, média e curta; para que não houvesse interferência dos ácidos graxos de cadeia curta presentes no próprio azeite, esse foi filtrado em coluna de alumina. Para cada ensaio é possível avaliar 96 amostras de uma única vez.

Figura 10. Estrutura química do corante Rodamina B.



Fonte: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/79754?lang=pt®ion=BR&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-3.

Inicialmente, os fungos filamentosos e leveduras foram cultivados em PDB (Potato Dextrose Broth, Acumedia) durante 48h. Posteriormente, 1,0 mL de meio contendo o micro-organismo foi transferido para a placa *deep well* de 96 poços. Utilizando um replicador, os micro-organismos foram inoculados em uma placa de Petri grande (15 cm de diâmetro) contendo meio Tubaki modificado de composição: 15 g.L⁻¹ de agar; 1,0 g.L⁻¹ de peptona; 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura (sem glicose); 31,25 ml azeite de oliva solução de Rodamina B 0,01 % (v/v). A produção das enzimas foi acompanhada durante o período de 120 h de incubação a 15 °C e as placas foram reveladas com luz UV. Os cultivos que apresentaram coloração alaranjada foram considerados positivo para produção de lipases. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.6.2. Triagem quantitativa - Lipases

Os fungos positivos da triagem qualitativa foram cultivados em meio líquido sob agitação de 150 rpm e a 15 °C. Após o crescimento, o micélio foi separado do caldo de cultivo por filtração a vácuo e, posteriormente, o caldo foi centrifugado por 10 minutos a 8.000 rpm. O filtrado (caldo de cultivo) obtido foi utilizado para dosagem da atividade enzimática.

Para a quantificação de lipases extracelulares o método descrito por Yang *et al.* (2002) foi utilizado. Esse método consiste na utilização do substrato sintético p-nitrofenil palmitato

(pNPP) para quantificar a atividade enzimática. Esse substrato foi solubilizado em 500 µL de DMSO e, posteriormente, diluído com 19,5 mL de tampão fosfato de sódio 50,0 mM pH 7,0 contendo 0,5% de Triton X-100. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL do caldo bruto em 900 µL de meio reacional. As reações foram mantidas durante 10 min em banho-maria a 37 °C e interrompidas por choque térmico a 96 °C por 1 min, seguido pela adição de 1,0 mL de solução aquosa saturada de tetraborato de sódio. A degradação do pNPP leva a liberação de p-nitrofenolato e é possível quantificar esse composto por absorvância em espectrofotômetro no comprimento de 405 nm utilizando a Equação 1. Todas as quantificações foram feitas em triplicatas

$$(U.mL^{-1}) = \frac{A.V_f.D}{\epsilon.V_e.T} .1000 \text{ (Equação 1)}$$

Onde,

A- Valor da absorvância;

V_f- Volume final da reação;

D – Diluição utilizada;

ε- Coeficiente de extinção molar;

V_e – Volume do caldo bruto utilizado (µL);

T – Tempo da reação em minutos;

1000 – fator de correção

4.6.3. Triagem qualitativa - Proteases

Os isolados de levedura foram triados através do ensaio de *High Throughput Screening* (HTS) e os fungos filamentosos foram avaliados em placas individuais. As leveduras foram cultivadas em meio sólido malte 2% (m/v) pelo período de 2-7 dias e posteriormente transferidas para placas *deep well* contendo 1,0 mL meio líquido malte 2% (m/v) com ajuda de uma alça de inoculação. Com o auxílio de um replicador foram transferidas para placas de Petri (15 cm de diâmetro) contendo o meio composto por *skim milk* (20 g.L⁻¹), agar (20 g.L⁻¹) e tampão fosfato 0,2M pH 7. Os fungos filamentosos foram cultivados em meio sólido malte 2% (m/v) de forma individual. Para tanto, discos de cinco mm de diâmetro de agar + micélio foram depositados no centro das placas contendo o meio com *skim milk* acima descrito.

As placas foram incubadas por 120h a 15 °C. Nesse método o resultado positivo é revelado pela presença de halo translúcido (degradação do *skim milk* que é opaco) ao redor das colônias.

4.6.4. Triagem quantitativa - Proteases

A atividade da protease foi quantificada através o método propostos por Charney & Tomarelli (1947), utilizando o substrato azocaseína. Os tubos testes foram preparados com a adição de 0,5 mL de caldo bruto, 0,5 mL de azocaseína 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5, e incubados a 37 °C por 40 min. Posteriormente, a reação foi interrompida e o excesso de proteína precipitado por adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Em seguida, a reação foi centrifugada a 8.000 rpm durante 10 min a 4°C. Após a centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de KOH 0,5M. A azocaseína é resultante da adição de um grupo sulfonilamida à caseína e possui coloração vermelho-alaranjado. Sua degradação por proteases leva a formação de componentes solúveis em ácido tricloroacético. Na presença de KOH ocorre alteração da coloração da solução presente no tubo de ensaio de amarelo para laranja (característica dos grupamentos azo em pH alcalino) e a intensidade desta coloração foi medida posteriormente em espectrofotômetro UV-Visível a 430 nm. Considerando o resultado da absorbância e utilizando a Equação 2 é possível quantificar a atividade proteolítica. Uma unidade de protease foi considerada como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,01 em 40 min de reação a 430 nm, sendo expressa em U.mL⁻¹.

$$(\text{U.mL}^{-1}) = \frac{(B-A)/0,01*40}{0,33} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

A- Valor da absorbância da amostra inativada

B- Valor da absorbância da amostra ativa 37 °C

40 – Tempo da reação em minutos

0,33 – Fator de correção para mL de enzima

4.7. Otimização da produção de lipases e proteases: desenho experimental

Inicialmente, as variáveis temperatura e a agitação foram avaliadas e fixadas. As temperaturas testadas para produção de lipase foram 15, 20 e 25 °C (temperaturas abaixo de 15 °C fazem com que haja a solidificação do azeite de oliva, utilizado como fonte de carbono e também indutor para lipase) e para proteases 10, 15, 20 e 25 °C. Para ambas as enzimas as agitações estudadas foram 130, 140, 150 e 160 rpm. O meio utilizado para ambos os testes foi o mesmo utilizado para a determinação quantitativa descrita na sessão 4.6.2 (lipase) e 4.6.4 (protease).

Após a determinação da temperatura e agitação, uma série de planejamentos do tipo Plackett-Burman (PB) com as variáveis com possível influência na atividade lipolítica e proteolítica foi aplicada. Para tanto, as variáveis foram estipuladas em dois níveis, sendo -1 o inferior e o +1 o superior (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Em todas as matrizes foram acrescentados quatro ensaios centrais (ponto central 0). Todos os testes foram realizados pelo período de 7 dias. Após esse período o caldo bruto foi obtido e utilizado para a determinação da atividade de lipase e protease.

4.7.1 Planejamento experimental para lipase

O primeiro planejamento consistiu em um PB16 com quatro pontos centrais. Foram avaliadas as seguintes variáveis: peptona, azeite de oliva, glicose, Tween 80, quantidade de inóculo (padronizado por densidade óptica), extrato de levedura, nitrato de sódio, ureia, glicerol, salinidade (ASW) e pH (ANEXO I e II)

Com os dados obtidos após análise pelo software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995), foi realizado um segundo PB16 para avaliar as variáveis: peptona, azeite de oliva, Tween 80, quantidade de inóculo, extrato de levedura, nitrato de sódio, ureia, glicerol, salinidade (ASW) e pH (ANEXO III e IV).

Após a análise dos resultados obtidos no segundo planejamento, um terceiro foi realizado (PB12) com as variáveis Tween 80, nitrato de sódio, ureia, glicerol e pH (ANEXO V e VI).

Um quarto planejamento PB16 foi realizado com as variáveis: peptona, extrato de levedura, carbonato de sódio, quantidade de inóculo, fosfato de potássio, azeite de oliva, glicerol, Tween 80, salinidade (ASW) e pH (ANEXO VII e VIII).

4.7.2 Planejamento experimental para protease

O primeiro planejamento consistiu em um PB20 com as seguintes variáveis: peptona, caseína, glicose, extrato de malte, quantidade de inóculo, extrato de levedura, amido, *skim milk*, farinha de pena, farinha de arroz, nitrato de sódio, salinidade (ASW) e pH (ANEXO IX e X). A farinha de pena é considerada um resíduo da indústria avícola e com grande disponibilidade no Brasil, sendo constituída por quase 80% de proteínas. A farinha que foi utilizada nos ensaios desse trabalho é proveniente da empresa Korin Agropecuária LTDA.

Com os dados obtidos e após análise pelo software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995), foi realizado um PB16 para avaliar as variáveis: peptona, glicose, extrato de

malte, quantidade de inóculo, extrato de levedura, farinha de pena, farinha de arroz e ureia. A salinidade (ASW) e pH foram fixados nos valores 100% e 6, respectivamente (ANEXO XI e XII).

Após a análise dos resultados obtidos no segundo planejamento, um terceiro foi realizado (PB12) com as variáveis: glicose, quantidade de inóculo, extrato de levedura, farinha de pena, ureia. A salinidade (ASW), o pH, a concentração de peptona e extrato de malte foram fixados (ANEXO XIII e XIV).

4.7.3 Experimentos de validação

Após determinar os melhores ensaios para a produção de lipase (4.7.1) e protease (4.7.2) foram conduzidos experimentos de validação para confirmar e avaliar a atividade enzimática em função do tempo e biomassa. Para isso ensaios em quadruplicadas foram conduzidos e a biomassa e a atividade foram avaliadas por 11 dias. As determinações ocorreram nos dias ímpares (1º; 3º; 5º; 7º; 9º e o 11º dia) após o cultivo dos micro-organismos selecionados nas condições dos melhores ensaios para a produção de lipase e protease.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram divididos em quatro partes principais, em consonância com os objetivos propostos:

- Parte 1: estão apresentados e discutidos os resultados provenientes da etapa de isolamento e identificação molecular dos isolados obtidos das amostras de sedimentos marinhos da Antártica;
- Parte 2: diz respeito aos resultados e discussão da diversidade α e β dos fungos isolados, bem como a correlação da diversidade com a composição dos sedimentos;
- Parte 3: é referente aos resultados e discussão dos dados de prospecção das enzimas lipase e protease (triagem qualitativa e quantitativa);
- Parte 4: estão apresentados e discutidos os resultados do planejamento experimental realizado com os isolados que apresentaram maior atividade enzimática para cada uma das enzimas estudadas, bem como os dados da validação das melhores condições para a produção enzimática.

5.1. Parte 1: Isolamento e identificação molecular dos fungos filamentosos e leveduriformes obtidos das cinco amostras de sedimentos marinhos

5.1.1. Resultados

Durante a primeira etapa de isolamento realizada com os sedimentos provenientes da Antártica utilizando a estratégia de enriquecimento foram obtidos 170 fungos, sendo 146 leveduras e 24 fungos filamentosos. Na Figura 11 estão apresentados os números de isolados de leveduras (A) e de fungos filamentosos (B) obtidos no isolamento com enriquecimento. O meio PDA em sua composição normal e diluído 10 vezes propiciou o isolamento de um maior número de leveduras. Para os filamentosos esse mesmo meio sem alterações foi responsável pelo maior número de isolados também.

Figura 11. Número de isolados de leveduras (A) e de fungos filamentosos (B) obtidos nos diferentes meios de cultivo com enriquecimento.



O isolamento realizado sem o enriquecimento resultou na obtenção de um total de 56 fungos (20 leveduras e 36 fungos filamentosos). Na Figura 12 (A) estão apresentados os números de isolados de leveduras (A) e de fungos filamentosos (B) obtidos no isolamento sem enriquecimento. No isolamento sem enriquecimento a quantidade de isolados de leveduras foi bastante inferior à quantidade de isolados obtidos quando a estratégia de enriquecimento foi aplicada. Um maior número de isolados de leveduras foi obtido em meio PDA diluído, enquanto que para os fungos filamentosos a utilização do meio MA (Marine Agar) resultou na obtenção de um maior número de isolados.

Considerando as duas estratégias de isolamento utilizadas, um total de 226 fungos (166 leveduras e 60 fungos filamentosos) foram obtidos a partir das cinco amostras de sedimentos marinhos. A Figura 13 apresenta a porcentagem de isolados obtidos nas duas temperaturas utilizadas para o isolamento.

Figura 12. Número de isolados de leveduras (A) e de fungos filamentosos (B) obtidos nos diferentes meios de cultivo sem enriquecimento.

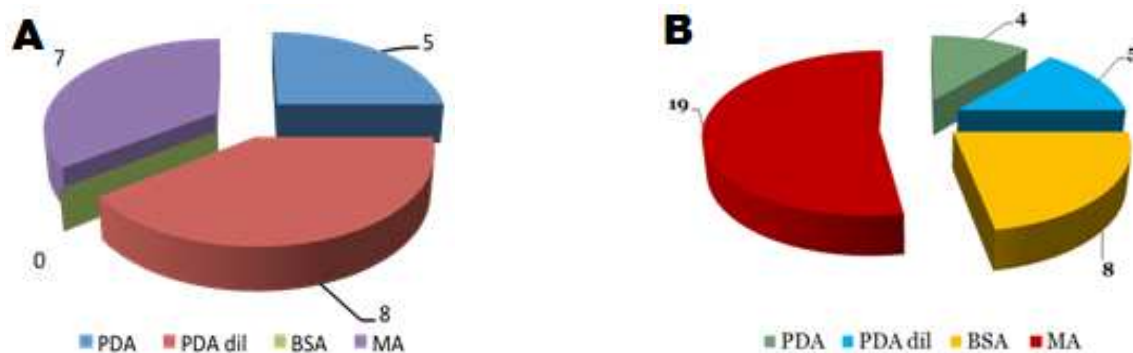
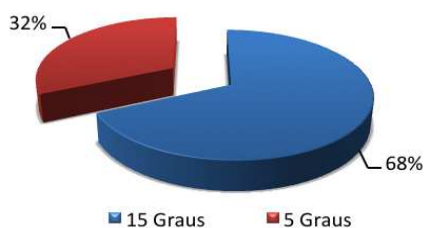


Figura 13. Porcentagem de isolados obtidos nas duas temperaturas utilizadas para o isolamento (5 °C e 15° C).



Posteriormente os 226 isolados foram submetidos à identificação molecular utilizando como marcadores as regiões ITS-DNAr para os fungos filamentosos e D1/D2-28S para as leveduras. Os dados relacionados com a comparação das sequências com as sequências obtidas nos bancos de dados, bem como as árvores filogenéticas geradas estão apresentados em anexo.

De acordo com os dados de sequenciamento e análise filogenética, representantes de nove gêneros e 12 espécies de leveduras foram isoladas das amostras de sedimentos marinhos da Antártica, sendo a maioria dos isolados pertencentes ao filo Basidiomycota. Um grande número de isolados (n=75, 45,18%) foi identificado como pertencente à espécie *Metschnikowia australis* (ANEXO XV e XVI). Em adição, 36 isolados (21,68%) foram afiliados ao gênero *Mrakia* (ANEXO XV e XVII), sendo 26 identificados como *M. frigida* (*Candida frigida*) e dez como *M. blollopis*. A espécie *Cryptococcus gastricus* (ANEXO XV e XVIII) foi representada por 13 isolados (5,75%). Esse também foi o número de isolados identificados como pertencente ao gênero *Glaciozyma* (5,75%), dos quais seis foram afiliados

às espécies *G. martinii* e *G. litoralis*, e um identificado como *G. antarctica* (*Leucosporidium antarcticum*) (ANEXO XV e XIX).

As leveduras com números inferiores a 10 isolados foram identificadas como pertencente ao gênero *Meyerozyma*, sendo oito identificados como *M. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) (n=9, 3,98%) e um como *M. caribbica* (*Pichia caribbica*) (ANEXO XV e XX); *Holtermanniella wattica* (classificada anteriormente como *Cryptococcus watticus*) (n=9, 3,98%) (ANEXO XV e XXI); *Rhodotorula muscorum* (*Leucosporidiella muscorum*) (n=7, 3,09%) (ANEXO I e XXII); *Cystobasidium* sp. (n=3, 1,32%) (ANEXO XV e XXIII) e *Phenoliferia glacialis* (n=1, 0,44%) (ANEXO XV e XXIV).

Para os fungos filamentosos, os dados de sequenciamento e análises filogenéticas demonstraram a presença de oito gêneros e quatro espécies nas amostras de sedimentos marinhos da Antártica, sendo todos os isolados pertencentes ao filo Ascomycota. Os gêneros com maior número de isolados foram *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* (ambos com n=24, 40,00%; ANEXOs XXV; XXVI e XXVII). Seguidos pelo gênero *Cadophora* (n=4, 6,67%) sendo três isolados identificados como *C. malorum* e um como *C. fastigiata* (ANEXOs XXV; XVIII); *Cladosporium* (n=3, 5,00%) (ANEXOs XXV e XXIX); *Toxicocladosporium* (ANEXOs XXV; XXX), *Pseudocercospora* (ANEXOs XXV; XXXI), *Pestalotiopsis* (ANEXOs XXV; XXXII) e *Paraconiothyrium* (ANEXOs XXV; XXXIII), (todos com n=1, 1,67%). Um dos isolados não pôde ser identificado por apresentar baixa similaridade de sequência com as sequências do banco de dados *GenBank*, sendo a maior similaridade (86%) com a espécie *Phaeoacremonium santali* (ANEXOs XXV; XXXIV).

Na Tabela 4 são apresentados os dados referentes aos isolados (número e identificação) e às amostras das quais os mesmos foram recuperados. Esses resultados revelaram que a partir da amostra A6 (Refúgio 2 entre marés) um maior número de fungos foi isolado (35,8%). A amostra com o segundo maior número de isolados foi a A5 (Refúgio 2) (24,7%), seguida pela A4 (Punta Ullman) (17,2%), amostra A2 (Botany Point) (11,5%) e amostra A3 (EACF) (10,6%).

Todos os 226 isolados estão sendo mantidos na coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). Os isolados de fungos filamentosos foram fotodocumentados e preservados pelos métodos de Castellani e criopreservação a -80°C. As leveduras foram preservadas por criopreservação a -80°C. Os dados referentes ao isolamento, preservação e

identificação molecular foram organizados em planilhas e serão introduzidos no sistema de gerenciamento de acervo da CRM-UNESP, o microSICol.

Tabela 4. Fungos obtidos das amostras de sedimentos marinhos da Antártica.

	A2	A3	A4	A5	A6	Total
Ascomycota						
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.1	1	0	1	0	4	6
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.2	0	0	0	1	0	1
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.3	6	2	2	1	4	15
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.4	0	0	0	2	0	2
<i>Penicillium solitum</i>	2	3	8	5	2	20
<i>Penicillium commune</i>	2	0	1	0	0	3
<i>Penicillium</i> sp.	1	0	0	0	0	1
<i>Cladosporium</i> sp.1	0	1	0	0	0	1
<i>Cladosporium</i> sp.2	0	0	1	0	0	1
<i>Cladosporium</i> sp.3	0	0	1	0	0	1
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	0	0	0	1	1
<i>Pseudocercospora</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Toxicocladosporium</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Cadophora malorum</i>	0	3	0	0	0	3
<i>Cadophora fastigiata</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Metschnikowia australis</i>	1	6	2	22	44	75
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	7	0	1	0	0	8
<i>Meyerozyma caribbica</i>	0	0	0	0	1	1
Não identificado	0	0	1	0	0	1
Basidiomycota						
<i>Rhodotorula muscorum</i>	0	0	0	1	6	7
<i>Mrakia blollopis</i>	2	6	1	1	0	10
<i>Mrakia frigida</i>	1	0	9	15	1	26
<i>Cryptococcus gastricus</i>	0	0	11	1	1	13
<i>Glaciozyma martinii</i>	0	2	0	1	3	6
<i>Glaciozyma antarctica</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Glaciozyma litoralis</i>	2	0	0	0	4	6
<i>Cystobasidium</i> sp.	0	0	0	3	0	3
<i>Holtermanniella wattica</i>	0	0	0	0	9	9
<i>Phenoliferia glacialis</i>	0	0	0	0	1	1
Total	26	24	39	56	81	226

A2- Botany Point, A3- EACF, A4- Punta Ullman, A5- Refúgio 2 (Sedimento), A6- Refúgio 2 (entre marés).

5.1.2. Discussão

Com base nas duas estratégias de isolamento utilizadas (com e sem enriquecimento) podemos notar uma diferença acentuada no número de fungos obtidos, principalmente no número de leveduras. Quando o enriquecimento foi utilizado, 146 leveduras foram isoladas, entretanto, na abordagem sem enriquecimento, apenas 20 leveduras foram obtidas das mesmas amostras de sedimento marinho. Estes resultados demonstram que o enriquecimento favoreceu o desenvolvimento das leveduras nas amostras estudadas.

O meio PDA e PDA diluído (10x) propiciaram o isolamento de um maior número de fungos quando comparados com os outros meios utilizados (59,73% do total de fungos isolados). Um fator que possivelmente possa ter contribuído para o maior número de isolados nesses dois meios é a presença de glicose. O PDA é um meio rico com alta concentração de glicose (20 g.L⁻¹) e o PDA diluído, apesar de ser diluído 10x possui 2,0 g.L⁻¹ de glicose. Em contrapartida, os meios BSA e MA não possuem glicose em sua composição. Cabe destacar que na segunda etapa realizada sem enriquecimento, para os fungos filamentosos o meio que resultou em um maior número de isolados foi o MA (Marine Agar), o qual assim como o PDA diluído 10x, apresenta certa oligotrofia. O bom desempenho desses meios frente ao isolamento de fungos de sedimentos marinhos da Antártica pode estar associado às condições baixas de nutrientes encontradas no ambiente marinho Antártico (ROVATI *et al.*, 2013; UETAKE *et al.*, 2012).

Do total de isolados obtidos, 68% foram isolados a 15 °C. De acordo com Ruisi *et al.* (2007), os micro-organismos provenientes da Antártica, especialmente os da península Antártica, são em sua maioria psicrotolerantes, pois a temperatura nesta região no período do verão pode atingir 15°C.

As amostras com o maior número de isolados foram a A5 (n=56 isolados) e a A6 (n=81). Os dados referentes a essas amostras estão na Tabela 1 (item 4.1). Cabe ressaltar que na amostra A6, dos 81 isolados, 44 foram da mesma levedura (*M. australis*). A *M. australis* foi recuperada de todas as amostras utilizadas no presente trabalho. É possível inferir que a amostra A6 (Refúgio 2 – entre marés), por ser uma zona de transição, sofra influência da água do mar que a banha, da água de degelo e também do solo na região próxima, fatores que podem ter influenciado no número de isolados e nas espécies ali encontradas. Em adição, a amostra A6 foi a que apresentou temperatura mais elevada no momento da coleta (2,4°C). Os dados referentes à diversidade e riqueza dos fungos obtidos nas diferentes amostras serão abordados na próxima sessão (item 5.2).

Os dados de isolamento e identificação taxonômica revelaram que a maioria dos gêneros de leveduras obtidas no presente trabalho a partir das amostras de sedimento marinho pertence ao filo Basidiomycota (77,7%). Esses dados são coerentes com relatos na literatura (CARRASCO *et al.*, 2012; CONNELL *et al.*, 2008; VAZ *et al.*, 2011).

A espécie *Metschnikowia australis* foi a mais abundante, seguida por representantes do gênero *Mrakia*, *Cryptococcus*, *Glaciozyma*, *Meyerozyma* e *Holtermanniella*. *M. australis* é uma levedura endêmica na Antártica, sendo encontrada em água marinha e é frequentemente isolada de amostras de algas e sedimentos marinhos (CARRASCO *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2013; GODINHO *et al.*, 2013; LOQUE *et al.*, 2010). Outras espécies de *Metschnikowia* foram isoladas de ambientes com baixas temperaturas como *M. bicuspidata* a qual foi isolada de água do mar no Ártico e também a *M. zobellii* em poças no gelo (BUTINAR *et al.*, 2011).

O gênero *Mrakia* está presente em geleiras, água derretida e sedimentos provenientes de geleiras, sendo encontrado nos Alpes na Itália e Áustria, no Ártico e na Antártica (CONNELL *et al.*, 2008; THOMAS-HALL *et al.*, 2009). As principais adaptações para suportar ambientes extremos são proteínas de choque térmico (*HSPs*). Uma característica interessante da *Mrakia frigida* é a produção de proteínas ativas em baixas temperaturas que inativam outras proteínas, aumentando suas chances de sobrevivência em ambientes oligotróficos (HUA *et al.*, 2010). A espécie *M. frigida* já foi isolada de amostras de solo da *Victoria Land*, Antártica (di MENNA, 1966). Existem relatos do isolamento de *M. blollopis* na Antártica, em amostras de solo e água (THOMAS-HALL *et al.*, 2009; TSUJI *et al.*, 2013; TSUJI *et al.*, 2015).

Representantes do gênero *Cryptococcus*, tais como *C. gastricus*, *C. gilvescens* e *C. terricola* são frequentemente encontrados em ambientes com baixas temperaturas, (BRANDA *et al.*, 2010; PATHAN *et al.*, 2010; GERDAY *et al.*, 1997; SCORZETTI *et al.*, 2000; TURCHETTI *et al.*, 2007). Esse gênero possui uma série de adaptações importantes para a sobrevivência em ambientes com temperaturas abaixo de zero, tais como elevada concentração de ácidos graxos insaturados presentes em suas membranas celulares e redução da atividade celular através da diminuição da cinética das reações celulares. *C. gilvescens* entre outras espécies foram isoladas de geleiras na Europa, de solo, água e geleiras no Ártico e Antártica (BUZZINI, 2010). *C. victoriae* foi reportada com o sendo uma levedura endofítica simbiote encontrada em *Deschampsia antarctica* (SANTIAGO *et al.*, 2016).

Representantes do gênero *Glaciozyma* têm sido isolados com frequência em amostras da Antártica. *Glaciozyma martinii* foi isolada de esponjas marinhas, sedimentos, solos e

também água do mar (DUARTE *et al.*, 2013; TURCHETTI *et al.*, 2011). Outras espécies de *Glaciozyma* isoladas de amostras da Antártica foram relatadas: *Glaciozyma watsonii* isolada de solo e água, e *Glaciozyma antarctica* (*Leucosporidium antarcticum*) (TURCHETTI *et al.*, 2011). Representantes da espécie *Glaciozyma litoralis* foram isolados na região do Mar Branco (Oceano Ártico), Rússia. A classificação deste gênero é relativamente nova e não há muitas informações disponíveis sobre o mesmo (TURCHETTI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015).

Meyerozyma é um gênero de levedura considerado psicrotolerante e halotolerante. *M. guilliermondii* foi reportado em amostras de geleiras, água do mar e em solo congelado na costa da Sibéria, regiões de tundra, região do Ártico e Antártica (BUTINAR *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2013; GILICHINSKY *et al.*, 2005). O primeiro relato de *M. caribbica* foi realizado por Godinho *et al.* (2013) em amostra de algas provenientes da Antártica.

Representantes do gênero *Holtermanniella* tem sido encontrados em regiões de baixa temperatura. *Holtermanniella wattica* (*Cryptococcus watticus*) e *Holtermanniella nyarrowii* (*Cryptococcus nyarrowii*) foram originalmente isoladas da Antártica. Os isolados desse gênero provenientes de regiões frias possuem elevada quantidade de ácido 9-12-octadecadienóico (ácido linoleico), um ácido graxo insaturado característico em leveduras que habitam ambientes com baixas temperaturas (GUFFOGG *et al.*, 2004; MCMURROUGH & ROSE, 1973; ROSSI *et al.*, 2009; THOMAS-HALL, 2004; WUCZKOWSKI *et al.*, 2011).

Outros gêneros menos abundantes (>5%) recuperados das amostras de sedimentos marinhos da Antártica foram *Rhodotorula*, *Cystobasidium* e *Phenoliferia*. A levedura *R. muscorum* (atual *Leucosporidium muscorum*) é psicrófila e pode ser encontrada em geleiras e em lugares próximos a elas. Dados de literatura reportam a presença desta espécie nos ambientes Ártico e Antártico. Sua principal adaptação para sobrevivência em ambientes abaixo de zero é a elevada concentração de ácidos graxos insaturados presentes em suas membranas celulares (BABJEVA & RESHETOVA, 1998; PATHAN *et al.*, 2010; de GARCÍA *et al.*, 2015).

Representantes do gênero *Cystobasidium* foram isolados de amostras da Antártica coletadas em *Litchfield Island* e *Dee Island* (TRONCOSO *et al.*, 2016). Santiago *et al.* (2016) reportaram o isolamento de uma levedura endofítica em *Deschampsia antarctica* identificada como *C. laringis*.

Phenoliferia é um gênero relativamente novo que foi utilizado para remanejar algumas espécies anteriormente classificadas como *Rhodotorula*, as quais foram isoladas de geleiras e

Alpes na Áustria e Itália (MARGESIN *et al.*, 2007; PATHAN *et al.*, 2010; TURCHETTI *et al.*, 2007).

Quanto aos fungos filamentosos, os gêneros *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* foram os mais abundantes, seguidos pelos gêneros *Cadophora*, *Cladosporium*, *Toxicocladosporium*, *Pseudocercospora*, *Pestalotiopsis* e *Paraconiothyrium*.

O gênero *Penicillium* apresenta alta conservação da região ITS e por isso o ITS-DNAr não permite distinção entre várias espécies. Assim, a utilização de um segundo marcador taxonômico (β -tubulina) foi necessária. Com base na comparação de sequências e da árvore filogenética do gene que codifica a β -tubulina foi possível identificar grande parte dos isolados do gênero *Penicillium* como pertencente à espécie *Penicillium solitum* e alguns outros como *Penicillium commune*. O *P. solitum* é considerado um micro-organismo mesofílico, psicrotolerante e halotolerante com crescimento entre 5°C e 30°C e salinidade de até 15% de NaCl (RAGHUKUMAR *et al.*, 2010). Gonçalves *et al.* (2013) relata o primeiro isolamento de *P. solitum* proveniente de amostra de sedimento marinho da Antártica. O gênero *Penicillium* é comumente encontrado em ambientes frios. No Ártico há relatos das espécies *P. bialowiezense*, *P. chrysogenum*, *P. thomii*, *P. solitum*, *P. palitans*, *P. echinulatum*, *P. polonicum*, *P. commune*, *P. discolor* e *P. expansum* (SONJAK *et al.*, 2006). No trabalho de Godinho *et al.*, (2013) realizado com algas da Antártica representantes do gênero *Penicillium* foram identificados utilizando o gene da β -tubulina como *P. spinulosum*, *P. steckii*, *P. citrinum* e *P. chrysogenum*.

O gênero *Pseudogymnoascus* possui uma distribuição abrangente no globo terrestre, sendo encontrado em ambientes marinhos, no solo e também no ar (KIRK *et al.*, 2008). Em geral os membros desse gênero são psicrófilos/psicrotolerantes e possuem tolerância a ambientes salinos, encontrados na Antártica e também no Ártico principalmente em solos (ARENZ *et al.*, 2006; ARENZ & BLANCHETTE, 2011; OZERSKAYA *et al.*, 2009). Os isolados no presente trabalho tiveram alta similaridade de sequências com *P. destructans*, *P. pannorum* e *P. verrucosus*. Esses resultados são coerentes com os de vários autores: Fenice *et al.* (1997) relatam em seus estudos um isolado de *P. pannorum* proveniente de *Victoria Land* (Antártica); ARENZ & BLANCHETTE (2011) obtiveram grande número de isolados pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus* na Península Antártica e na região *Ross Sea* representando cerca de 61% dos isolados totais. No trabalho de isolamento de fungos provenientes de algas da Península Antártica (GODINHO *et al.*, 2013) são relatados 36 isolados pertencente ao gênero em questão, com identidade de 98% e cobertura de 100% da

região ITS com *P. destructans*. Esse gênero também foi isolado de amostras animais, esponjas e vertebrados marinhos (LOQUE *et al.*, 2010). No presente trabalho, considerando as informações contidas no *Genbank* e nas árvores filogenéticas não foi possível a especiação dos isolados do gênero *Pseudogymnoascus*. Na árvore filogenética alguns isolados desse gênero formaram um cluster separado (5A-1C715III e 5DC1III), assim como no trabalho de Godinho *et al.* (2013).

O gênero *Cadophora* é considerado psicrotolerante e é frequentemente isolado do ambiente antártico, havendo vários relatos em literatura do isolamento de *C. luteo-olivacea*, *C. malorum* e *C. fastigiata* (BLANCHETTE *et al.*, 2004; BLANCHETTE *et al.*, 2010; BRIDGE & SPOONER, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2012). No presente trabalho, foram identificados fungos pertencentes ao gênero *Cadophora*, afiliados às espécies *C. malorum* e *C. fastigiata*.

Representantes do gênero *Cladosporium* foram encontrados em ambiente antártico, isolados de esponjas marinhas coletadas na *King George Island* (ARENZ *et al.*, 2006; Del-Cid *et al.*, 2014). Apesar de estar entre os gêneros mais abundantes do presente trabalho, não foi possível realizar a especiação dos isolados pertencentes a esse gênero utilizando o marcador ITS.

Toxicocladosporium, *Pseudocercospora*, *Pestalotiopsis* e *Paraconiothyrium* foram os gêneros menos abundantes (<2,0%), sendo o isolamento de alguns desses gêneros no ambiente antártico possivelmente inédito.

O gênero *Toxicocladosporium* está relacionado com o gênero *Cladosporium*, mas é reconhecido atualmente como um gênero distinto (CROUS *et al.*, 2007). O isolado representante deste gênero apresentou alta porcentagem de similaridade de sequência com a espécie *Toxicocladosporium strelitziae*, entretanto a espécie não foi confirmada pela árvore filogenética. Esse gênero está associado frequentemente a plantas, sendo responsável por algumas doenças que afetam árvores e folhas. Algumas espécies também foram recuperadas de amostras clínicas (CROUS *et al.*, 2007; CRUYWAGEN *et al.*, 2015; PIÑAR *et al.*, 2015; SANDOVAL-DENI *et al.* 2015; ZHANG *et al.* 2011). De acordo com a literatura consultada, não foi encontrado relatos da presença de fungos deste gênero no ambiente antártico.

Pseudocercospora é conhecido por possuir várias espécies fitopatogênicas ou associadas a plantas (ROSSMAN *et al.*, 2016). Até o presente momento não há relato na literatura consultada de representantes desse gênero isolados de amostras da Antártica. O isolado que foi obtido no presente trabalho apresentou 99% de identidade com

Pseudocercospora fraxini mas a espécie não foi confirmada levando em consideração a análise da árvore filogenética.

O gênero *Pestalotiopsis* está frequentemente associado a fungos endofíticos de plantas tropicais, alguns de seus representantes suportam condições ambientais adversas (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012). O isolado obtido no presente estudo apresentou 100% de similaridade de sequência com diferentes espécies do gênero *Pestalotiopsis*, não sendo possível definir a espécie mesmo após as análises filogenéticas. Poucos resultados na literatura apontam o isolamento desse fungo em ambiente marinho na Antártica. Gonçalves *et al.* (2013) relataram o isolamento de *P. microspora* a partir de uma amostra de rizosfera de *Deschampsia antarctica*.

O gênero *Paraconiothyrium* possui muitos representantes comumente encontrados em associações com plantas. Até o presente momento e, de acordo com a literatura consultada, não foi encontrado relatos deste gênero na Antártica. Representantes de *Paraconiothyrium* foram isolados de ambiente marinho, incluindo amostras de esponja e sedimentos (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2009; BUDZISZEWSKA *et al.* 2011; CROUS *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2015; VERKLEY *et al.* 2004). O isolado obtido no presente trabalho apresentou maior similaridade de sequência com a espécie *Paraconiothyrium variabile*, entretanto a cobertura foi de 94%. Desta forma, este isolado foi identificado como *Paraconiothyrium* sp..

Um dos isolados obtidos não pode ser identificado devido à baixa similaridade de sequência com as sequências do Genbank. A maior similaridade foi de 86% com a espécie *Phaeoacremonium santali*. Este resultado pode indicar ser esta uma nova espécie, sendo necessários estudos adicionais para a confirmação desta hipótese.

5.2. Parte 2: Análise de diversidade

5.2.1. Diversidade α

Com base nos dados de identificação apresentados na Tabela 1 foi possível gerar as curvas de rarefação para cada amostra (ANEXOs XXV ao XLV). Os resultados das análises de cobertura revelam que apenas a curva referente à amostra EACF (A3) atingiu a assíntota. Tal resultado indica que o esforço amostral não foi suficiente para recuperar a maior parte da diversidade existente de cada amostra. Com o aumento do esforço amostral, provavelmente, seriam isoladas mais espécies fúngicas. Quando comparadas par a par, as curvas revelam que

as amostras apresentam riquezas semelhantes, visto que os intervalos de confiança se sobrepõem.

Os índices de diversidade utilizados para avaliar a diversidade α estão apresentados na Tabela 5. O estimador de riqueza Chao 1 indica que a amostra A5 apresenta a maior riqueza estimada, devido a maior presença de espécies raras nessa amostra (singletons e doubletons).

Foi possível constatar que o índice de Shannon da amostra A2 foi o maior. O índice de Simpson inverso também corroborou o resultado do índice de Shannon para a amostra A2, indicando que essa é a amostra mais diversa do estudo.

Tabela 5. Índices de diversidade, riqueza e estimador de riqueza de Chao 1

	Shannon	Simpson Inv.	Chao 1	S
Botany Point (A2)	2,11	6,38	12,92	11
EACF (A3)	1,89	5,76	8,32	8
Punta Ullman (A4)	1,98	5,41	18,82	12
Refúgio 2 (Sed.) (A5)	1,86	4,15	31,68	14
Ref. 2 (marés) (A6)	1,7	3,1	17,94	13

5.2.2. Diversidade β

Com relação ao compartilhamento de espécies (diversidade β), as amostras A5 e A6 apresentaram a maior similaridade (42,3%), seguidas pelas amostras A4 e A5 que compartilharam 40,0% de similaridade entre as comunidades (Tabela 6). As amostras que mostraram menor similaridade entre si foram a A2 e a A5 com apenas 14,6% de compartilhamento de espécies.

Pela observação do gráfico na Figura 14 é possível observar que as amostras Refúgio 2 (Sed.) e Refúgio 2 (marés) são separadas das outras três amostras pela coordenada 1. Essas amostras foram retiradas da mesma região e geograficamente são as mais distantes das outras amostras. A coordenada 2 separa essas duas amostras, fato que pode ser atribuído ao tipo da amostra, visto que a amostra A5 é proveniente de sedimento marinho e a A6 foi coleta na zona entre marés. Os dados revelados pelo compartilhamento foram confirmados, pois pelo gráfico de correspondência essas duas amostras estão mais próximas entre si quando comparadas com as outras.

Com a análise de NMDS (Figura 14) é possível avaliar a diferença entre as amostras de sedimentos através da análise de composição dos sedimentos (Tabela 7). Claramente é

possível notar que as amostras não formam um grupo coeso. Por terem vindo de pontos de coletas diferentes, essas amostras podem apresentar características singulares.

Tabela 6. Tabela de compartilhamento das amostras par a par com a porcentagem de similaridade entre os pares.

Amostra 1	Amostra 2	Bray-Curtis	Porcentagem
A2	A3	0,280	28,0%
A2	A4	0,308	30,8%
A2	A5	0,146	14,6%
A2	A6	0,206	20,6%
A3	A4	0,254	25,4%
A3	A5	0,300	30,0%
A3	A6	0,229	22,9%
A4	A5	0,400	40,0%
A4	A6	0,150	15,0%
A5	A6	0,423	42,3%

Amostras de sedimento: A2- Botany Point, A3- EACF, A4- Punta Ullman, A5- Refúgio 2 (Sedimento), A6- Refúgio 2 (entre marés).

Tabela 7. Dados de caracterização dos sedimentos marinhos para a análise NMDS.

	pH	CBD Al*	Ox. Al*	CBD Fe*	Ox Fe*	Piro Al*	Piro Fe*	TC(%)
A2	8,09	57,67	87,01	38,22	58,26	1,82	1,02	0,37275
A3	7,62	96,67	160,59	55,92	99,86	3,26	1,93	0,62205
A4	8,00	84,60	104,69	48,17	70,51	2,48	1,45	0,4445
A5	7,64	79,35	83,20	48,68	59,08	3,10	1,70	0,43975
A6	6,89	46,26	127,05	27,91	89,32	2,16	1,33	0,06906

Ox. – oxalato; CBD - Ditionito-Citrato-Bicarbonato; Piro – Pirofosfato; TC – Teor de carbono orgânico. *em ppm.

Os resultados do gráfico de correspondência (Figura 14) e do NMDS (Figura 15) revelam um mesmo padrão de agrupamento. As amostras Botany Point (A2), EACF (A3) e Punta Ullman (A4) são separadas das amostras Refúgio 2 (Sedimento – A5) e Refúgio 2 (entre marés – A6). Em adição, a coordenada 2 separa as amostras Punta Ullman (A4) e Refúgio 2 (Sedimento – A5) das demais.

Figura 14. Análise de correspondência das amostras e isolados. Os pontos coloridos representam cada uma das amostras e os azuis à distribuição das espécies.

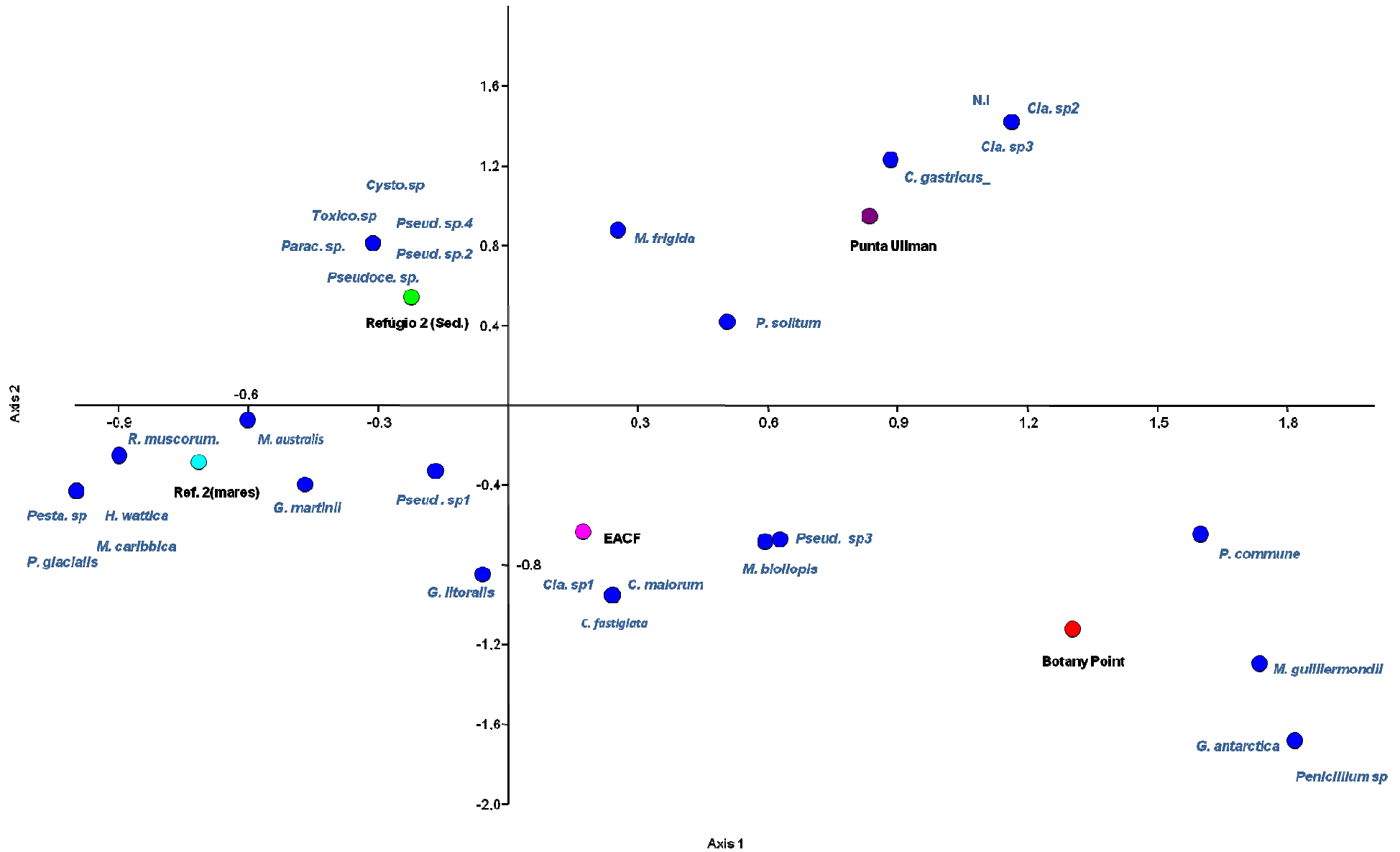
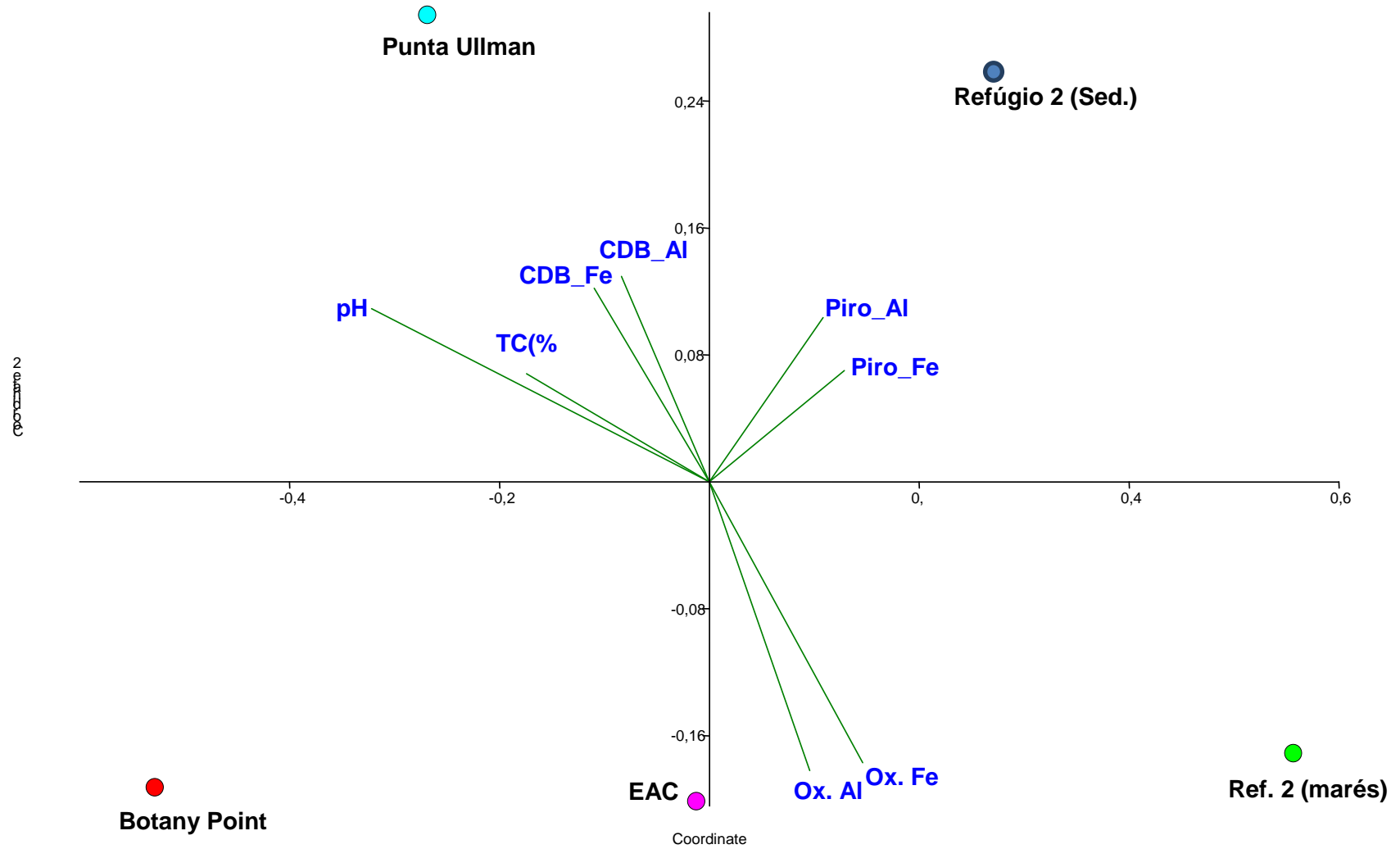


Figura 15. Gráfico obtido com os dados de caracterização dos sedimentos. Cada ponto colorido representa uma amostra de sedimento. Os vetores mostram a influencia de cada parâmetro sobre a distribuição.



5.2.3. Discussão

Com relação à diversidade α , a amostra A5 apresentou a maior riqueza de espécies, enquanto a amostra A2 se mostrou mais diversa. As réplicas da amostra A5 foram coletadas em uma profundidade média de 20 m e temperatura de 0,1°C, enquanto que as réplicas da amostra A2 foram coletadas a uma profundidade média de 24,7 m e temperatura de 0,6°C. Esses resultados revelam que amostras de sedimentos coletadas a 20 m ou mais abaixo da coluna de água e com temperaturas próximas a 0°C apresentaram maior riqueza e diversidade de fungos do que a amostra coletada na zona entre marés (superficial), a qual possuía uma temperatura mais elevada (2,4°C).

Com relação à diversidade β , era esperado que as amostras A5 e A6 apresentassem compartilhamento maior de espécies, pois elas foram retiradas da mesma região geográfica (a poucos metros de distância). Entretanto, apesar da maior similaridade ser entre as amostras A5 e A6, a porcentagem de similaridade foi baixa, não atingindo 50% de compartilhamento.

Essa hipótese é sustentada pelo gráfico de NMDS, onde nenhuma amostra apresenta grande similaridade, todas ficaram dispersas no gráfico. Ao comparar esse gráfico com o obtido na análise de correspondência é possível notar grande similaridade entre eles, as posições entre as amostras são praticamente as mesmas, apenas estão invertidas em relação aos eixos. Esses resultados sugerem que a separação entre as amostras e os diferentes isolados encontrados estão diretamente relacionados com a localização de cada ponto de coleta. As amostras A5 (Refúgio 2 Sedimento) e A6 (Refúgio 2 entre marés) se distanciam dos outros três sedimentos na componente, provavelmente por serem geograficamente afastadas das outras amostras (Figura 6). O distanciamento dessas duas amostras (entre si) pode estar associado ao fato das mesmas serem provenientes de condições distintas, como por exemplo a profundidade (réplicas da amostra A5 foram coletadas em profundidade média de 20 m, enquanto que a coleta da amostra A6 foi realizada na superfície da zona entre marés) e temperatura (a temperatura das réplicas da amostra A5 estavam em torno de 0,1 °C na hora da coleta, enquanto que a da A5 em torno de 2,4°C).

Realizando a junção de todos os dados obtidos de diversidade é possível inferir que a diversidade fúngica nos sedimentos da Antártica se altera em relação aos pontos de coleta. Cada amostra é única, proporcionando o desenvolvimento de comunidades de fungos distintas.

5.3. Parte 3: Prospecção de fungos produtores de lipases e proteases

5.3.1. Resultados

As leveduras e os fungos filamentosos provenientes do isolamento com enriquecimento foram submetidos aos experimentos de produção de lipases e proteases. Dentre as 146 leveduras e os 24 fungos filamentosos, estudados 60 e 19 apresentaram resultado positivo para lipase na triagem qualitativa, respectivamente. Os isolados positivos na triagem qualitativa foram submetidos aos experimentos de quantificação da atividade lipolítica.

Os resultados da triagem quantitativa revelaram que 16 leveduras e nove fungos filamentosos apresentaram atividade mensurável nas condições estudadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 8. A levedura 6A-1C2II identificada como *Metschnikowia australis* e isolada do sedimento marinho proveniente do Refúgio 2 (entre marés; 2,4 °C) apresentou o melhor resultado de atividade enzimática (0,88 U.mL⁻¹). Para os fungos filamentosos, o isolado 3A-1C315III proveniente da amostra de EACF (profundidade 22,9 m; 0,5 °C) e identificado como *Cadophora fastigiata*, apresentou a maior atividade enzimática (0,22 U.mL⁻¹).

De maneira geral, as leveduras apresentaram atividade mais expressiva de lipases do que os fungos filamentosos. Dez dos 75 isolados de *M. australis*; quatro dos 13 isolados de *C. gastricus* e dois dos 26 isolados de *M. frigida* apresentaram atividade lipolítica mensurável. Dos dez isolados de *M. australis* (13,3%) que apresentaram atividade lipolítica em meio líquido, sete são provenientes da mesma amostra (A6 – Refúgio 2 entre marés), dois da amostra A3 (EACF) e um da amostra A2 (Botany Point). Dois dos quatro isolados de *C. gastricus* (30%) também são provenientes da amostra A6 (Refúgio 2 - entre marés), um da amostra A5 (Refúgio 2 – Sedimento) e um da amostra A4 (Punta Ullman). Dentre os dois isolados de *M. frigida* (7,69%), um é proveniente da amostra A5 (Refúgio 2 – Sedimento) e outro da amostra A4 (Punta Ullman). Dos 16 isolados com atividade lipolítica mensurável, nove são provenientes da amostra A6 (Refúgio 2 - entre marés).

A maioria dos fungos filamentosos que apresentaram atividade mensurável para lipases pertence ao gênero *Penicillium* (77,77%). Dos seis isolados de *Penicillium* produtores de lipase, um é proveniente da amostra A2 (Botany Point), um da A3 (EACF), três da amostra A4 (Punta Ullman) e um da A5 (Refúgio 2 – Sedimento). Além dos isolados de *Penicillium*, outros dois fungos apresentaram atividade de lipase: *Cladosporium* sp. (proveniente da amostra A4 - Punta Ullman) e *C. fastigiata*

(proveniente da amostra A3 - EACF) que apresentou o maior valor de atividade desta enzima (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade lipolítica das leveduras e fungos filamentosos selecionados após cultivo por sete dias a 15°C e 150 rpm.

Leveduras	Identificação	U.mL ⁻¹	Fungos filamentosos	Identificação	U.mL ⁻¹
6A-1C2II	<i>M. australis</i>	0,88	3A-1C315III	<i>C. fastigiata</i>	0,22
5A-1C115I	<i>C. gastricus</i>	0,86	5A-1C115II	<i>P. solitum</i>	0,09
6A-3C515III	<i>C. gastricus</i>	0,85	2A-1C115II	<i>P. commune</i>	0,06
6A-1C2IIIA	<i>M. australis</i>	0,85	5B-1C315II	<i>P. solitum</i>	0,05
6A-1C4I	<i>M. australis</i>	0,83	4A-1C115III	<i>P. solitum</i>	0,05
6A-1C6I	<i>M. australis</i>	0,81	4A-1C315III	<i>P. solitum</i>	0,04
6A-3C515III	<i>C. gastricus</i>	0,80	3A-1C215IIIA	<i>P. solitum</i>	0,03
6A-1C215II	<i>M. australis</i>	0,79	4B-1C115III	<i>Cladosporium</i> sp.	0,03
3A-1C3IIIA	<i>M. australis</i>	0,77	4B-1C1II	<i>P. solitum</i>	0,02
4A-3C115II	<i>C. gastricus</i>	0,05			
4B-1C415II	<i>M. frigida</i>	0,02			
6A-1C315III	<i>M. australis</i>	0,02			
3A-1C2IIIC	<i>M. australis</i>	0,01			
2A-3C215III	<i>M. australis</i>	0,01			
5A-1C3II	<i>M. frigida</i>	0,01			
6A-1C6I	<i>M. australis</i>	0,01			

Com relação à atividade proteolítica, nove isolados do total de 170 (obtidos no isolamento com enriquecimento) apresentaram capacidade para degradação de proteína no teste qualitativo. Na etapa quantitativa, os nove isolados (três leveduras e seis filamentosos) apresentaram atividade proteolítica mensurável. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Dentre as leveduras, o isolado 6A-1C215I recuperado da amostra A6 (Refúgio 2-entre marés; superficial; 2,4 °C) e identificado como *Rhodotorula muscorum* apresentou a maior atividade de proteases. Os outros dois isolados de levedura que apresentaram atividade proteolítica foram identificados com *Mrakia frigida* e ambos são provenientes da amostra A4 (Punta Ullman). O fungo filamentoso 4A-1C615III identificado como *Pseudogymnoascus* sp. e foi isolado do sedimento marinho em Punta Ullman (20,3 m de profundidade; 0,5 °C) apresentou o maior valor de atividade de protease (6,21 U.mL⁻¹).

Para as proteases, os fungos filamentosos apresentaram resultados de atividade enzimática mais expressivos do que as leveduras. Cinco dos 24 isolados do gênero

Pseudogymnoascus e um isolado dentre os 24 isolados do gênero *Penicillium* (*P. solitum*) apresentaram atividade proteolítica mensurável. Dois dos cinco isolados são provenientes da amostra A5 (Refúgio 2 – Sedimento), um da amostra A4 (Punta Ullman), um da amostra A3 (EACF) e um da amostra A2 (Botany Point). Nesse caso, todos os isolados foram provenientes dos sedimentos marinhos coletados em profundidade, nenhum dos isolados proteolíticos foi obtido a partir da amostra A6 (Refúgio 2 - entre marés).

Tabela 9. Atividade proteolítica das leveduras e fungos filamentosos após cultivo por sete dias a 15°C e 150 rpm.

Leveduras	Identificação	U.mL ⁻¹	Fungos Filamentosos	Identificação	U.mL ⁻¹
6A-1C215I	<i>R. muscorum</i>	0,49	4A-1C615III	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	6,21
4B-1C415II	<i>M. frigida</i>	0,38	5A-1C715III	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	5,53
4B-1C515I	<i>M. frigida</i>	0,08	2B-1C115III	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	5,43
			5A-1C315III	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	5,22
			3A-1C215IIIB	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	2,51
			3A-1C215IIIA	<i>P. solitum</i>	2,42

5.3.2. Discussão

Os dados derivados das análises de produção de lipases e proteases em meio líquido e sólido revelaram que as leveduras foram mais expressivas para a produção de lipases do que os fungos filamentosos. Dentre as leveduras que apresentaram atividade mensurável de lipases, a maioria (56,25%) foi proveniente da amostra A6 (Refúgio 2 - entre marés). Esses resultados podem ser justificados pelo fato dessa amostra ser de uma região entre marés, ou seja, de transição entre o mar e o continente, onde pode ocorrer maior acúmulo de óleos e gorduras (de origem animal) ou mesmo de poluição que possa ser trazida por correntes marítimas (petróleo, fluidos de motor de barcos, entre outros).

Uma grande quantidade de leveduras (41,1%) apresentou resultado positivo para produção de lipases no teste em meio sólido (triagem qualitativa), entretanto, poucos isolados foram capazes de produzir a enzima em meio líquido. Essa questão não está muito bem esclarecida na literatura consultada, pois não ocorre o aprofundamento das razões que possam ter levado a esse fato. Uma hipótese a ser levada em consideração seria a disponibilidade do azeite de oliva (indutor e fonte de carbono). No meio sólido o azeite fica imobilizado pela estrutura formada pela solidificação do agar, isso faz com que sua disponibilidade para o micro-organismo seja maior. Já no meio líquido, ocorre à separação entre o meio aquoso e o azeite de oliva, causando a diminuição da disponibilidade, visto que a área superficial do azeite será apenas na interface água/óleo

na superfície do meio. Além disso, o azeite tende a formar grumos e se acumular em uma pequena região. Tais fatores podem explicar, mesmo que parcialmente, a diferença observada entre os isolados positivos na triagem qualitativa (meio sólido) e na quantitativa (meio líquido). Em adição, outros fatores podem ter contribuído para essa discrepância, tais como disponibilidade de oxigênio, fisiologia do micro-organismo (*e.g.* estrutura de hifas) no meio sólido e no meio líquido.

A produção de lipases por leveduras da Antártica pertencentes aos gêneros *Cryptococcus* e *Leucosporidium* (0,1 a 0,23 U.mL⁻¹) foi reportada por Duarte (2014). No presente trabalho, isolados do gênero *Cryptococcus* demonstraram atividade lipolítica atingindo valor máximo de 0,86 U.mL⁻¹ na fase de quantificação. A levedura 6A-1C2II identificada como *M. australis* apresentou o melhor resultado de produção de lipase. *M. australis* pertence ao Filo Ascomycota, em geral a maioria das leveduras que possuem capacidade de degradar lipídeos pertencem a esse Filo, com destaque para os representantes dos gêneros *Candida*, *Yarrowia* e *Saccharomyces* (VAKHLU & KOUR, 2006). Em seu trabalho com isolamento de leveduras de ambiente antártico Vaca *et al.* (2013) relata que dois isolados de *M. australis* mostraram atividade lipolítica, mas foi realizado apenas *screening* inicial (não foi feita quantificação). Outros isolados do gênero também demonstraram atividade lipolítica, tais como: *M. continentalis* e *Metschnikowia hibisci*, ambas foram recuperadas de amostras de plantas, mas também só foi realizado o *screening* inicial (LACHANCE, 1995).

Quanto à produção de proteases, os fungos filamentosos foram mais expressivos do que as leveduras, sendo todos os isolados que apresentaram atividade mensurável de proteases provenientes das amostras de sedimento coletadas em profundidade (A2, A3, A4 e A5), nenhum isolado proteolítico foi obtido a partir da amostra A6, como observado para a produção de lipases.

O fungo filamentoso 4A-1C615III identificado como *Pseudogymnoascus* sp. apresentou o maior valor de atividade desta enzima. A capacidade de fungos filamentosos do gênero *Pseudogymnoascus* de produção de proteases têm sido reportado em literatura. Porém, a maioria faz menção apenas à triagem e análise qualitativa sem dados de quantificação da atividade proteolítica (CHATURVEDI *et al.*, 2010; EDGINGTON *et al.*, 2014; KRISHNAN *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2015).

Estudos prévios realizados por pesquisadores e colaboradores do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o potencial de leveduras e fungos filamentosos da Antártica para a produção de proteases. O fungo filamentosos *Geomyces pannorum* S2B isolado de

amostra de invertebrado marinho da Antártica apresentou produção de protease no valor de 53,25 U.mL⁻¹ (SANTOS *et al.*, 2015), enquanto o fungo *Acremonium* sp. L1-4B isolado de amostra de líquen, foi capaz de produzir em torno de 450,00 U.mL⁻¹ de protease quando cultivado em resíduo agroindustrial e após otimização do processo utilizando o método de superfície de resposta (NASCIMENTO *et al.*, 2015). No presente trabalho a definição de atividade enzimática levou em consideração a mudança de 0,01 no valor da absorbância registrada pelo espectrofotômetro, outros trabalhos levam em consideração a mudança de 0,001 no valor de absorbância. As diferentes definições de atividade enzimática bem como a utilização de métodos específicos dificultam as comparações dos resultados entre trabalhos de diferentes autores. Assim, para a realização da comparação dos valores obtidos no presente trabalho com os valores obtidos em outros estudos que consideram a variação de 0,001, é necessário aplicar um fator de multiplicação de 10 vezes nos resultados obtidos para o fungo 4A-1C615III identificado como *Pseudogymnoascus* sp.

Com base nos resultados obtidos a levedura *M. australis* 6A-1C2II e o fungo filamentosso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III foram selecionados e submetidos aos experimentos de avaliação de diferentes fatores na produção de lipase e protease, respectivamente.

5.4. Parte 4: Avaliação da influência de diferentes fatores na produção de lipase e protease pelos isolados selecionados

5.4.1. Resultados

O planejamento experimental foi aplicado aos melhores isolados produtores de lipase (*M. australis* 6A-1C2II) e protease (*Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III) visando avaliar os efeitos de diferentes variáveis na produção enzimática, bem como otimizar o processo de produção das enzimas estudadas.

A primeira etapa do planejamento consistiu em selecionar duas importantes variáveis: temperatura e agitação. Os resultados das melhores temperaturas e agitação para a produção de lipase e protease pelos fungos selecionados estão apresentadas nas Figuras 16, 17, 18 e 19 respectivamente.

Figura 16. Atividade de lipase de *M. australis* 6A-1C2II em diferentes temperaturas de cultivo, utilizando agitação de 150 rpm como constante.

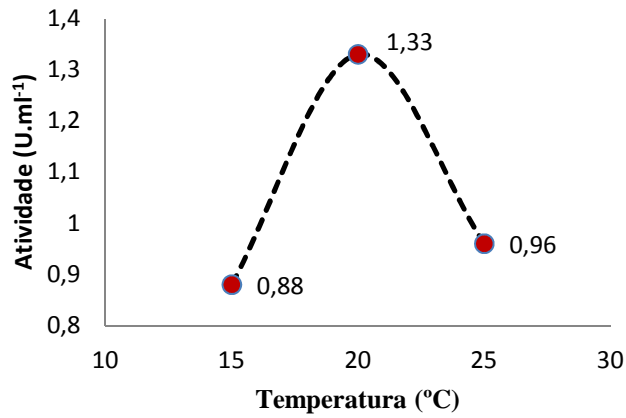


Figura 17. Atividade de lipase de *M. australis* 6A-1C2II em diferentes agitações a 20°C.

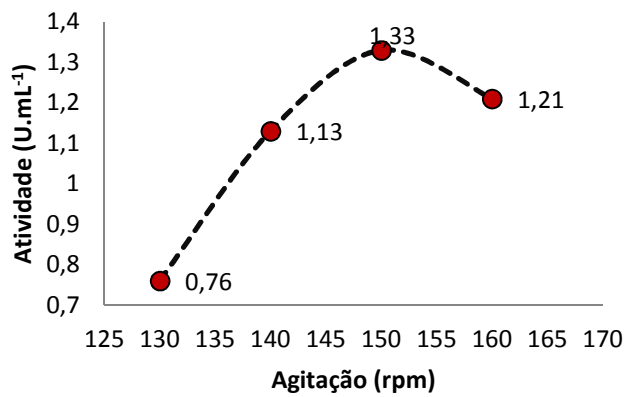


Figura 18. Atividade de protease de *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III em diferentes temperaturas de cultivo, utilizando agitação de 150 rpm como constante.

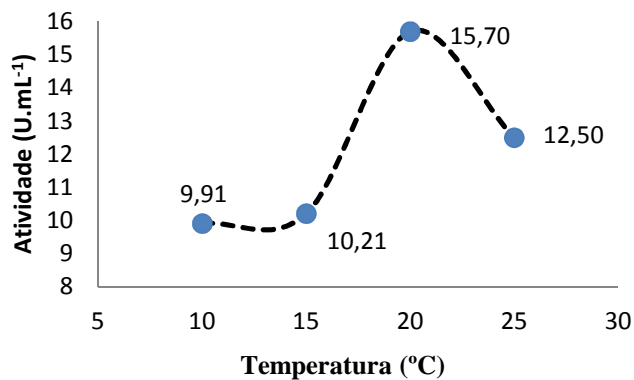
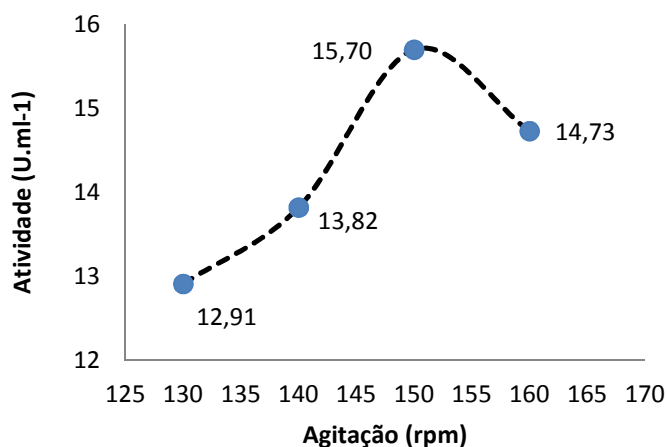


Figura 19. Atividade de protease de *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III em diferentes agitações a 20°C.



Os resultados demonstraram que para ambos os isolados as melhores atividades enzimáticas foram obtidas a 20 °C e em rotação de 150 rpm. Estas condições foram utilizadas nos estudos subseqüentes para otimização da produção enzimática.

Os resultados do primeiro planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB) para a produção de lipase pela levedura *M. australis* 6A-1C2II revelou que o melhor resultado (1,05 U.mL⁻¹) foi obtido nas condições de cultivo do ensaio 9 (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados do primeiro PB para a produção de lipase por *M. australis* 6A-1C2II após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Atividade (U.mL ⁻¹)	0,14	0	0,38	0,28	0	0,91	0,68	0	1,05	0,63	0,28	0	0,39	0,28	0,3	0	0	0	0	0

A análise dos resultados (Tabela 11) pelo software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995) indicou que nenhuma variável foi estatisticamente significativa ($p < 0,1$) para a produção da enzima. As variáveis glicose e salinidade (ASW) não estavam presentes no ensaio 9, e desta forma, a glicose foi removida do próximo planejamento. A salinidade (ASW) foi mantida para que sua influência sobre a atividade lipolítica fosse melhor avaliada no planejamento experimental subseqüente. O glicerol e o pH apresentaram efeito negativo na produção da enzima. Entretanto, no ensaio 9 o glicerol estava presente no em sua maior concentração (2%) e o pH estabelecido foi o de valor 6,0. Todos os outros fatores apresentaram efeito geral positivo. As concentrações/valores das variáveis do ensaio 9, juntamente com a análise dos resultados dos efeitos das

variáveis serviram de base para a estruturação do segundo experimento do desenho experimental.

Tabela 11. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB16 para a produção de lipase por *M. australis* 6A-1C2II (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm).

	Peptona	Azeite de Oliva	Glicose	Tween 80	Inóculo	Ext. Levedura	NaNO ₃	Ureia	Glicerol	ASW	pH
Efeito	0,10	0,74	0,10	0,82	0,09	0,92	0,64	0,41	-0,28*	0,23	-0,22*
p	0,90	0,38	0,90	0,33	0,91	0,28	0,44	0,62	0,73	0,78	0,79

*variáveis com efeito negativo

Os resultados do segundo PB estão apresentados na Tabela 12. O melhor resultado foi obtido nas condições de cultivo do ensaio 11 (1,20 U.mL⁻¹).

Tabela 12. Resultados do segundo PB para a produção de lipase por *M. australis* 6A-1C2II após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Atividade (U.mL⁻¹)	0,36	0,2	0,17	0	0,74	0	0	0,71	0,41	1,01	1,2	1,05	0	0,77	0,04	0	0,31	0,3	0,35	0,29

As análises estatísticas do segundo PB, indicaram que as variáveis salinidade, ureia e Tween 80 apresentaram efeito positivo e estatisticamente significativo (p<0,1) para a produção da enzima. Peptona, azeite de oliva e nitrato de sódio apresentaram efeito negativo Tabela 13. A peptona e o azeite de oliva foram removidos para a realização do terceiro planejamento e o nitrato de sódio foi mantido para que sua influência fosse melhor avaliada. A salinidade foi fixada em 100% assim como a quantidade de inóculo (DO 0,8).

Tabela 13. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no segundo PB16 para a produção de lipase por *M. australis* 6A-1C2II (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm).

	Peptona	Azeite de Oliva	Tween 80	Quantidade inóculo	Ext. Levedura	NaNO ₃	Ureia	Glicerol	ASW	pH
Efeito	-0,11*	-0,20*	0,32	0,03	0,14	-0,01*	0,21	0,10	0,60	0,09
p	0,37	0,11**	0,02**	0,81	0,26	0,93	0,10**	0,40	0,00**	0,47

*variáveis com efeito negativo **variáveis estatisticamente significativas

O resultado do terceiro planejamento do tipo Plackett-Burman foi negativo para a produção de lipase e para o desenvolvimento da levedura. Desta forma, um novo planejamento PB foi realizado.

Os resultados do quarto PB estão apresentados na Tabela 14. Neste planejamento nenhuma das condições de cultivo apresentou valores de lipase maiores do que 1,20 U.mL⁻¹, o qual foi obtido no ensaio 9 do segundo planejamento experimental. As variáveis peptona, extrato de levedura e pH não tiveram influencia estatisticamente significativa, mas apresentaram efeito geral positivo. O Na₂CO₃ e o glicerol apresentaram efeito geral negativo, apesar de não terem significância estatística pelo p valor. As variáveis inóculo, azeite de oliva, salinidade (ASW) e Tween 80 apresentaram efeito positivo na atividade enzimática e todas foram estatisticamente significativas (Tabela 15).

Tabela 14. Resultados do quarto PB para a produção de lipase por *M. australis* 6A-1C2II após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Atividade (U.mL ⁻¹)	0,07	0,43	0,15	0,1	0,05	0,05	0,13	0,03	0,82	0,07	1,09	0,11	0,12	0,01	0,04	0,04	0,07	0,05	0,02	0,03

Tabela 15. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no quarto PB16 para a produção de lipase *M. australis* 6A-1C2II (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm).

	Peptona	Ext. Levedura	Na ₂ CO ₃	Inóculo	KH ₂ PO ₄	Azeite de Oliva	Glicerol	Tween 80	ASW	pH
Efeito	0,03	0,05	-0,03	0,18	-0,26*	0,26	-0,07	0,17	0,25	0,10
p	0,82	0,64	0,82	0,13	0,05**	0,05**	0,52	0,16	0,05**	0,38

*variáveis com efeito negativo **variáveis estatisticamente significativas

Com relação à produção de protease pelo fungo filamentosos *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III, os resultados do primeiro planejamento experimental do tipo Plackett-Burman revelaram que as condições de cultivo do ensaio 10 foram as melhores para a produção da enzima (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados do primeiro PB para a produção de protease por *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Atividade (U.mL ⁻¹)	0	5,01	9,21	20,36	14,67	14,7	8,54	15,39	0	38,15	0	0	0	0	5,82	0	0	23,33	14,18	0	0	0	0	0

As análises dos efeitos das variáveis na produção da enzima estão apresentadas na Tabela 17. As variáveis número de cilindro de inóculo, amido, skim milk e NaNO₃ tiveram influencia geral negativa e todas as outras variáveis foram positivas. Como o

nitrito de sódio teve uma influência negativa na produção de protease, a ureia foi testada como fonte alternativa de nitrogênio.

Tabela 17. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB20 para a produção de protease (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm) no primeiro planejamento experimental.

	Peptona	Caseína	Glicose	Malte	Nº Cilindro	Ext. Levedura	Amido	Skim Milk	Farinha Pena	Farinha Arroz	NaNO ₃	ASW	pH
Efeito	7,02	1,14	4,23	2,94	-0,59*	2,42	-0,48*	-3,98*	1,17	0,48	-6,19*	3,27	2,97
p	0,23	0,84	0,46	0,60	0,92	0,67	0,93	0,49	0,84	0,93	0,29	0,57	0,60

*variáveis com efeito negativo

No segundo PB, os melhores resultados de atividade de protease foram obtidos nas condições dos ensaios 13 e 14 (Tabela 18), porém foram inferiores ao obtido no ensaio 10 do primeiro PB.

Tabela 18. Resultados do segundo PB para a produção de protease por *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Atividade (U.mL⁻¹)	13,94	5,08	18,3	4,55	10,42	6,21	9,28	0	1,14	10,87	0	14,39	29,36	32,27	0	13,41	4,7	5,34	5,53	5,76

As análises estatísticas do segundo PB estão apresentadas na Tabela 19. As variáveis peptona, malte e farinha de pena apresentaram efeito geral negativo. As variáveis número de cilindro de inóculo e ureia tiveram efeito negativo na atividade enzimática e também foram estatisticamente significativas ($p < 0,2$). As demais variáveis apresentaram efeito geral positivo. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas nas condições de cultivo do ensaio 14 (32,27 U.mL⁻¹) e 13 (29,36 U.mL⁻¹). Esses dois ensaios foram repetidos (em triplicata) visando confirmação das atividades enzimáticas. O fungo quando cultivado nas condições do ensaio 14 apresentou média da atividade enzimática (14,35 U.mL⁻¹) inferior à obtida no PB. Para o ensaio 13 a média da atividade enzimática (26,75 U.mL⁻¹) foi próxima à obtida no PB. Com base nesses resultados um terceiro PB foi estruturado (PB12), variando-se a concentração de glicose, quantidade de inóculo e extrato de levedura. A farinha de pena e a ureia foram mantidas para avaliar melhor a influência desses fatores com a atividade enzimática. A concentração de peptona, malte e salinidade foram fixadas, assim como o valor de pH 6,0.

Os resultados da atividade de protease obtidos no terceiro PB foram inferiores aos obtidos nos outros PB (Tabela 20). De acordo com as análises estatísticas (Tabela 21). As

variáveis glicose e farinha de pena apresentaram efeito positivo e estatisticamente significativo ($p < 0,2$). A ureia teve influência negativa e também estatisticamente significativa. Número de cilindros de inóculo e peptona demonstraram efeito geral negativo.

Tabela 19. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB16 para a produção de protease (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm) no segundo planejamento experimental.

	Peptona	Glicose	Malte	Nº Cilindro	Ext. Levedura	Farinha Pena	Farinha Arroz	Ureia
Efeito	-5,25*	1,09	-0,50*	-9,65*	2,47	-0,32*	0,41	-6,19*
p	0,26	0,81	0,91	0,05**	0,59	0,94	0,93	0,19**

*variáveis com efeito negativo **variáveis estatisticamente significantes ($p < 0,2$)

Tabela 20. Resultados do terceiro PB para a produção de protease por *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III após sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Atividade (U.mL ⁻¹)	8,8	12,03	3	9,14	8,84	6,03	7,27	6,77	8,52	5,71	5,45	5,49	8,53	8,62	8,72	6,63

Tabela 21. Efeitos das variáveis independentes utilizadas no PB16 para a produção de protease (sete dias de cultivo a 20°C e 150 rpm) no terceiro planejamento experimental.

	Glicose	Nº Cilindro	Ext. levedura	Farinha Pena	Ureia
Efeito	2,34	-0,30*	-0,84*	3,02	-1,55*
p	0,01**	0,66	0,24	0,00**	0,04**

*variáveis com efeito negativo **variáveis estatisticamente significantes ($p < 0,2$)

Após a realização dos planejamentos experimentais para a maximização da produção de lipase e protease pelos fungos selecionados, os ensaios que apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática foram submetidos aos experimentos de validação. Esses experimentos foram conduzidos visando confirmar a atividade enzimática reproduzindo os ensaios em triplicata e avaliar o peso seco durante o período de 11 dias de cultivo.

Para a enzima lipase os ensaios submetidos à validação foram o 11 e o 12 do segundo planejamento experimental. Os resultados estão apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Os gráficos de barra indicam a atividade ao longo do tempo e o gráfico de dispersão a evolução da biomassa.

A maior atividade enzimática obtida nos experimentos de validação do ensaio 11 (0,48 U.mL⁻¹) foi inferior do que a obtida durante o planejamento experimental (1,20

U.mL⁻¹). Entretanto, para o ensaio 12 os valores foram similares, sendo 0,99 U.mL⁻¹ durante a validação e 1,05 U.mL⁻¹ durante o planejamento, validando esta condição de cultivo. Para ambos os ensaios as maiores atividades enzimáticas foram obtidas no 11º dia de cultivo, quando a curva de crescimento mostra uma tendência em aumentar. O comportamento das curvas de crescimento foram diferentes da curva teórica não apresentando fase de lag, log, estacionária e declínio/morte celular definidas.

Para a validação da produção de protease pelo fungo filamentoso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III foram reproduzidas as condições de cultivo dos ensaios 3 e 13 do segundo planejamento experimental. Os resultados estão apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

As atividades proteolíticas obtidas nos ensaios 3 e 13 foram próximas (10,14 e 11,47 U.mL⁻¹, respectivamente), entretanto, inferiores às obtidas nos planejamentos experimentais (18,30 e 29,36 respectivamente). A curva do crescimento do microorganismo nas condições de cultivo do ensaio 3 apresentou as etapas do crescimento definidas até o declínio que ocorreu no 9º dia, juntamente com o pico da atividade proteolítica, e começou a aumentar novamente.

Figura 20. Média das atividades enzimáticas de lipase (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) da levedura *M. australis* 6A-1C2II cultivada nas condições do ensaio 11 do segundo PB (150 rpm; 20 °C).

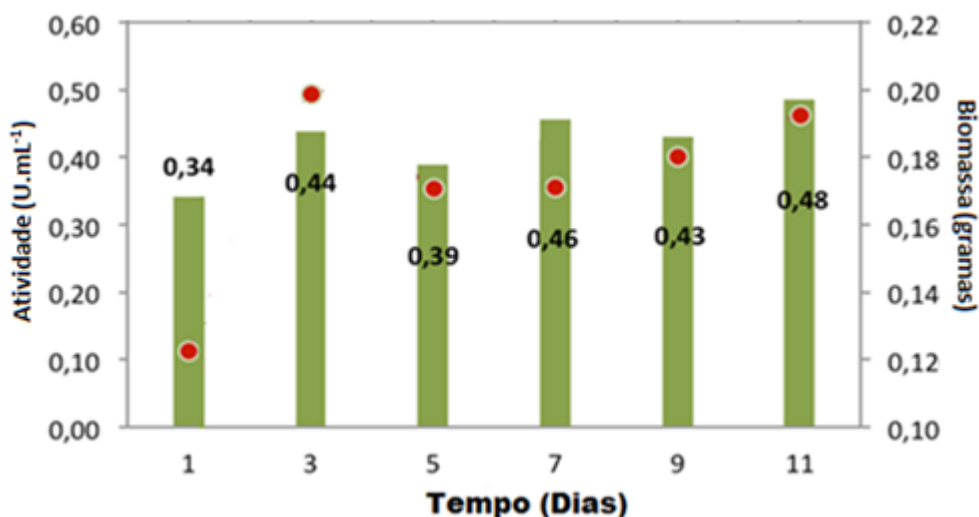


Figura 21. Média das atividades enzimáticas de lipase (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) da levedura *M. australis* 6A-1C2II cultivada nas condições do ensaio 12 do segundo PB (150 rpm; 20 °C).

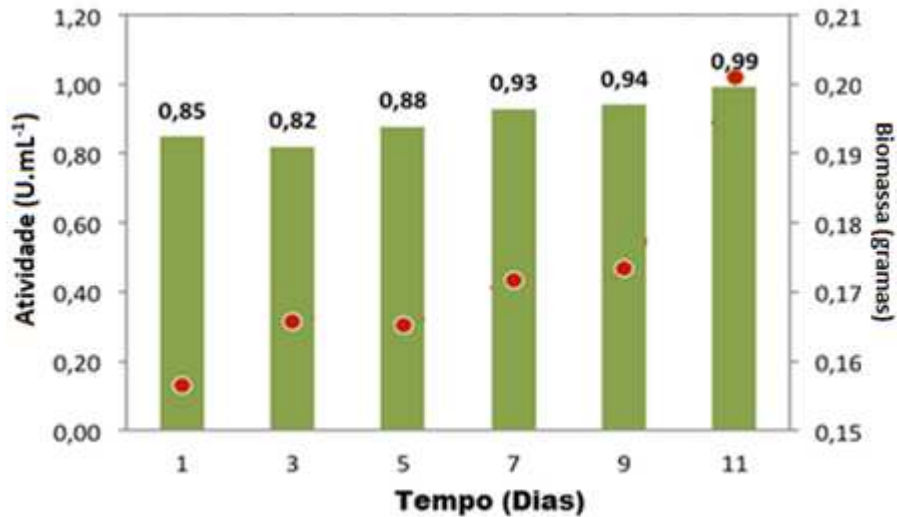


Figura 22. Média das atividades enzimáticas de protease (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) do fungo filamentosso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III cultivado nas condições do ensaio 3 do segundo PB (150 rpm; 20 °C).

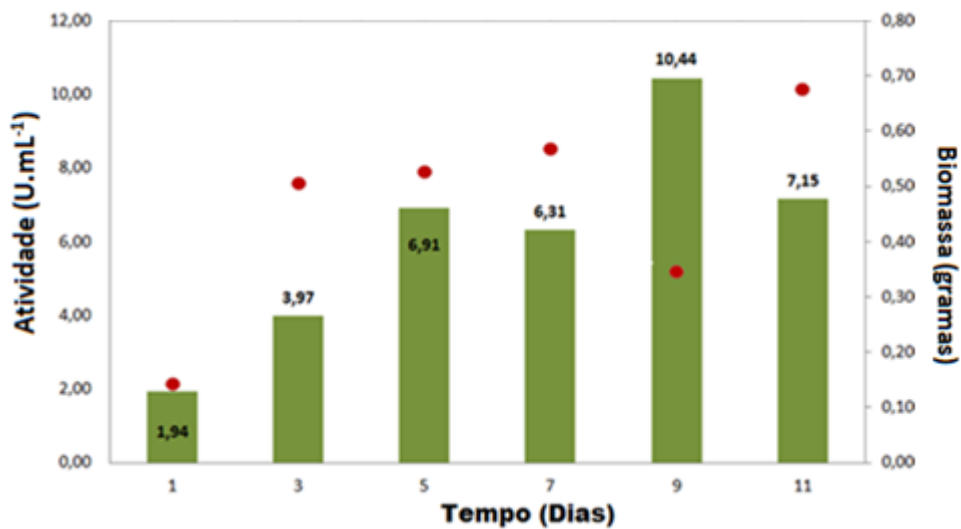
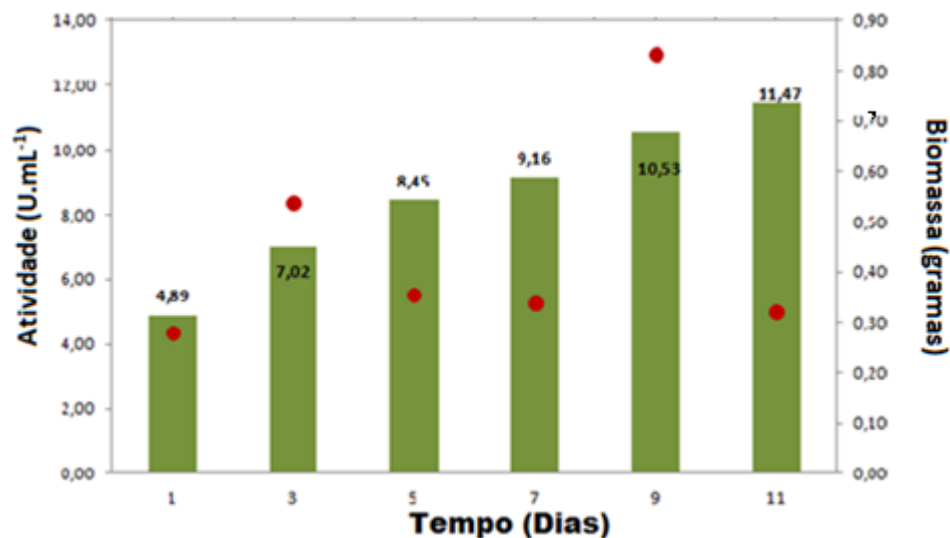


Figura 23. Média das atividades enzimáticas de protease (barras verdes) e biomassa seca (pontos vermelhos) do fungo filamentoso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III cultivado nas condições do ensaio 13 do segundo PB (150 rpm; 20 °C).



5.4.2 Discussão

O método Plackett-Burman (PLACKETT & BURMAN, 1946) foi aplicado no presente trabalho com o intuito de avaliar quais as possíveis variáveis presentes no meio que influenciariam no aumento da atividade lipolítica e proteolítica dos micro-organismos selecionados.

Após a condução de quatro planejamentos experimentais do tipo PB, a produção de lipase pela levedura *M. australis* 6A-1C2II aumentou 1,36 vezes quando comparada com a produção inicial obtida na triagem quantitativa (0,88 U.mL⁻¹). Entretanto, nos experimentos de validação o melhor resultado da atividade enzimática foi inferior ao obtido no PB (0,99 U.mL⁻¹). A avaliação da influência de diferentes variáveis na produção de lipase pela levedura *M. australis* 6A-1C2II não resultou em aumento expressivo da produção dessa enzima, indicando que novos estudos utilizando outras condições de cultivo, incluindo fontes de carbono e nitrogênio, devem ser conduzidos.

Após avaliação do efeito das diferentes variáveis utilizadas no processo de produção de lipase pela levedura *M. australis* 6A-1C2II algumas considerações devem ser apresentadas: i) A concentração de peptona pode levar a produção de proteases durante o processo, o que nesse caso pode prejudicar a ação das lipases, visto que as proteases liberadas no meio de cultivo podem clivar regiões polipeptídicas das lipases, fazendo assim com que haja decréscimo da atividade lipolítica (GORDILLO *et al.*,

1995); ii) É provável que a elevada concentração de glicerol e Tween 80 tenham causado inibição/morte celular no PB3, não permitindo que a levedura se desenvolvesse e produzisse lipase. O pouco crescimento do micro-organismo foi constatado através da observação do meio de cultura, pois o mesmo manteve-se límpido durante o período de sete dias e não houve formação de *pellet* no fundo do tubo de cultivo após a centrifugação dos meios para obtenção do caldo bruto. O Tween 80 pela sua própria estrutura é considerado um indutor para lipases, além disso, é um surfactante, aumentando a superfície de contato com o óleo, podendo facilitar no processo de contato da enzima com o substrato (BISHT *et al.*, 2013). O glicerol também é utilizado como indutor, mas tanto ele como o Tween pode apresentar efeitos citotóxicos (BIANCHI *et al.*, 2011; do SANTOS *et al.*, 2006; GRIPPA *et al.*, 2010).

São poucos os estudos reportados em literatura sobre a quantificação e maximização da produção de lipases em micro-organismos provenientes da Antártica. Duarte (2014) reportou a produção de lipase pelas leveduras de ambiente antártico *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scotti* utilizando planejamento experimental. Os resultados obtidos (0,88 para *C. laurentii* L59 e 2,07 U.mL⁻¹ para *L. scotti*) foram próximos aos valores encontrados no presente trabalho. A produção de lipase pela levedura *C. laurentii* L59 foi influenciada negativamente pela salinidade, as diferentes concentrações de NaCl utilizadas por Duarte (2014) atuaram como um inibidor na produção de lipase e a utilização de ASW fez com que houvesse decréscimo na atividade lipolítica, mesmo sendo a levedura de origem marinha. No presente trabalho, a salinidade apresentou efeito geral positivo, sendo no segundo e terceiro PB além de positivo, estatisticamente significativo. Esse resultado pode ser considerado importante do ponto de vista ambiental e para o tratamento de resíduos industriais ou despejos de derivados de petróleo e outras fontes de carga orgânica nos oceanos e mares.

Com relação à produção de proteases pelo fungo filamentoso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III, após a aplicação de três planejamentos do tipo PB, foi observado aumento de cerca de 6 vezes na atividade enzimática quando comparado com o valor inicial obtido na triagem quantitativa (6,21 U.mL⁻¹). Os ensaios 3 e 13 do segundo PB foram submetidos à validação, e os resultados indicaram diminuição de cerca de 50% nas atividades enzimáticas quando comparadas com as obtidas no PB. Assim como para os estudos referentes à produção de lipase, a falta de reprodutibilidade nas atividades enzimáticas devem ter ocorrido devido a diferenças nos inóculos dos experimentos. Apesar das quantidades de inóculo terem sido padronizadas, o pré-inóculo, do qual o

inóculo foi estabelecido poderia estar com viabilidade celular diferenciada. Os estudos com sistemas biológicos estão sujeitos a esse tipo de resposta, as quais muitas vezes fogem no controle do condutor dos ensaios. Desta forma, destacamos a importância dos experimentos de validação quando ensaios que fazem uso do planejamento experimental são conduzidos.

Após a avaliação dos efeitos das diferentes variáveis no processo de produção de protease pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III, destacamos: i) A concentração e a fonte de nitrogênio são de grande importância para a síntese de proteases, as fontes inorgânicas de nitrogênio como, por exemplo, NH_4NO_3 e NaNO_3 , podem prejudicar a produção da enzima, pois a absorção do N disponível é realizada de maneira mais simples, não sendo necessário à utilização da peptona, visto que o N orgânico necessita de maior consumo energético para ser clivado, mediante a ação de proteases, e absorvido pela célula (ELIBOL & OZER, 2000; ELIBOL & OZER, 2001; TSUJISAKA *et al.*, 1973); ii) A farinha de pena apresentou comportamento diferenciado nos três planejamentos, sendo no geral efeito positivo. A farinha de pena é considerada um resíduo de baixo valor pela indústria avícola e com grande disponibilidade no Brasil, contendo em sua composição cerca de 80% de proteínas. Desta forma, esse substrato pode ser considerado eficiente para a produção de protease pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III.

Assim como para as lipases, os estudos com quantificação da atividade proteolítica por micro-organismos da Antártica e realização de ensaios para melhoria da atividade são escassos na literatura. No estudo de Nascimento *et al.* (2015) realizado com o fungo *Acremonium* sp. L1-4B (isolado de amostra de líquen proveniente da Antártica) a produção de proteases foi avaliada utilizando planejamento experimental. Vários parâmetros para melhoria da atividade foram utilizados (sendo os principais: pH; temperatura e concentração de extrato de levedura) o que permitiu a produção de 447.65 U.mL^{-1} a $14 \text{ }^\circ\text{C}$. No estudo Nascimento *et al.* (2015) foi possível aplicar o modelo matemático experimental, cujo valor previsto ($445,68 \text{ U.mL}^{-1}$) estava muito próximo ao obtido nos ensaios experimentais. Em um outro estudo de produção de protease realizado por Chaud *et al.* (2016) a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L7 isolada de alga marinha da Antártica apresentou atividade enzimática em meio basal de $33,36 \text{ U.mL}^{-1}$. Após a condução do planejamento experimental, foi possível atingir o valor de $48,55 \text{ U.mL}^{-1}$ ($10 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm).

6. CONCLUSÕES

- Os métodos utilizados para o isolamento de fungos das cinco amostras de sedimentos marinhos da Antártica foram aplicados com sucesso e permitiram a obtenção de 60 fungos filamentosos e 166 leveduras. A estratégia de enriquecimento favoreceu o isolamento de leveduras.
- O sequenciamento e análise filogenética permitiram identificar oito gêneros e quatro espécies de fungos filamentosos e nove gêneros e 13 espécies de leveduras, ampliando o conhecimento sobre a diversidade de fungos e leveduras que habitam o ecossistema marinho da Antártica. A levedura endêmica da Antártica *Metschnikowia australis* foi a mais abundante e encontrada em todas as amostras de sedimentos marinhos. Alguns dos gêneros de fungos filamentosos obtidos e identificados no presente trabalho (*Toxicocladosporium*, *Pseudocercospora* e *Paraconiothyrium*) não haviam sido ainda reportados em literatura como provenientes da Antártica, sendo este o primeiro relato da presença dos mesmos em amostras da Antártica.
- Os dados derivados das análises de diversidade revelaram que as amostras apresentam riquezas semelhantes e que cada uma possui composição única. A amostra A2 coletada no Botany Point foi a mais diversa, enquanto que a amostra A5 coletada no Refúgio 2 apresentou a maior riqueza de espécies. Em adição, as amostras coletadas na mesma região geográfica (Refugio 2) apresentaram o maior compartilhamento de espécies.
- A prospecção das enzimas revelou atividade mais expressiva de lipases para a leveduras e de proteases para os fungos filamentosos. Dentre os isolados positivos para a produção das enzimas, a levedura *M. australis* 6A-1C2II e o fungo filamentoso *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III foram selecionados como os melhores produtores de lipase e protease, respectivamente.
- O planejamento experimental demonstrou ser uma ferramenta eficiente para avaliação da influência de diferentes fatores na atividade lipolítica e proteolítica. Entretanto, o aumento da atividade lipolítica de *M. australis* 6A-1C2II não foi expressivo (aproximadamente 20%), passou de 0,88 U.mL⁻¹ para 1,05 U.mL⁻¹

(atividade máxima confirmada durante a validação). Para a atividade proteolítica de *Pseudogymnoascus* sp. 4A-1C615III o aumento foi de cerca de 85%, passou de 6,21 U.mL⁻¹ para 11,47 U.mL⁻¹ (atividade máxima atingida na etapa de validação).

- Levando em conta que o ambiente antártico é propício ao desenvolvimento de micro-organismos extremófilos, os fungos isolados, preservados e identificados no presente trabalho podem ser considerados como fonte potenciais de recursos biotecnológicos. Esses isolados estão sendo mantidos na coleção de pesquisa associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) e poderão ser utilizados em estudos futuros que abordem mecanismos de sobrevivência em temperaturas baixas e ambientes oligotróficos, produção de novos compostos naturais para aplicação biotecnológica, desenvolvimento de novos processos fermentativos que utilizam menor quantidade de energia, entre outros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. M. G. C. F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiol Lett**, v. 53, p. 295–303, 2005.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**. v. 64, p.175-183, 1997.

ARENZ, B. E., HELD, B. W., JURGENS, J. A., FARRELL, R. L., BLANCHETTE, R. A.. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3057–3064, 2006.

ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 308–315, 2011.

BABJEVA, I.; RESHETOVA, I. Yeast resources in natural habitats at polar circle latitude. **Food Technology and Biotechnology**, v. 36, p. 1–5 1998.

BARRET, A. J.. Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 1-15, 1994.

BERLEMONT, R., PIPERS, D., DELSAUTE, M., ANGIONO, F., FELLER, G., GALLEN, M., POWER, P.. Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of

novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 43, n. 2, p. 94–103, 2011.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 388–394, 2007.

BIANCHI, I.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae** v. 39, n.1, p. 1–7, 2011.

BIGEY, F.; TUERY, K.; BOUGARD, D.; NICAUD, J.; MOULIN, G. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. **Yeast**, v. 20, p. 233–248, 2003.

BISHT, T.; YADAV, S. K.; DARMWAL, N. S. Computation of interactive effects and optimization of process parameters for alkaline lipase production by mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 245-252, 2013.

BLANCHETTE, R. A., HELD, B. W., ARENZ, B. E., JURGENS, J. A., BALTES, N. J., DUNCAN, S. M., FARRELL, R. L. An Antarctic hot spot for fungi at Shackleton's historic hut on Cape Royds. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 1, p. 29–38, 2010.

BLANCHETTE, R. A., HELD, B. W., JURGENS, J. A., MCNEW, D. L., HARRINGTON, T. C., SHONA, M., DUNCAN, S. M. Wood-Destroying Soft Rot Fungi in the Historic Expedition Huts of Antarctica. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1328–1335, 2004.

BOLTER, M.; BEYER, M.; STONEHOUSE, B. Geoecology of Antarctic coastal landscapes: characteristics, ecology and research. In: Beyer, L; Bölter, M. **Geoecology of Antarctic Ice-free Coastal Landscapes**, Berlin: Springer-Verlag, p. 154-194, 2002.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BONUGLI-SANTOS, R., PASSARINI, C. M. R. Z., RODRIGUES, M. V. L., DURRANT, L. R., SETTE, L. D. Avaliação do potencial biosurfactante de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos com atividade de degradação de HPAs. **Microbiologia in foco**. V. 7, p. 12-16, 2009.

BORGSTON, B.; BROCKMAN, H. L. *Lipases*. Amsterdam:Elsevier, 1984.

BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease Production During Growth and Autolysis of Submerged *Metarhizium anisopliae* Cultures. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 0001–3714, p. 107–113, 1999.

BRANDA, E., TURCHETTI, B., DIOLAIUTI, G., PECCI, M., SMIRAGLIA, C. BUZZINI, P.. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, p. 354–369, 2010.

BRIDGE, P. D.; SPOONER, B. M. Non-lichenized Antarctic fungi: Transient visitors or members of a cryptic ecosystem? **Fungal Ecology**, v. 5, n. 4, p. 381–394, 2012.

BROCKMAN, H.L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Lipases, pp. 1-46. Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

BUDZISZEWSKA, J., SZYPULA, W., WILK, M., WRZOSEK, M.. *Paraconiothyrium babiogorensis* sp nov., a new endophyte from fir club moss *Huperzia selago* (Huperziaceae). **Mycotaxon**, v. 115, p. 457–468, 2011.

BUTINAR, L.; STRMOLE, T.; GUNDE-CIMERMAN, N. Relative Incidence of Ascomycetous Yeasts in Arctic Coastal Environments. **Microbiology Ecology**, v.61, p. 832–843, 2011.

CAMARGO, O. A. de; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A.; VALADARES, J. M. A. S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do IAC**. Campinas: Instituto Agrônômico, p.49, 1986.

CARRASCO, M.; ROZAS, J. M.; BARAHONA, S.; ALCAÍNO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 251-259, 2012.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M.. Application of Microbial Lipases to Concentrate Polyunsaturated Fatty Acids. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75–80, 2003.

CASTIGLIONI, G. L. **Estudo da produção e utilização de lipase *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática do biodiesel: produção de biodiesel via enzimática**. 2009, 152 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHARNEY, J., TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171,n.2, p. 501–505, 1947.

CHATURVEDI, V., SPRINGER, D. J., BEHR, M. J., RAMANI, R., LI, X., PECK, M. K., CHATURVEDI, S.. Morphological and molecular characterizations of psychrophilic

fungus *Geomyces destructans* from New York bats with white nose syndrome (WNS). **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

CHAUD, L. ; LARIO, L. D.; BONUGLI-SANTOS, R. C. ; SETTE, L. D. ; PESSOA, A. ; FELIPE, M. G. A. . Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **New Biotechnology** (Print), v. 33, p. 807-814, 2016.

COLWELL, R. K. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Versão 9.1.0. 2013 Disponível em: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>

CONNELL, L.; REDMAN, R.; CRAIG, S.; SCORZETTI, G.; ISZARD, M.; RODRIGUEZ, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microbiology Ecology**, v. 56, p. 448-59, 2008.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N.. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863–873, 1999.

COTARLET, M.; NEGOITA, T. G.; BAHIM, G.; STOUGAARD, P.. Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. from Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 868–877, 2011.

CROUS, P. W. et al.. Fungal Planet description sheets : 154 – 213. **Persoonia**, v. 31, p. 188–296, 2013.

CROUS, P. W., BRAUN, U., SCHUBERT, K., GROENEWALD, J. Z.. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. **Studies in Mycology**, v. 58, n. 2006, p. 33–56, 2007.

CRUYWAGEN, E. M.; CROUS, P. W.; ROUX, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.. FUNGI associated with black mould on baobab trees in southern Africa. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 85–95, 2015.

D'ELIA, T.; VEERAPANENI, R.; THERAISNATHAN, V.; ROGERS, S. O.. Isolation of fungi from Lake Vostok accretion ice. **Mycologia**, v.101, p. 751–763, 2009.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S.. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 676–681, 2008.

DAYO-OWOYEMI, I., RODRIGUES, A., LANDELL, M. F., VALENTE, P., MUELLER, U. G., RAMOS, J. P., PAGNOCCA, F. C.. Intraspecific variation and

emendation of *Hannaella kunmingensis*. **Mycological Progress**, v. 12, n. 1, p. 157–165, 2013.

de GARCÍA, V.; COELHO, M. A.; MAIA, T. M.; ROSA, L. H.; VAZ, A. M.; ROSA, C. A.; SAMPAIO, J. P.; GONÇALVES, P.; VAN BROOCK, M.; LIBKIND, D.. Sex in the cold: Taxonomic reorganization of psychrotolerant yeasts in the order *Leucosporidiales*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 4, p. 1–12, 2015.

de LIMA, S. L. T.; de JESUS M. P.; de SOUSA, R. R. R.; OKAMOTO, A. K.; de LIMA, R.; FRACETO, L. F.. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. **Química Nova na Escola**, n. 28, p. 47-49, 2008.

DEL-CID, A., UBILLA, P., RAVANAL, M. C., MEDINA, E., VACA, I., LEVICÁN, G., CHÁVEZ, R.. Cold-active xylanase produced by fungi associated with Antarctic marine sponges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 524–532, 2014.

di MENNA M. E.. Three new yeast from Antarctic soils: *Candida nivalis*, *Candida gelida* and *Candida frigida* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 32, p. 25–28, 1966.

dos SANTOS, R. R. *et al.*. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol , Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 250-255, 2006.

DUARTE, A. W. F. **Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases**. São Paulo, SP. 143p. Tese de Doutorado - Instituto Butantan – Universidade de São Paulo, 2014.

DUARTE, A. W. F.; LOPES, A. M; MOLINO, J. V. D; PESSOA, A.; SETTE, L. D.. Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 215-225, 2015.

DUARTE, A.W.F. ; DAYO-OWOYEMI, I. ; NOBRE, F. S. ; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L.S.C. ; PESSOA J. R. A. ; FELIPE, M. G. A. ; SETTE, L.D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023–1035, 2013.

EDGINGTON, S., THOMPSON, E., MOORE, D., HUGHES, K. A., BRIDGE, P.. Investigating the insecticidal potential of *Geomyces* (*Myxotrichaceae: Helotiales*) and *Mortierella* (*Mortierellaceae: Mortierellales*) isolated from Antarctica. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 289, 2014.

ELIBOL, M.; OZER, D.. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2001.

ELIBOL, M.; OZER, D.. Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 219-223, 2000.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M. P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 32, n. 1, p. 27–31, 2010.

FELLER, G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. **Scientifica**, v. 2013, p. 512840, 2013.

FENICE, M., SELBMANN, L., ZUCCONI, L., ONOFRI, S. Production of extracellular enzymes by antarctic fungal strains. **Polar Biology**, v. 17, p. 275-280, 1997.

FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU., F.; VALERO, F.. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 234-237, 2006.

FURBINO, L. E.. **Diversidade e bioprospecção de fungos associados às macroalgas antárticas *Monostroma hariotti* Gain e *Porphyra endiviifolia* (A. Gepp E.S Gepp) Y.M. Chamberlain**. 2012. 64 f. Dissertação – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A.; ROMANHA, A. J.; CARVALHO, A. G.; ROSA, L. H. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 775–787, 2014.

GEORLETTE, D.; BLAISE, V.; COLLINS, T.; AMICO, S. D.; GRATIA, E.; HOYOUX, A.; MARX, J. C.; SONAN, G.; FELLER, G.; GERDAY, C. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 25–42, 2004.

GERARDO, N. M. MUELLER, U. G.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R.. Exploiting a mutualism : parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proc. R. Soc.**, v. 271, p. 1791–1798, 2004.

GERDAY, C.; AITTALEB, M.; ARPIGNY, J. L.; BAISE, E.; CHESSA, J-P., GARSOUX, G.; PETRESCU, I.; FELLER, G.. (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1342:119–131, 1997.

GERIS, R.; SANTO, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M.. Biodiesel de soja - reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1369–1373, 2007.

GILICHINSKY, D.; RIVKINA, E.; BAKERMANS, C.; SHCHERBAKOVA, V.; PETROVSKAYA, L.; OZERSKAYA, S.; IVANUSHKINA, N.; KOCHKINA, G.; LAURINAVICHUIS, K.; PECHERITSINA, S.; FATTAKHOVA, R.; TIEDJE, J. M.. Biodiversity of cryopegs in permafrost. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 117–128, 2005.

GODINHO, V. M., FURBINO, L. E., SANTIAGO, I. F., PELLIZZARI, F. M., YOKOYA, N. S., PUPO, D., ROSA, L. H.. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME journal**, v. 7, n. 7, p. 1434–51, 2013.

GOMES, E.; MARTIN, N.; PAULISTA, U. E. Enzimas termoestáveis : fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 136-145, 2007.

GOMES, N. G. M., LEFRANC, F., KIJOA, A., KISS, R. Can some marine-derived fungal metabolites become actual anticancer agents? **Marine Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3950–3991, 2015.

GONÇALVES, V. N., CAMPOS, L. S., MELO, I. S., PELLIZARI, V. H., ROSA, C. A., ROSA, L. H.. *Penicillium solitum*: A mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. **Polar Biology**, v. 36, n. 12, p. 1823–1831, 2013.

GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H.. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v.82, p.459–471, 2012.

GORDILO, M.A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFOENTE, J.; SOLA, C.. Stability studies and effect on the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 38–41, 1995.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T.. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n.1-2, p. 11-16, 2010.

GUFFOGG, S. P., THOMAS-HALL, S., HOLLOWAY, P. WATSON, K. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p. 275–277, 2004.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D.. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontol Electron** 4:9.

HUA, M. X.; CHI, Z.; LIU, G. L.; BUZDAR, M. A.. CHI, Z. M. Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. **Extremophiles**, v.14, p. 515–521, 2010.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W., STALPERS, J. A.. Dictionary of the fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford, 2008

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M.. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência Tecnologia de Alimentos (Campinas)**, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

KRISHNAN, A.; ALIAS, S.A.; WONG, C.; PANG, K.; CONVEY, P.. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 34, n. 10, p. 1535–1542, 2011.

LACHANCE, M.A. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 151–160, 1995.

LARIO, L. D; CHAUD, L. ; ALMEIDA, M. das G.; CONVERTI, A.; DURÃES, L. S.; PESSOA-JUNIOR, A. . Production, purification and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biology**, v. 119, p. 1129-1136, 2015.

LOQUE, C. P., MEDEIROS, A. O., PELLIZZARI, F. M., OLIVEIRA, E. C., ROSA, C. A., ROSA, L. H.. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 641–648, 2010.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C.. Present and future applications of lipases. **Biotechnology Genetics and Engineering Review**, vol. 3, p. 193-217, 1985.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2010). Crescimento Microbiano. In: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. Microbiologia de Brock. São Paulo: Pearson Education, Cap.6, p.127-154.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N., GUO, L. D., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A. H., HYDE, K. D.. *Pestalotiopsis* – morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Divers**, v. 50, p. 167–187, 2011.

MARGESIN, R., FONTEYNE, P. A., SCHINNER, F., SAMPAIO, J. P.. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2179–2184, 2007.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942–1947, 2008.

MCMURROUGH, I., ROSE, A. H.. Effects of temperature variation on the fatty acid composition of a psychrophilic *Candida* species. **Journal of Bacteriology**, v.114, p. 451–452, 1973.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H, BARBOSA, A. M.. Lipases microbianas: Produção , propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MÖLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H., GEIGER, H.H.. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p. 6115–6116, 1992.

MONTGOMERY, J. **Design and Analysis of Experiments** (fifth edition), Douglas Montgomery, John Wiley and Sons, 684 p. 2001.

MOURE, V. R. (2009). **Estudo da Enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na resolução de álcoois alílicos secundários**. Curitiba, PR. 126p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MOYER, C. L.; MORITA, R. Y. Psychrophiles and psychrotrophs. **Encyclopedia of Life**. Sciences Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-6, 2007.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, 308-316, 2014.

NASCIMENTO, T. C. E. S.; SENA, A. R. ; GOMES, J. E. G.; SANTOS, W. L.; MEDEIROS, E. V.; SETTE, L. D.; Pessoa, A. ; MOREIRA, K. A.. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using

cactus pear extract with response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 737-744, 2015.

ONOFRI, S., SELBMANN, L., ZUCCONI, S.P. Antarctic microfungi as models for exobiology. **Planetary and Space Science**, n.52, p. 229-237, 2004.

OZERSKAYA, S., KOCHKINA, G., IVANUSHKINA, N., GILICHINSKY, D. A.. Fungi in permafrost. In: Margesin R (ed.) Permafrost soils. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 85–95, 2009.

PALOMO, J. M. Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. **Current Bioactive Compounds**, v. 4, p. 126-138, 2008.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A.. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PATHAN, A. A. K., BHADRA, B., BEGUM., Z., SHIVAJI., S.. Diversity of Yeasts from Puddles in the Vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Arctic and Bioprospecting for Enzymes and Fatty Acids. **Current Microbiology**, v. 60, n.4, 307-314, 2010.

PIÑAR, G.; STERFLINGER, K.; PINZARI, F. Unmasking the measles-like parchment discoloration: Molecular and microanalytical approach. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 427–443, 2015.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305-325, 1946.

RAGHUKUMAR, C., DAMARE, S. R., SINGH, P.. A review on deep-sea fungi occurrence, diversity and adaptations. **Botanica Marina**, v. 53, n. 6, p. 479–492, 2010.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207–219, 2009.

RAMPELOTTO, P. H. Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. **Sustainability**, v. 2, p. 1602-1623, 2010.

RAO, M.B.; TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V.. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RASPOR, P.; ZUPAN, J. Yeast in extreme environments. In: Gábor, P.; Rosa C. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer, Berlin, pp 371-417, 2006.

RODARTE, M. P. DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F.. Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes em grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 457–464, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2^a. **Campinas**, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Editora Casa do Pão, 325 p, 2005.

ROSSI, M., BUZZINI, P., CORDISCO, L., AMARETTI, A., SALA, M., RAIMONDI, S., PONZONI, C., PAGNONI, U. M., MATTEUZZI, D.. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, n. 3, p. 363-72, 2009.

ROSSMAN, A. Y.; ALLEN, W. C.; CASTLEBURY, L. A. New combinations of plant-associated fungi resulting from the change to one name for fungi. **IMA Fungus**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2016.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, p. 1092-1101, 2001.

ROVATI, J. I.; PAJOT, H. F.; RUBERTO, L.; CORMACK, W. M.; FIGUEROA, L. I. C.. Polyphenolic substrates and dyes degradation by yeasts from 25 de Mayo / King George Island (Antarctica). **Yeast**, v. 30, p. 459–470, 2013.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 6, p. 127–141, 2007.

SAMPAIO, P.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporeidium*: *Rhodosporeidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 51, p. 687–697, 2001.

SANDOVAL-DENIS, M., SUTTON, D. A., MARTIN-VICENTE, A., CANO-LIRA, J. F., WIEDERHOLD, N., GUARRO, J., GENÉ, J.. *Cladosporium* species recovered from clinical samples in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2990–3000, 2015.

SANTIAGO, I. F.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. **Polar Biology**, 2016.

SANTOS, A. F.; VALLE, R. S.; PACHECO, C. A.; ALVAREZ, V. M.; SELDIN, L. SANTOS, A. L. S.. Extracellular proteases of *Halobacillus blutaparonsis* strain M9, a

new moderately halophilic bacterium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1299–1304, 2013.

SANTOS, W. L., NASCIMENTO, T. C. E. S., MACIEL, A. P. S., VILAR, M. C. P., MONTALVO, G. S. A., SETTE, L. D.; PESSOA JUNIOR, A., MOREIRA, K.. (2015). A rapid screening of significative variables in the production of proteases and amylases by submerged fermentation of *Geomyces pannorum* S2B. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 28º, 2015, Florianópolis-SC. Anais do 28º CBM 2015. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/cd28cbm/resumos/R1106-2.PDF>

SCORZETTI, G., PETRESCU, I., YARROW, D., FELL, J. W.. *Cryptococcus adeliensis* sp . nov ., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 153–157, 2000.

SHAN, L.; MARTI, T.; SOLLID, L. M.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for celiac sprue. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 311-318, 2004.

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, p. 2275-2279, 2002.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G. S.. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: Satyanarayana, T.; Kunze, G. (eds) Yeast biotechnology: diversity and applications. Springer Science, Berlin, p. 3-18, 2009.

SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-Adpated Enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v.75, p.403- 433, 2006.

SILVA, A. C. S.. (2011). **Estudo cinético da transesterificação de triacilgliceróis utilizando catálise enzimática**. Curitiba, PR. 75p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal do Paraná.

SILVA, F.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; TEIXEIRA, N.. Polipeptídeos e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e métodos analíticos utilizados no seu estudo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1326-1331, 2006.

SILVA, R. R., DE FREITAS CABRAL, T. P., RODRIGUES, A., CABRAL, H.. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 235–243, 2013.

SINGH, J.; DUBEY, A. K.; SINGH, R. P. Antarctic terrestrial ecosystem and role of pigments in enhanced UV-B radiations. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 63–77, 2011.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N.. *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 207–216, 2006.

SOUZA, P. M. *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

THOMAS-HALL, S. R. (2004). **Physiological and biochemical characterisation of Antarctic yeast**. PhD thesis, University of New England, Armidale, Australia.

THOMAS-HALL, S. R., TURCHETTI, B., BUZZINI, P., BRANDA, E., BOEKHOUT, T., THEELEN, B., WATSON, K.. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. **Extremophiles**, v. 14, n. 1, p. 47–59, 2009.

TOJU, H.; TANABE, A. S.; YAMAMOTO, S.; SATO, H.. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. **Plos One**, v. 7, n. 7, 2012.

TRONCOSO, E., BARAHONA, S., CARRASCO, M., VILLARREAL, P., ALCAÍNO, J., CIFUENTES, V., BAEZA, M.. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, 2016.

TSUJI, M., GOSHIMA, T., MATSUSHIKA, A., KUDOH, S., HOSHINO, T.. Direct ethanol fermentation from lignocellulosic biomass by Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* under a low temperature condition. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 241–243, 2013.

TSUJI, M.; KUDOH, S.; HOSHINO, T. Draft Genome Sequence of Cryophilic Basidiomycetous Yeast *Mrakia blollopis* SK-4, Isolated from an Algal Mat of Naga-ike Lake in the Skarvsnes Ice-Free Area, East. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. 10–11, 2015.

TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKAMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, p. 837–842, 1973.

TURCHETTI, B., BUZZINI P., GORETTI, M., BRANDA, E., DIOLAIUTI, G., D'AGATA, C., SMIRAGLIA, C., VAUGHAN-MARTINI, A.. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, p. 73–83, 2007.

TURCHETTI, B.; THOMAS-HALL, S. R.; CONNELL, L. B.; BRANDA, E.; BUZZINI, P.; THEELEN, B.; MÜLLER, W. H.; BOEKHOUT, T.. Psychrophilic yeasts from Antarctica and European glaciers: Description of *Glaciozyma* gen. nov., *Glaciozyma martinii* sp. nov. and *Glaciozyma watsonii* sp. nov. **Extremophiles**, v. 15, n. 5, p. 573–586, 2011.

UETAKE, J.; YOSHIMURA, Y.; NAGATSUKA N.; KANDA, H.. Isolation of oligotrophic yeasts from supraglacial environments of different altitude on the Gulkana Glacier (Alaska). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, p. 279–286, 2012.

VACA, I.; FAUNDEZ, C.; MAZA, F.; PAILLAVIL, B.; HERNANDEZ, V.; ACOSTA, F.; LEVICAN, G.; MARTINEZ, C.; CHAVEZ, R.. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 183–189, 2013.

VAKHLU, J.; KOUR, A.. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69–85, 2006.

VAZ, A. B. M., ROSA, L. H., VIEIRA, M. L. A., DE GARCIA, V., BRANDÃO, L. R., TEIXEIRA, L. C. R. S., ROSA, C. A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 937–947, 2011.

VAZQUEZ, S. C.; HERNANDEZ, E.; MAC CORMACK, W. P.. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 63-71, 2008.

VERKLEY, G. J. M., da SILVA, M., WICKLOW, D. T., CROUS, P. W.. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2, p. 323–335, 2004.

WANG, Q. M., YURKOV, A. M., GÖKER, M., LUMBSCH, H. T., LEAVITT, S. D., GROENEWALD, M., BAI, F. Y.. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina*. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 149–189, 2015.

WUCZKOWSKI, M., PASSOTH, V., TURCHETTI, B., ANDERSSON, A. C., OLSTORPE, M., LAITILA, A., LIBKIND, D.. Description of *Holtermanniella* gen. nov., including *Holtermanniella takashimae* sp. nov. and four new combinations, and proposal of the order Holtermanniales to accommodate tremellomycetous yeasts of the Holtermannia clade. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 680–689, 2011.

YANG, J., KOGA, Y., NAKANO, H., YAMANE, T.. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro

combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein engineering**, v. 15, n. 2, p. 147–152, 2002.

YANG, X. L., ZHANG, J. Z., LUO, D. Q.. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 622, 2012.

YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 2223–2235, 2008.

ZHANG, E., TANAKA, T., TAJIMA, M., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A., SUGITA, T.. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 9, p. 625–632, 2011.

ANEXO I – Variáveis independentes do primeiro PB para otimização de lipase e seus respectivos valores

Planejamento Experimental para Lipase (PB1)				
		-1	0	1
1	Peptona	0	0,10%	0,20%
2	Azeite de Oliva	0	1,00%	2,00%
3	Glicose	0	0,20%	0,40%
4	Tween 80	0	1,00%	2,00%
5	Inóculo	0,6	0,7	0,8
6	Ext. Levedura	0	0,20%	0,40%
7	Nitrato de Sódio	0	0,10%	0,20%
8	Ureia	0	0,10%	0,20%
9	Glicerol	0	1,00%	2,00%
10	ASW	0	50,00%	100,00%
11	pH	6	7	8

ANEXO II - Matriz do primeiro planejamento *Plackett-Burman* com 16 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de lipase (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Peptona	Azeite de Oliva	Glicose	Tween 80	Inóculo	Extrato de Levedura	Nitrato de Sódio	Ureia	Glicerol	ASW	pH
1	0,20%	0	0	0	0,8	0	0	0,20%	2%	0	8
2	0,20%	2%	0	0	0,6	0,40%	0	0	2%	100%	6
3	0,20%	2%	0,40%	0	0,6	0	0,20%	0	0	100%	8
4	0,20%	2%	0,40%	2%	0,6	0	0	0,20%	0	0	8
5	0	2%	0,40%	2%	0,8	0	0	0	2%	0	6
6	0,20%	0	0,40%	2%	0,8	0,40%	0	0	0	100%	6
7	0	2%	0	2%	0,8	0,40%	0,20%	0	0	0	8
8	0,20%	0	0,40%	0	0,8	0,40%	0,20%	0,20%	0	0	6
9	0,20%	2%	0	2%	0,6	0,40%	0,20%	0,20%	2%	0	6
10	0	2%	0,40%	0	0,8	0	0,20%	0,20%	2%	100%	6
11	0	0	0,40%	2%	0,6	0,40%	0	0,20%	2%	100%	8
12	0,20%	0	0	2%	0,8	0	0,20%	0	2%	100%	8
13	0	2%	0	0	0,8	0,40%	0	0,20%	0	100%	8
14	0	0	0,40%	0	0,6	0,40%	0,20%	0	2%	0	8
15	0	0	0	2%	0,6	0	0,20%	0,20%	0	100%	6
16	0	0	0	0	0,6	0	0	0	0	0	6
17	0,10%	1%	0,20%	1%	0,7	0,20%	0,10%	0,10%	1%	50%	7
18	0,10%	1%	0,20%	1%	0,7	0,20%	0,10%	0,10%	1%	50%	7
19	0,10%	1%	0,20%	1%	0,7	0,20%	0,10%	0,10%	1%	50%	7
20	0,10%	1%	0,20%	1%	0,7	0,20%	0,10%	0,10%	1%	50%	7

ANEXO III - Variáveis independentes do segundo PB para otimização de lipase e seus respectivos valores

Planejamento Experimental para Lipase (PB2)				
		-1	0	1
1	Peptona	0,10%	0,20%	0,30%
2	Azeite de Oliva	1%	2%	3%
3	Tween 80	1%	2%	3%
4	Inóculo	0,6	0,7	0,8
5	Ext. Levedura	0,2%	0,4%	0,6%
6	Nitrato de Sódio	0,1%	0,2%	0,3%
7	Ureia	0,1%	0,2%	0,3%
8	Glicerol	0	1%	2%
9	ASW	0	50%	100%
10	pH	6	7	8

ANEXO IV - Matriz do segundo planejamento *Plackett-Burman* com 16 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de lipase (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Peptona	Azeite de Oliva	Tween 80	Inóculo	Extrato de Levedura	Nitrato de Sódio	Uréia	Glicerol	ASW	pH
1	0,30%	1,00%	1,00%	0,6	0,60%	0,10%	0,10%	2,0%	100%	6
2	0,30%	3,00%	1,00%	0,6	0,20%	0,30%	0,10%	0	100%	8
3	0,30%	3,00%	3,00%	0,6	0,20%	0,10%	0,30%	0	0%	8
4	0,30%	3,00%	3,00%	0,8	0,20%	0,10%	0,10%	2,0%	0%	6
5	0,10%	3,00%	3,00%	0,8	0,60%	0,10%	0,10%	0	100%	6
6	0,30%	1,00%	3,00%	0,8	0,60%	0,30%	0,10%	0	0%	8
7	0,10%	3,00%	1,00%	0,8	0,60%	0,30%	0,30%	0	0%	6
8	0,30%	1,00%	3,00%	0,6	0,60%	0,30%	0,30%	2,0%	0%	6
9	0,30%	3,00%	1,00%	0,8	0,20%	0,30%	0,30%	2,0%	100%	6
10	0,10%	3,00%	3,00%	0,6	0,60%	0,10%	0,30%	2,0%	100%	8
11	0,10%	1,00%	3,00%	0,8	0,20%	0,30%	0,10%	2,0%	100%	8
12	0,30%	1,00%	1,00%	0,8	0,60%	0,10%	0,30%	0	100%	8
13	0,10%	3,00%	1,00%	0,6	0,60%	0,30%	0,10%	2,0%	0%	8
14	0,10%	1,00%	3,00%	0,6	0,20%	0,30%	0,30%	0	100%	6
15	0,10%	1,00%	1,00%	0,8	0,20%	0,10%	0,30%	2,0%	0%	8
16	0,10%	1,00%	1,00%	0,6	0,20%	0,10%	0,10%	0	0%	6
17	0,20%	2,00%	2,00%	0,7	0,40%	0,20%	0,20%	1,00%	50%	7
18	0,20%	2,00%	2,00%	0,7	0,40%	0,20%	0,20%	1,00%	50%	7
19	0,20%	2,00%	2,00%	0,7	0,40%	0,20%	0,20%	1,00%	50%	7
20	0,20%	2,00%	2,00%	0,7	0,40%	0,20%	0,20%	1,00%	50%	7

ANEXO V - Variáveis independentes do terceiro PB para otimização de lipase e seus respectivos valores

Planejamento Experimental para Lipase (PB3)				
		-1	0	1
1	Tween 80	3%	4%	5%
2	Nitrato de Sódio	0	0,15%	0,3%
3	Ureia	0,3%	0,5%	0,7%
4	Glicerol	0	2%	4%
5	pH	6,00	7,00	8,00

ANEXO VI - Matriz do terceiro planejamento *Plackett-Burman* com 12 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de lipase (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Tween 80	NaNO₃	Ureia	Glicerol	pH	Inóculo	ASW
1	5,0%	0	0,70%	0	6	0,8	100%
2	5,0%	0,30%	0,30%	4%	6	0,8	100%
3	3,0%	0,30%	0,70%	0	8	0,8	100%
4	5,0%	0	0,70%	4%	6	0,8	100%
5	5,0%	0,30%	0,30%	4%	8	0,8	100%
6	5,0%	0,30%	0,70%	0	8	0,8	100%
7	3,0%	0,30%	0,70%	4%	6	0,8	100%
8	3,0%	0	0,70%	4%	8	0,8	100%
9	3,0%	0	0,30%	4%	8	0,8	100%
10	5,0%	0	0,30%	0	8	0,8	100%
11	3,0%	0,30%	0,30%	0	6	0,8	100%
12	3,0%	0	0,30%	0	6	0,8	100%
13C	4,0%	0,15%	0,50%	2,00%	7,00	0,8	100%
14C	4,0%	0,15%	0,50%	2,00%	7,00	0,8	100%
15C	4,0%	0,15%	0,50%	2,00%	7,00	0,8	100%
16C	4,0%	0,15%	0,50%	2,00%	7,00	0,8	100%

ANEXO VII - Variáveis independentes do quarto PB para otimização de lipase e seus respectivos valores

Planejamento Experimental para Lipase PB4				
		-1	0	1
1	Peptona	0	1%	2%
2	Ext. Levedura	0	1%	2%
3	Na ₂ CO ₃	0	0,5%	1%
4	Inóculo	0,6	0,7	0,8
5	KH ₂ PO ₄	0	0,5%	1%
6	Azeite de Oliva	1%	2%	3%
7	Glicerol	0	1%	2%
8	Tween 80 0	0	0,5%	1%
9	ASW	0	50%	100%
10	pH	5	6	7

ANEXO VIII - Matriz do quarto planejamento *Plackett-Burman* com 16 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de lipase (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Peptona	Ext. Levedura	Na ₂ CO ₃	Inóculo	KH ₂ PO ₄	Azeite de Oliva	Glicerol	Tween 80	ASW	pH
1	2,0%	0%	0%	0,6	1,0%	1%	0%	1,0%	100%	5
2	2,0%	2,0%	0%	0,6	0%	3%	0%	0%	100%	7
3	2,0%	2,0%	1,0%	0,6	0%	1%	2%	0%	0%	7
4	2,0%	2,0%	1,0%	0,8	0%	1%	0%	1,0%	0%	5
5	0,0%	2,0%	1,0%	0,8	1,0%	1%	0%	0%	100%	5
6	2,0%	0%	1,0%	0,8	1,0%	3%	0%	0%	0%	7
7	0,0%	2,0%	0%	0,8	1,0%	3%	2%	0%	0%	5
8	2,0%	0%	1,0%	0,6	1,0%	3%	2%	1,0%	0%	5
9	2,0%	2,0%	0%	0,8	0%	3%	2%	1,0%	100%	5
10	0,0%	2,0%	1,0%	0,6	1,0%	1%	2%	1,0%	100%	7
11	0,0%	0%	1,0%	0,8	0%	3%	0%	1,0%	100%	7
12	2,0%	0%	0%	0,8	1,0%	1%	2%	0%	100%	7
13	0,0%	2,0%	0%	0,6	1,0%	3%	0%	1,0%	0%	7
14	0,0%	0%	1,0%	0,6	0%	3%	2%	0%	100%	5
15	0,0%	0%	0%	0,8	0%	1%	2%	1,0%	0%	7
16	0,0%	0%	0%	0,6	0%	1%	0%	0%	0%	5
17 (C)	1,0%	1,0%	0,50%	0,7	0,50%	2%	1,0%	0,50%	50%	6
18 (C)	1,0%	1,0%	0,50%	0,7	0,50%	2%	1,0%	0,50%	50%	6
19 (C)	1,0%	1,0%	0,50%	0,7	0,50%	2%	1,0%	0,50%	50%	6
20 (C)	1,0%	1,0%	0,50%	0,7	0,50%	2%	1,0%	0,50%	50%	6

ANEXO IX - Variáveis independentes do primeiro PB para otimização de protease e seus respectivos valores

Planejamento Experimental para Protease (PB1)				
		-1	0	1
1	Peptona	0	0,10%	0,20%
2	Caseína	0	0,20%	0,40%
3	Glicose	0	0,20%	0,40%
4	Malte	0	0,20%	0,40%
5	Nº Cilindoro Inóculo	2	3	4
6	Ext. Levedura	0	0,20%	0,40%
7	Amido	0	0,20%	0,40%
8	Skim Milk	0	0,20%	0,40%
9	Farinha Pena	0	0,50%	1%
10	Farinha Arroz	0	0,50%	1%
11	Nitrato de Sódio	0	0,10%	0,20%
12	ASW	0	50,00%	100%
13	pH	4	5	6

ANEXO X- Matriz do primeiro planejamento *Plackett-Burman* com 20 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de protease (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Peptona	Caseína	Glicose	Malte	Inóculo	Extrato de Levedura	Amido	Skim milk	Farinha de Pena	Farinha de arroz	NaNO ₃	ASW	pH
1	0,20%	0	0,40%	0,40%	2	0	0	0	1,00%	0	0,20%	0	6
2	0,20%	0,40%	0	0,40%	4	0	0	0	0	1,00%	0	100%	4
3	0	0,40%	0,40%	0	4	0,40%	0	0	0	0	0,20%	0	6
4	0	0	0,40%	0,40%	2	0,40%	0,40%	0	0	0	0	100%	4
5	0,20%	0	0	0,40%	4	0	0,40%	0,40%	0	0	0	0	6
6	0,20%	0,40%	0	0	4	0,40%	0	0,40%	1,00%	0	0	0	4
7	0,20%	0,40%	0,40%	0	2	0,40%	0,40%	0	1,00%	1,00%	0	0	4
8	0,20%	0,40%	0,40%	0,40%	2	0	0,40%	0,40%	0	1,00%	0,20%	0	4
9	0	0,40%	0,40%	0,40%	4	0	0	0,40%	1,00%	0	0,20%	100%	4
10	0,20%	0	0,40%	0,40%	4	0,40%	0	0	1,00%	1,00%	0	100%	6
11	0	0,40%	0	0,40%	4	0,40%	0,40%	0	0	1,00%	0,20%	0	6
12	0,20%	0	0,40%	0	4	0,40%	0,40%	0,40%	0	0	0,20%	100%	4
13	0	0,40%	0	0,40%	2	0,40%	0,40%	0,40%	1,00%	0	0	100%	6
14	0	0	0,40%	0	4	0	0,40%	0,40%	1,00%	1,00%	0	0	6
15	0	0	0	0,40%	2	0,40%	0	0,40%	1,00%	1,00%	0,20%	0	4
16	0	0	0	0	4	0	0,40%	0	1,00%	1,00%	0,20%	100%	4
17	0,20%	0	0	0	2	0,40%	0	0,40%	0	1,00%	0,20%	100%	6
18	0,20%	0,40%	0	0	2	0	0,40%	0	1,00%	0	0,20%	100%	6
19	0	0,40%	0,40%	0	2	0	0	0,40%	0	1,00%	0	100%	6
20	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,00%	0%	4
21	0,10%	0,20%	0,20%	0,20%	3	0,20%	0,20%	0,20%	0,50%	0,50%	0,10%	50%	5
22	0,10%	0,20%	0,20%	0,20%	3	0,20%	0,20%	0,20%	0,50%	0,50%	0,10%	50%	5
23	0,10%	0,20%	0,20%	0,20%	3	0,20%	0,20%	0,20%	0,50%	0,50%	0,10%	50%	5
24	0,10%	0,20%	0,20%	0,20%	3	0,20%	0,20%	0,20%	0,50%	0,50%	0,10%	50%	5

ANEXO XI- Variáveis independentes do segundo PB para otimização de protease e seus respectivos valores

Planejamento Experimental para Protease (PB2)				
		-1	0	1
1	Peptona	0,1%	0,2%	0,3%
2	Glicose	0,2%	0,4%	0,6%
3	Malte	0,2%	0,4%	0,6%
4	Nº Cilindro Inóculo	4	5	6
5	Ext. Levedura	0,2%	0,4%	0,6%
6	Farinha Pena	0	0,1%	0,2%
7	Farinha Arroz	0	0,1%	0,2%
8	Ureia	0	0,1%	0,2%

Fixado: salinidade 100% e pH 6

ANEXO XII - Matriz do segundo planejamento *Plackett-Burman* com 16 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de protease (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Peptona	Glicose	Malte	Nº Cilindro	Ext. Levedura	Farinha Pena	Farinha Arroz	Ureia	ASW	pH
1	0,30%	0,20%	0,20%	4	0,60%	0	0	0,20%	100%	6
2	0,30%	0,60%	0,20%	4	0,20%	0,20%	0	0	100%	6
3	0,30%	0,60%	0,60%	4	0,20%	0	0,20%	0	100%	6
4	0,30%	0,60%	0,60%	6	0,20%	0	0	0,20%	100%	6
5	0,10%	0,60%	0,60%	6	0,60%	0	0	0	100%	6
6	0,30%	0,20%	0,60%	6	0,60%	0,20%	0	0	100%	6
7	0,10%	0,60%	0,20%	6	0,60%	0,20%	0,20%	0	100%	6
8	0,30%	0,20%	0,60%	4	0,60%	0,20%	0,20%	0,20%	100%	6
9	0,30%	0,60%	0,20%	6	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	100%	6
10	0,10%	0,60%	0,60%	4	0,60%	0	0,20%	0,20%	100%	6
11	0,10%	0,20%	0,60%	6	0,20%	0,20%	0	0,20%	100%	6
12	0,30%	0,20%	0,20%	6	0,60%	0	0,20%	0	100%	6
13	0,10%	0,60%	0,20%	4	0,60%	0,20%	0	0,20%	100%	6
14	0,10%	0,20%	0,60%	4	0,20%	0,20%	0,20%	0	100%	6
15	0,10%	0,20%	0,20%	6	0,20%	0	0,20%	0,20%	100%	6
16	0,10%	0,20%	0,20%	4	0,20%	0	0	0	100%	6
17 (C)	0,20%	0,40%	0,40%	5	0,40%	0,10%	0,10%	0,10%	100%	6
18 (C)	0,20%	0,40%	0,40%	5	0,40%	0,10%	0,10%	0,10%	100%	6
19 (C)	0,20%	0,40%	0,40%	5	0,40%	0,10%	0,10%	0,10%	100%	6
20 (C)	0,20%	0,40%	0,40%	5	0,40%	0,10%	0,10%	0,10%	100%	6

ANEXO XIII - Variáveis independentes do terceiro PB para otimização de protease e seus respectivos valores

PB3- Planejamento Experimental para Protease				
		-1	0	1
1	Glicose	0	0,3%	0,6%
2	Nº Cilindro Inóculo	6	7	8
3	Ext. levedura	0,6%	0,8%	1%
4	Farinha Pena	0	1%	2%
5	Ureia	0	0,1%	0,2%

Fixado: salinidade 100%, pH 6, peptona 0,10% e malte 0,20%

ANEXO XIV - Matriz do terceiro planejamento *Plackett-Burman* com 12 ensaios e quatro pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis na produção de protease (7 dias, incubação a 20 °C e 150 rpm).

	Glicose	Nº Cilindro	Ext. Levedura	Farinha Pena	Ureia	Peptona	Malte	ASW	pH
1	0,60%	6	1,0%	0	0	0,10%	0,20%	100%	6
2	0,60%	8	0,6%	2,00%	0	0,10%	0,20%	100%	6
3	0	8	1,0%	0	0,20%	0,10%	0,20%	100%	6
4	0,60%	6	1,0%	2,00%	0	0,10%	0,20%	100%	6
5	0,60%	8	0,6%	2,00%	0,20%	0,10%	0,20%	100%	6
6	0,60%	8	1,0%	0	0,20%	0,10%	0,20%	100%	6
7	0	8	1,0%	2,00%	0	0,10%	0,20%	100%	6
8	0	6	1,0%	2,00%	0,20%	0,10%	0,20%	100%	6
9	0	6	0,6%	2,00%	0,20%	0,10%	0,20%	100%	6
10	0,60%	6	0,6%	0	0,20%	0,10%	0,20%	100%	6
11	0	8	0,6%	0	0	0,10%	0,20%	100%	6
12	0	6	0,6%	0	0	0,10%	0,20%	100%	6
13C	0,30%	7	0,8%	1,00%	0,10%	0,10%	0,20%	100%	6
14C	0,30%	7	0,8%	1,00%	0,10%	0,10%	0,20%	100%	6
15C	0,30%	7	0,8%	1,00%	0,10%	0,10%	0,20%	100%	6
16C	0,30%	7	0,8%	1,00%	0,10%	0,10%	0,20%	100%	6

ANEXO XV - Sequenciamento de leveduras e dados do *Blast* (GenBank)

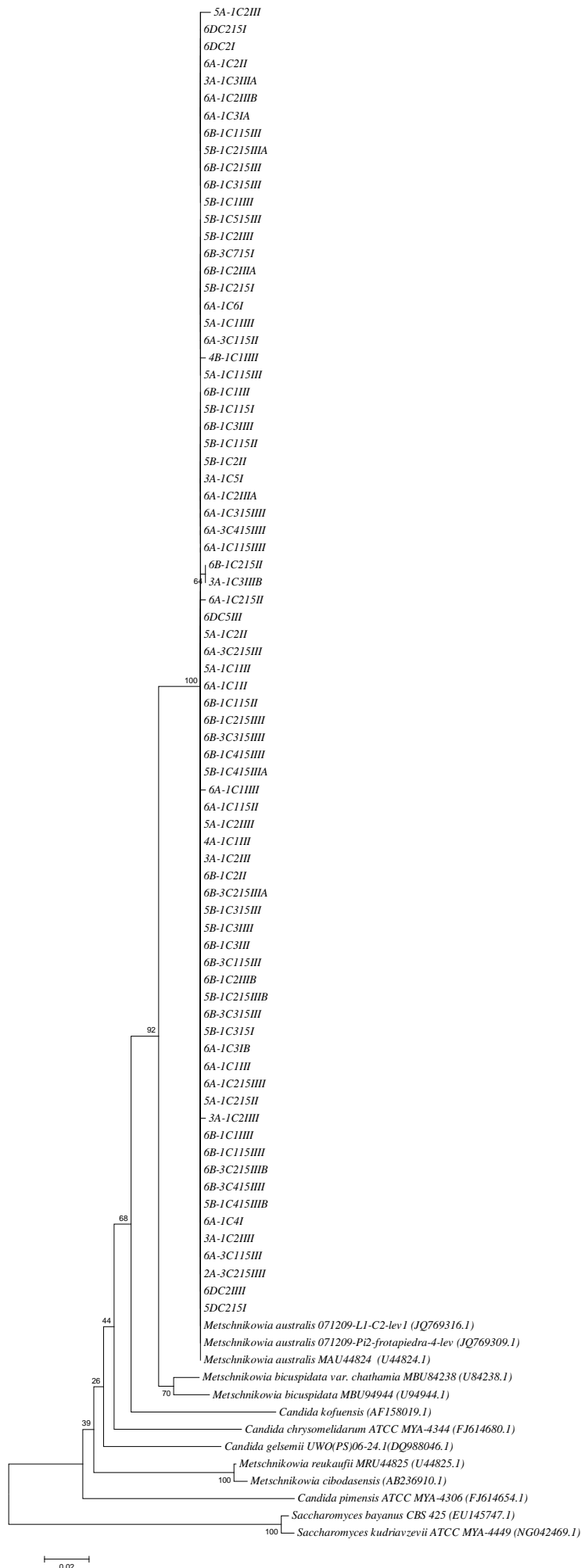
Código Identificação	Nº Genbank	Parentes mais próximos	Similaridade (%)
Primeiro Isolamento			
6A-1C2I	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
6A-1C215I	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
4B-1C515I	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
4B-1C415II	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	97
4A-1C215III	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	100
2A-3C115III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
2A-1C215IIIA	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	99
2A-1C115III	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	97
3A-1C2IIIA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
5A-1C215II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
4A-3C315IIII	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	99
6A-1C215II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
2A-1C315IIII	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	99
6A-1C115II	JQ769316.1	<i>Metschnikowia australis</i> strain 071209-L1-C2-lev1	100
2A-3C215IIII	JQ769316.1	<i>Metschnikowia australis</i> strain 071209-L1-C2-lev1	100
6A-3C315IIII	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
3A-1C715IA	KT970749.1	<i>Glaciozyma martinii</i> voucher F.GSKG	99
5A-1C1II	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
6A-1C115IIII	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
2A-1C1IIII	AF189906.1	<i>Glaciozyma antarctica</i> strain CBS 5942	99
6A-1C215IIII	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	100
6A-1C315I	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	98
5A-3C515IIII	AF189937.1	<i>Cystobasidium laryngis</i> strain CBS 2221	99
4A-3C115II	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	100
5A-1C3II	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
6A-1C2IIII	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
5A-3C315III	AF189937.1	<i>Cystobasidium laryngis</i> strain CBS 2221	99
2A-1C315III	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	99
4A-1C215IIII	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	99
4A-1C215II	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	99
6A-3C115III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	100
2A-1C215IIIB	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	99
6A-3C415IIII	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	100
5A-1C2II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
6A-1C2II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
5A-1C115III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
6A-1C3IIIA	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	98
4A-3C115IIIA	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	99
4A-3C115IIIB	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	100
4A-1C515IIII	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	99
6A-1C3IIIB	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	99
6A-3C215IIII	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	99

4A-1C315III	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	99
6A-3C115II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5A-3C515IIIA	AF189937.1	<i>Cystobasidium laryngis</i> strain CBS 2221	99
5A-3C115I	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
6A-1C1IIII	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5A-1C2IIIA	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
5A-1C2IIIB	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
5A-1C1IIII	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
6A-3C215III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5A-1C215I	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
2A-1C415IIII	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	98
3A-1C3IIIA	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
3A-1C3IIIB	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6A-1C315IIII	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
2A-1C215IIII	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	99
4A-3C215IIII	NG_042640.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> NRRL Y-2075	99
6A-3C515IIII	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	98
6A-1C2IIIA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5A-3C415III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
4A-1C1III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6A-1C1III	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
3A-1C2IIIB	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5A-1C1III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6A-1C2IIIB	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
4A-1C915III	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	100
6A-1C1IIIA	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	99
6A-1C4I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6A-1C3IA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
4A-1C415IIII	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	100
5A-1C115I	AF137600.1	<i>Cryptococcus gastricus</i> CBS 2288	98
3A-1C2IIIC	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
3A-1C715IB	AY040646.1	<i>Glaciozyma martinii</i> strain CBS 8929	99
6A-1C6I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5A-1C2III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6A-1C3IB	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6A-1C1IIB	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	100
6A-1C1IIC	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
3A-1C5I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C415IIIA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C315I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
4B-1C215I	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
5B-3C215III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
6B-3C415III	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
5B-3C2IIII	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
6B-1C2IIA	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
3B-1C215IIII	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
5B-1C215I	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100

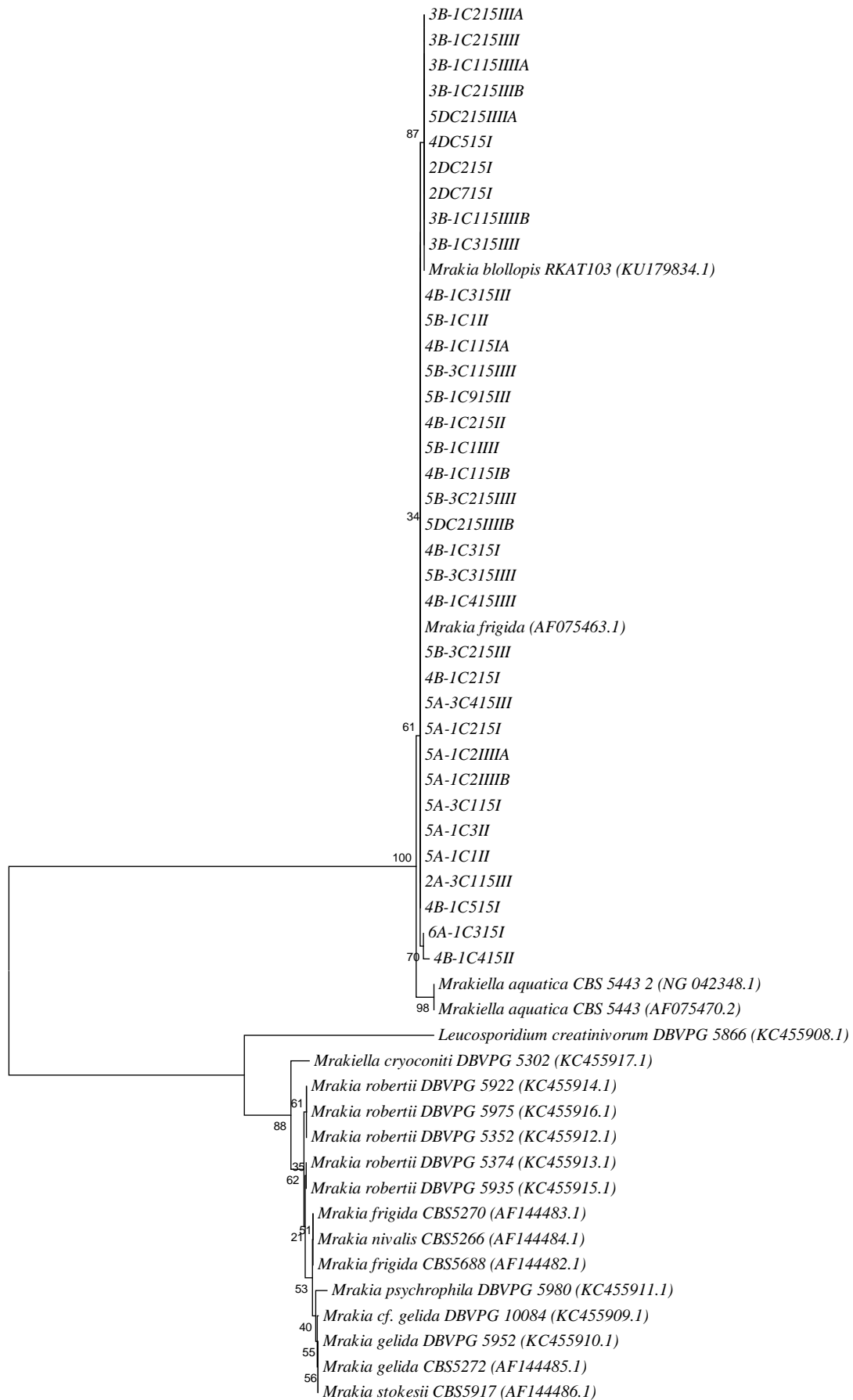
6B-1C115III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C115II	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
5B-1C2II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
4B-1C315III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
6B-3C315IIIA	AF070433.1	<i>Rhodotorula muscorum</i> CBS 6921	99
6B-3C415III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C2III	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	100
6B-3C315III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C2IIIA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C1II	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
4B-1C1III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C215IIIA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C215IIIA	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C115II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
4B-1C115IA	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
6B-3C215IIIA	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
5B-1C215IIB	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C915III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
5B-3C115III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
4B-1C215II	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
3B-1C215IIIA	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
5B-1C315III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
2B-1C3III	HF934009.1	<i>Glaciozyma litoralis</i> PYCC:6252T	100
5B-1C1IIIA	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
4B-1C115IB	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
6B-3C715I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-3C215III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
3B-1C115IIIA	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
6B-1C215IIB	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-3C315IIIB	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
6B-1C3III	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
6B-1C115III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C2IIB	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
5B-1C3III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
3B-1C215IIB	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
6B-1C215II	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
2B-1C1III	HF934009.1	<i>Glaciozyma litoralis</i> PYCC:6252T	100
5B-1C2III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
4B-1C315I	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
3B-1C115IIIB	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
3B-1C315III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
6B-1C315III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C415III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-1C115I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
6B-1C1III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher I.AURO	99
5B-3C315III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	100
6B-3C115III	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100

6B-1C3III	U44824.1	<i>Metschnikowia australis</i> NRRL Y-7014	100
6B-3C115III	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	99
5B-1C515III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
5B-1C1III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
5B-1C415III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
6B-1C1III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
4B-1C415III	NG_042346.1	<i>Mrakia frigida</i> CBS 5270	99
6B-3C215III	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
6B-1C2IIB	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	100
6B-1C2IIC	KT970773.1	<i>Holtermanniella wattica</i> voucher 17.L11	100
Segundo Isolamento			
6DC115III	EU348786.1	<i>Meyerozyma caribbica</i> NRRL Y-27274	100
6DC5III	JQ769316.1	<i>Metschnikowia australis</i> strain 071209-L1-C2-lev1	99
6DC3I	KT970749.1	<i>Glaciozyma martinii</i> voucher F.GSKG	100
6DC2I	JQ769316.1	<i>Metschnikowia australis</i> strain 071209-L1-C2-lev1	99
6DC2III	KT970750.1	<i>Glaciozyma litoralis</i> voucher F.DMRO	99
6DC3III	KT970750.1	<i>Glaciozyma litoralis</i> voucher F.DMRO	100
6DC1III	KT970750.1	<i>Glaciozyma litoralis</i> voucher F.DMRO	100
6DC2III	JQ769316.1	<i>Metschnikowia australis</i> strain 071209-L1-C2-lev1	100
6D-3C115III	JQ857008.1	<i>Phenoliferia glacialis</i> isolate T8Rg	100
6DC115IIIA	KT970750.1	<i>Glaciozyma litoralis</i> voucher F.DMRO	100
5DC215IIIA	AB909045.1	<i>Mrakia blollopis</i> isolate:EBU1-2	99
6DC215I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
5DC215IIIB	AB909045.1	<i>Mrakia blollopis</i> isolate:EBU1-2	99
5DC215I	KT970742.1	<i>Metschnikowia australis</i> voucher 1.AURO	99
5D-3C115III	KT970749.1	<i>Glaciozyma martinii</i> voucher F.GSKG	100
4DC515I	AY038812.1	<i>Mrakia</i> sp. CBS 8909 (<i>Mrakia blollopis</i>)	98
2DC215I	AY038812.1	<i>Mrakia</i> sp. CBS 8909 (<i>Mrakia blollopis</i>)	99
6DC115IIIB	KT970749.1	<i>Glaciozyma martinii</i> voucher F.GSKG	100
2DC715I	AY038812.1	<i>Mrakia</i> sp. CBS 8909 (<i>Mrakia blollopis</i>)	98
6DC1III	KT970749.1	<i>Glaciozyma martinii</i> voucher F.GSKG	99

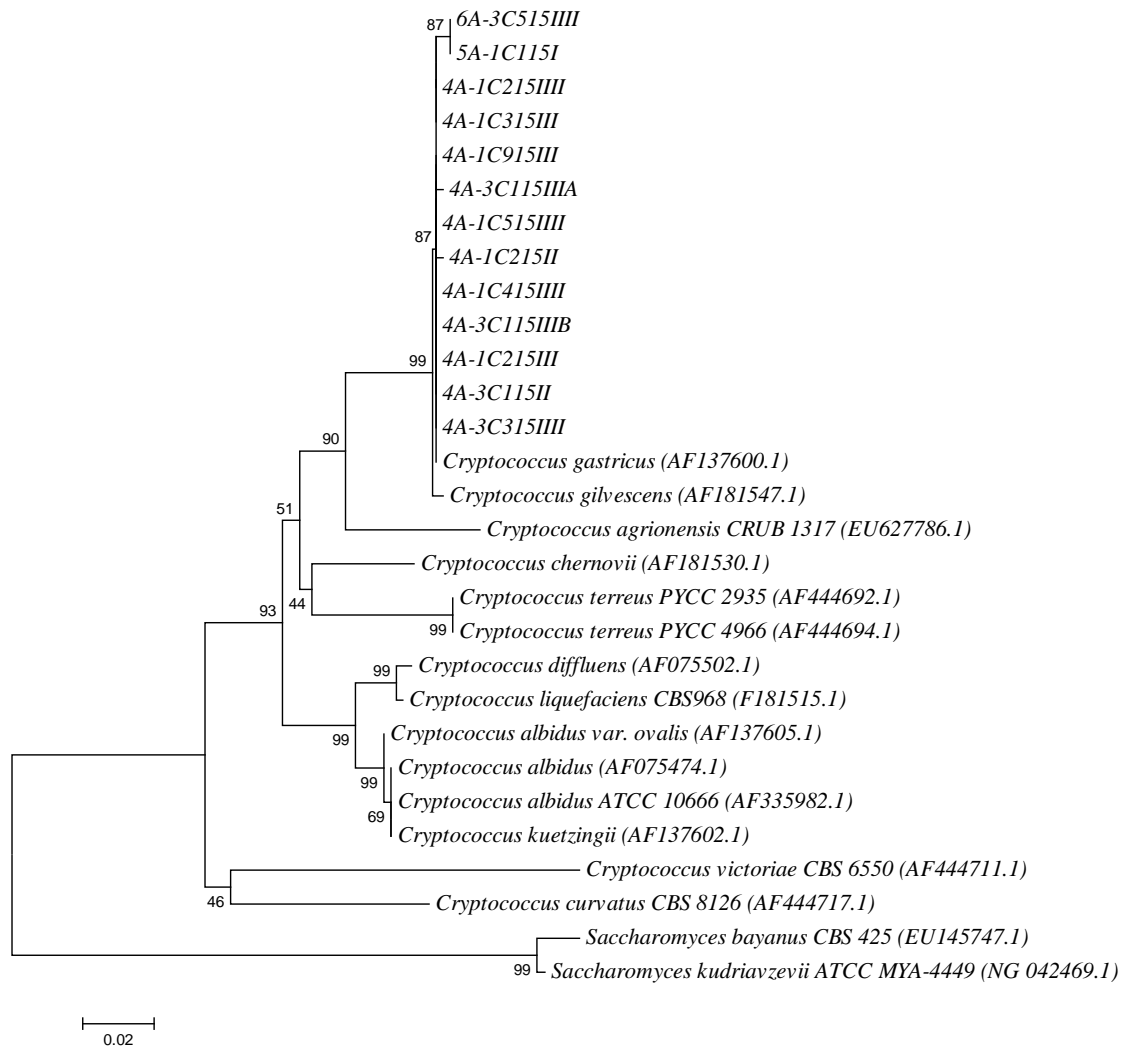
ANEXO XVI – Árvore Filogenética *Metschnikowia*



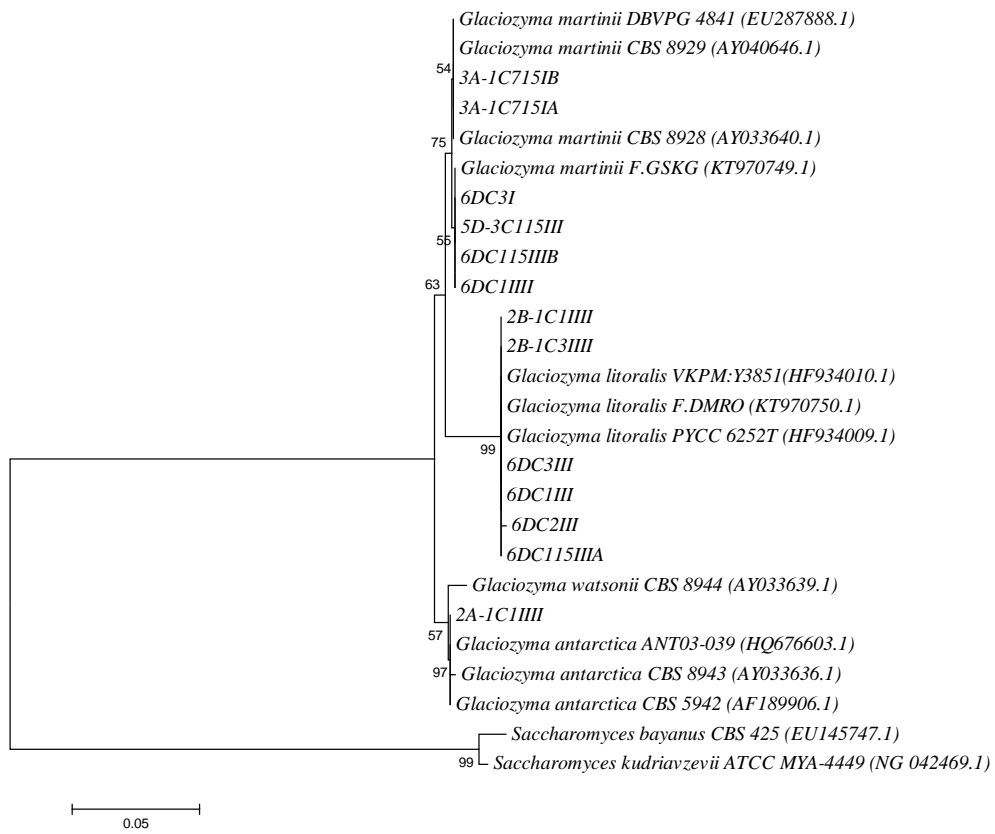
ANEXO XVII – Árvore Filogenética *Mrakia*



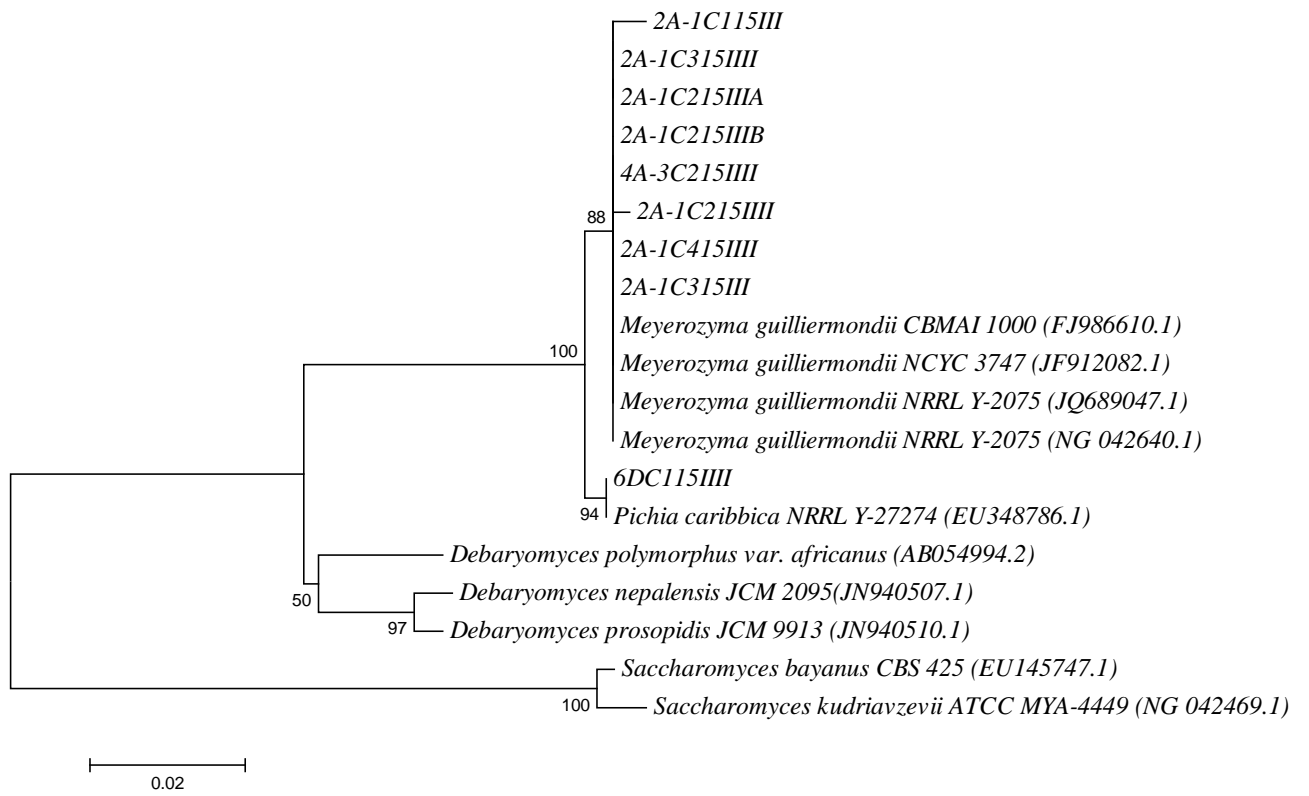
ANEXO XVIII – Árvore Filogenética *Cryptococcus*



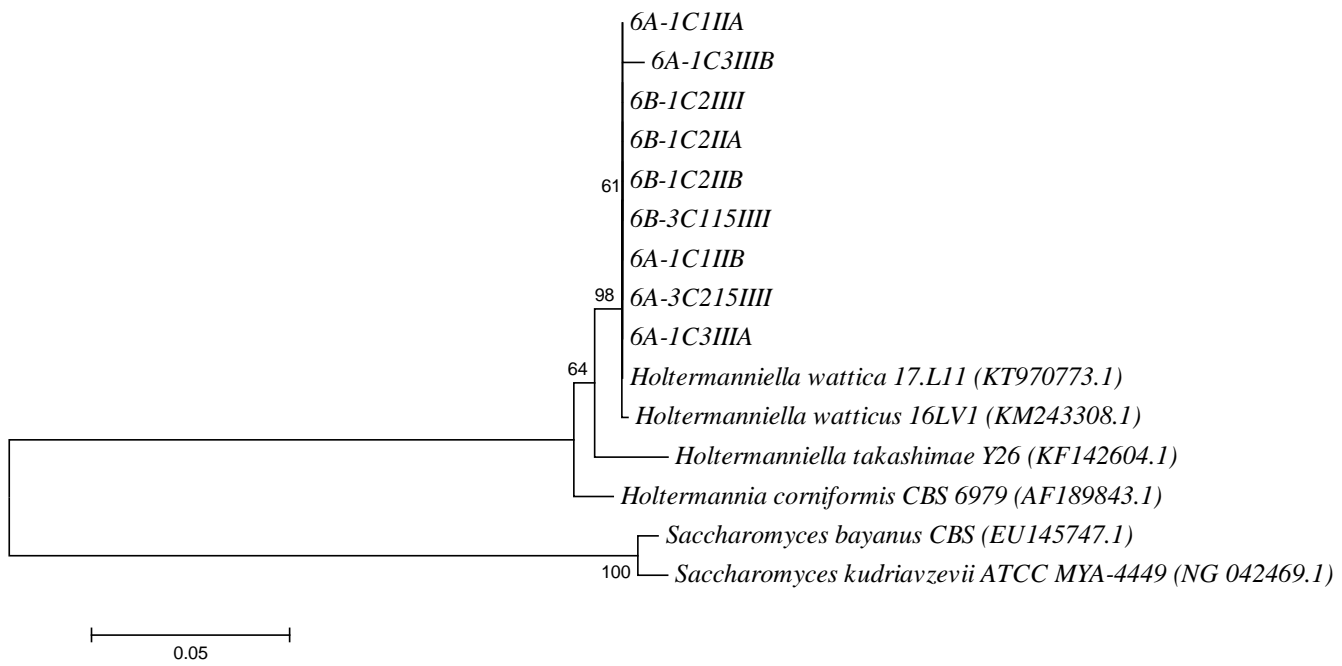
ANEXO XIX– Árvore Filogenética *Glaciozyma*



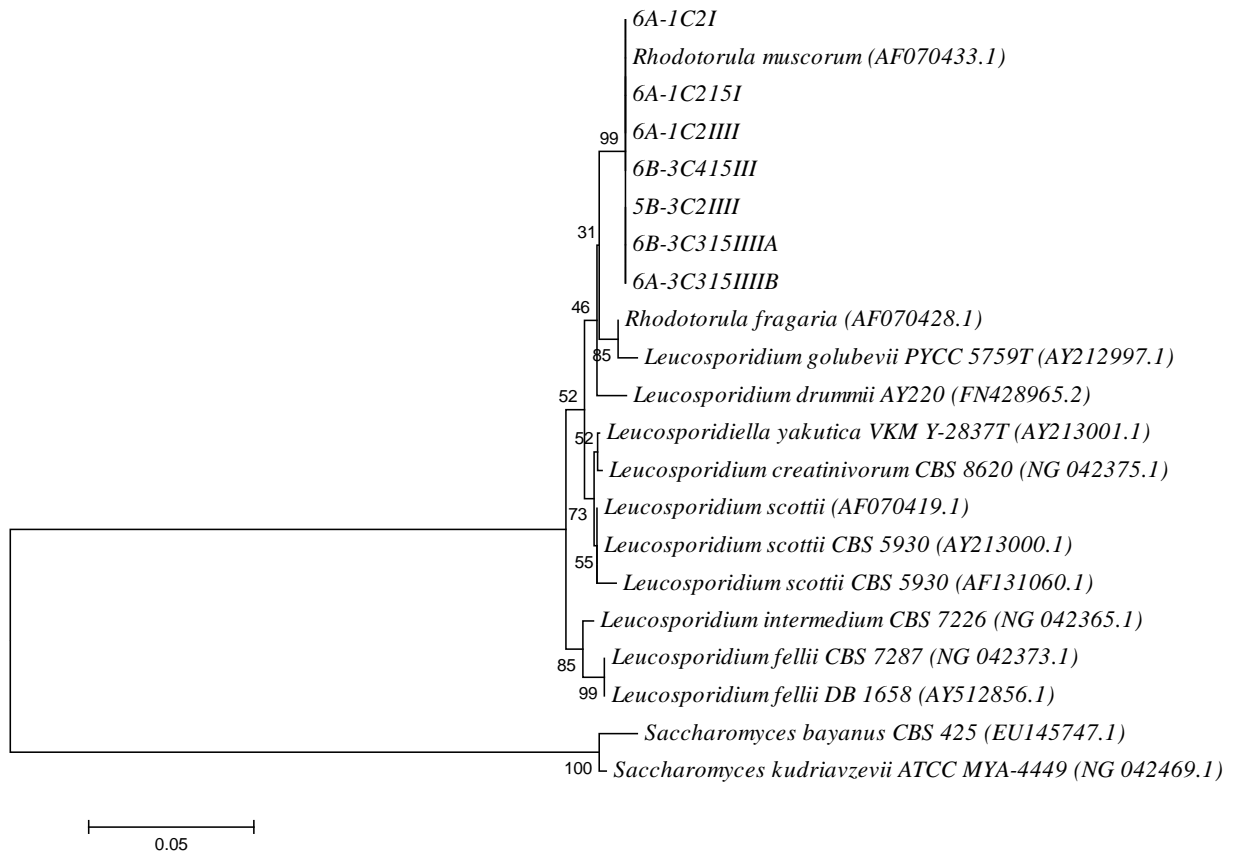
ANEXO XX – Árvore Filogenética *Meyerozyma*



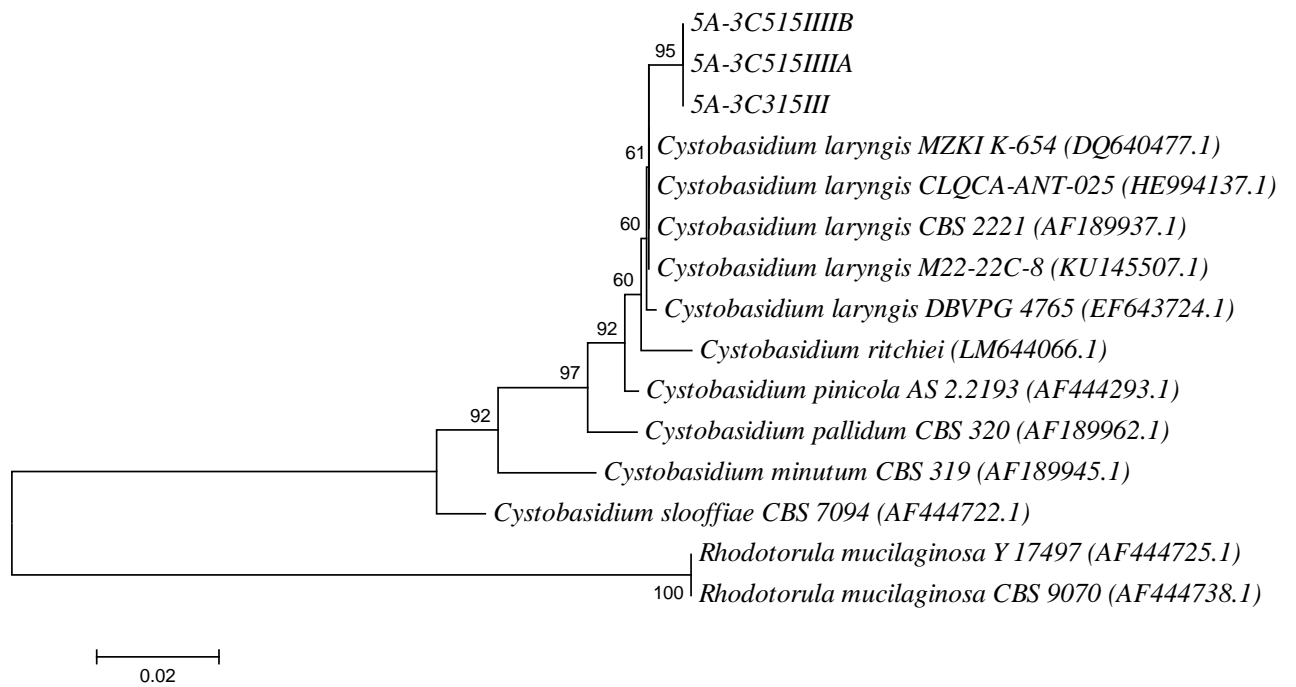
ANEXO XXI – Árvore Filogenética *Holtermanniella*



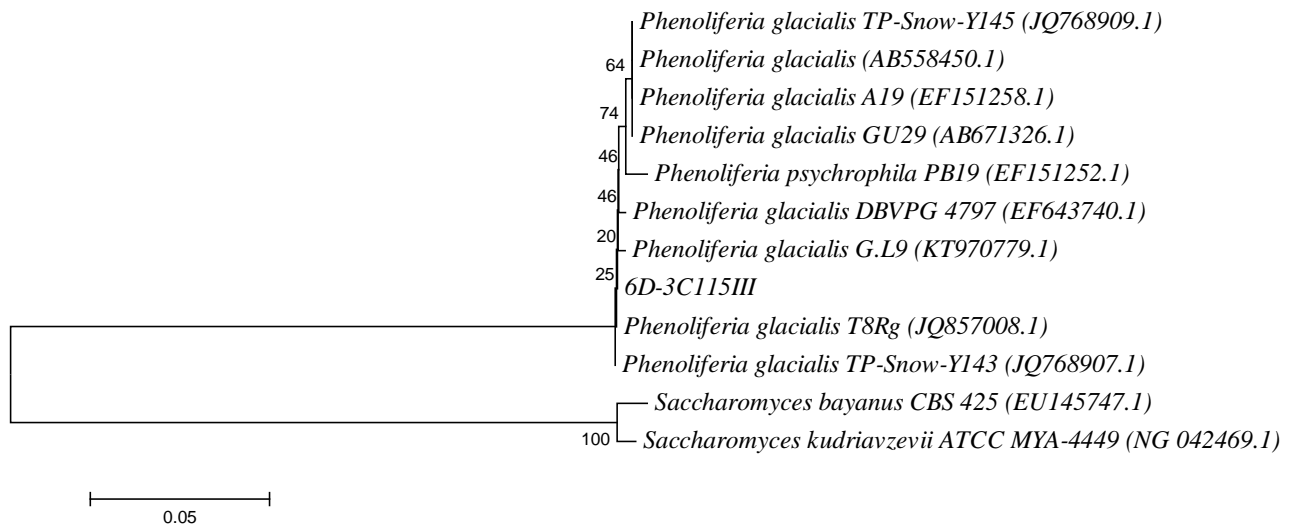
ANEXO XXII – Árvore Filogenética *Rhodotorula*



ANEXO XXIII – Árvore Filogenética *Cystobasidium*



ANEXO XXIV – Árvore Filogenética *Phenoliferia*

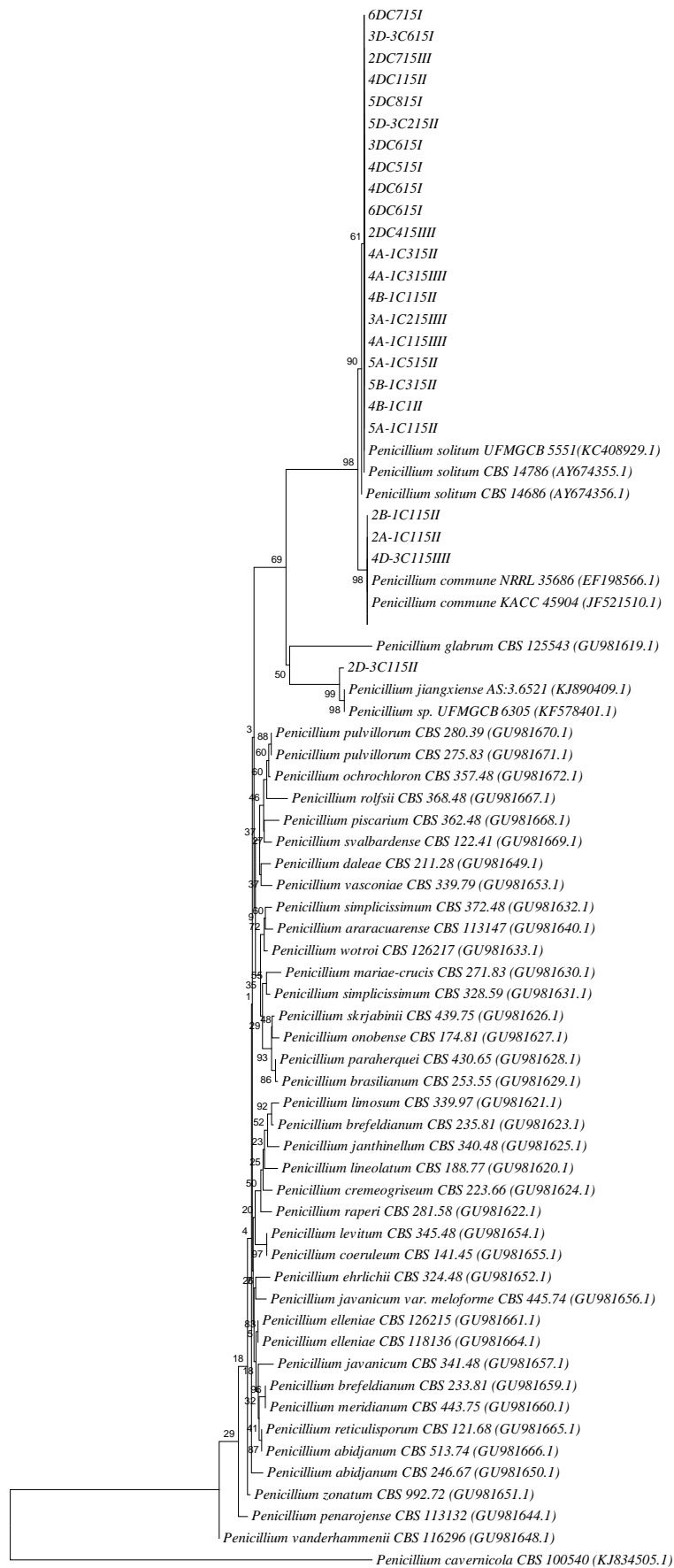


ANEXO XXV- Sequenciamento de fungos filamentosos e dados do *Blast* (GenBank)

Código Identificação	Nº Genbank	Parentes mais próximos	Similaridade (%)
2DC615IA	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98
6DC415I	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
4D-3C115I	NR_136143.1	<i>Phaeoacremonium santali</i> CBS 137498	86
6DC315I	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	97
6DC515I	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
2D-3C115III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98
5DC115I	JQ936271.1	<i>Paraconiothyrium variabile</i> strain C31	99
6DC215III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
2D-3C115III	KJ755525.1	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579	97
5A-1C715III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98
2DC615IB	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	97
5D-3C115II	NR_111765.1	<i>Toxicocladosporium strelitziae</i> CBS 132535	96
2DC1II	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
6DC1I	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
4D-3C1II	KT600381.1	<i>Cladosporium austroafricanum</i> CPC:16763	100
5DC1III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
6DC4I	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	97
6DC4III	KJ755525.1	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579	99
5D-3C1II	GU214682.1	<i>Pseudocercospora fraxini</i> strain CPC 11509	99
2D-3C115II	AF178517.1	<i>Penicillium pulvillorum</i> strain NRRL 2026	99
6D-3C1III	KM199302.1	<i>Pestalotiopsis kenyana</i> strain CBS 442.67	100
6DC715I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	99
2DC715III	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
4DC115II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
5DC815I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
5D-3C215II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
3DC615I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
4D-3C115III	JF521510.1	<i>Penicillium commune</i> strain KACC 45904	99
3D-3C615I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
4DC515I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
4DC615I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
6DC615I	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
2DC415III	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
3D-3C1II	KT600381.1	<i>Cladosporium austroafricanum</i> CPC:16763	99
3A-1C415III	AF198245.1	<i>Graphium rubrum</i> ATCC 24593	99
4A-1C315II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
3A-1C215III	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum</i> isolate UFMGCB 5551	100
4A-1C615III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	99
4B-1C115III	NR_119730.1	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i> CBS 124456; CPC 13980	99
3A-1C215III	AF198245.1	<i>Graphium rubrum</i> ATCC 24593	99

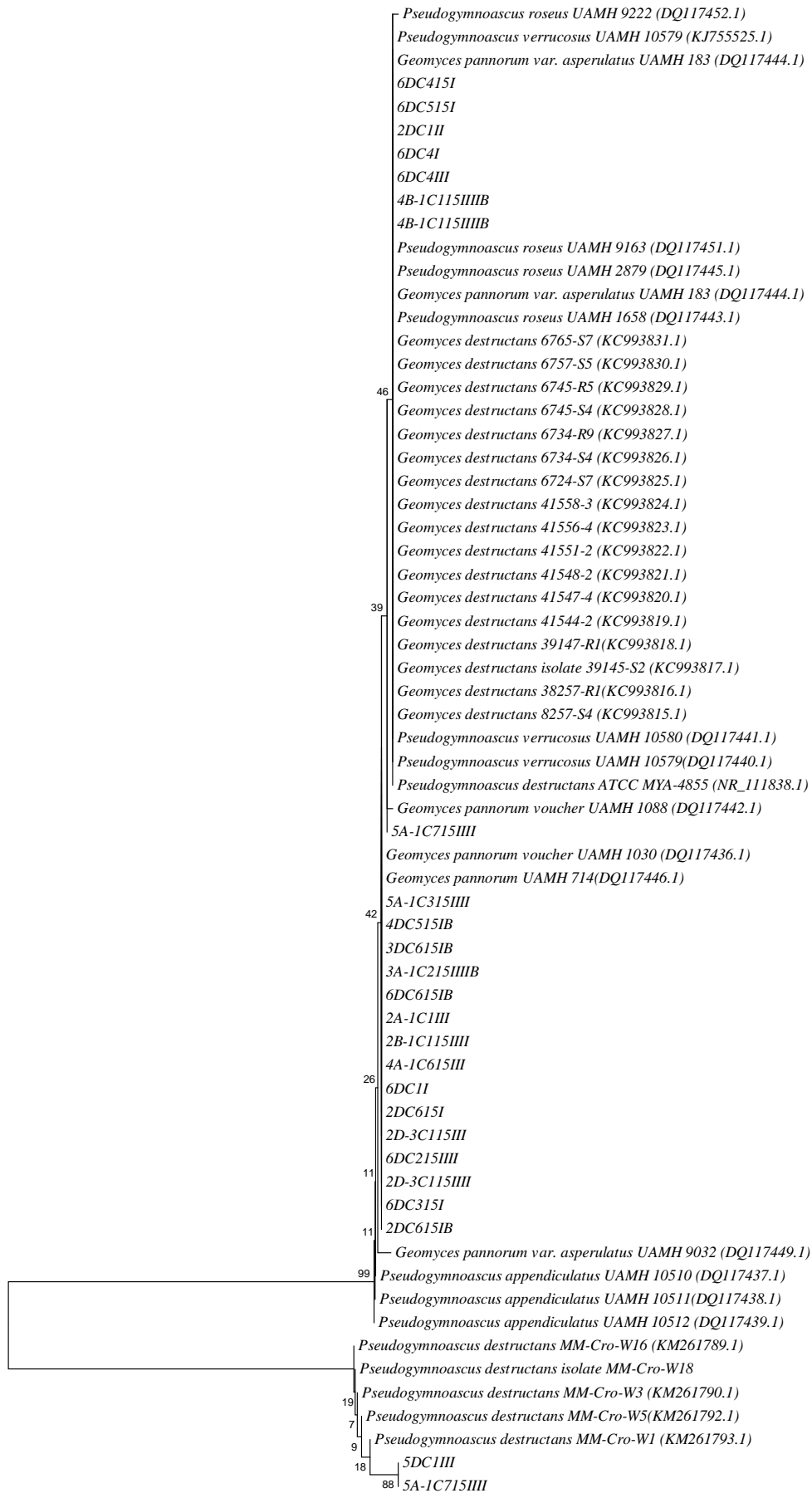
5A-1C715III	EU884921.1	<i>Pseudogymnoascus verrucosus strain UAMH 10579</i>	99
2B-1C115III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-485</i>	98
4B-1C115II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100
5A-1C315III	KJ755525.1	<i>Pseudogymnoascus verrucosus strain UAMH 10579</i>	99
3A-1C4III	AF198245.1	<i>Graphium rubrum ATCC 24593</i>	100
2A-1C115II	JF521510.1	<i>Penicillium commune strain KACC 45904</i>	99
3A-1C315III	NR_119489.1	<i>Mollisia dextrinospora CBS:401.78</i>	96
2B-1C115II	JF521510.1	<i>Penicillium commune strain KACC 45904</i>	99
4A-1C115III	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100
5A-1C515II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100
5B-1C315II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100
5A-1C115II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100
4DC515IB	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-4855</i>	99
3DC615IB	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-4855</i>	99
4B-1C115IIIB	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-4855</i>	99
3A-1C215IIIB	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-4855</i>	99
6DC615IB	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-4855</i>	99
4A-1C315III	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100
2A-1C1III	NR_111838.1	<i>Pseudogymnoascus destructans ATCC MYA-4855</i>	99
4B-1C1II	KJ834439.1	<i>Penicillium solitum isolate UFMGCB 5551</i>	100

ANEXO XXVI – Árvore Filogenética *Penicillium*



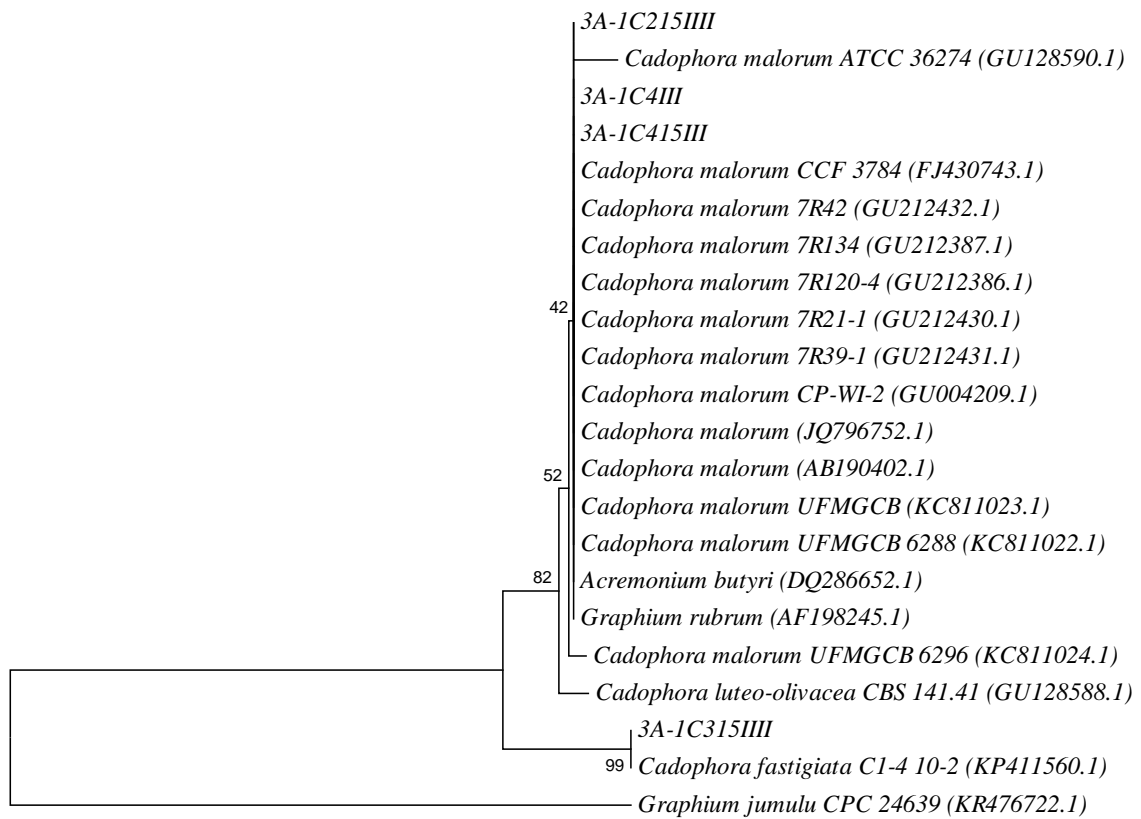
0.1

ANEXO XXVII – Árvore Filogenética *Pseudogymnoascus*

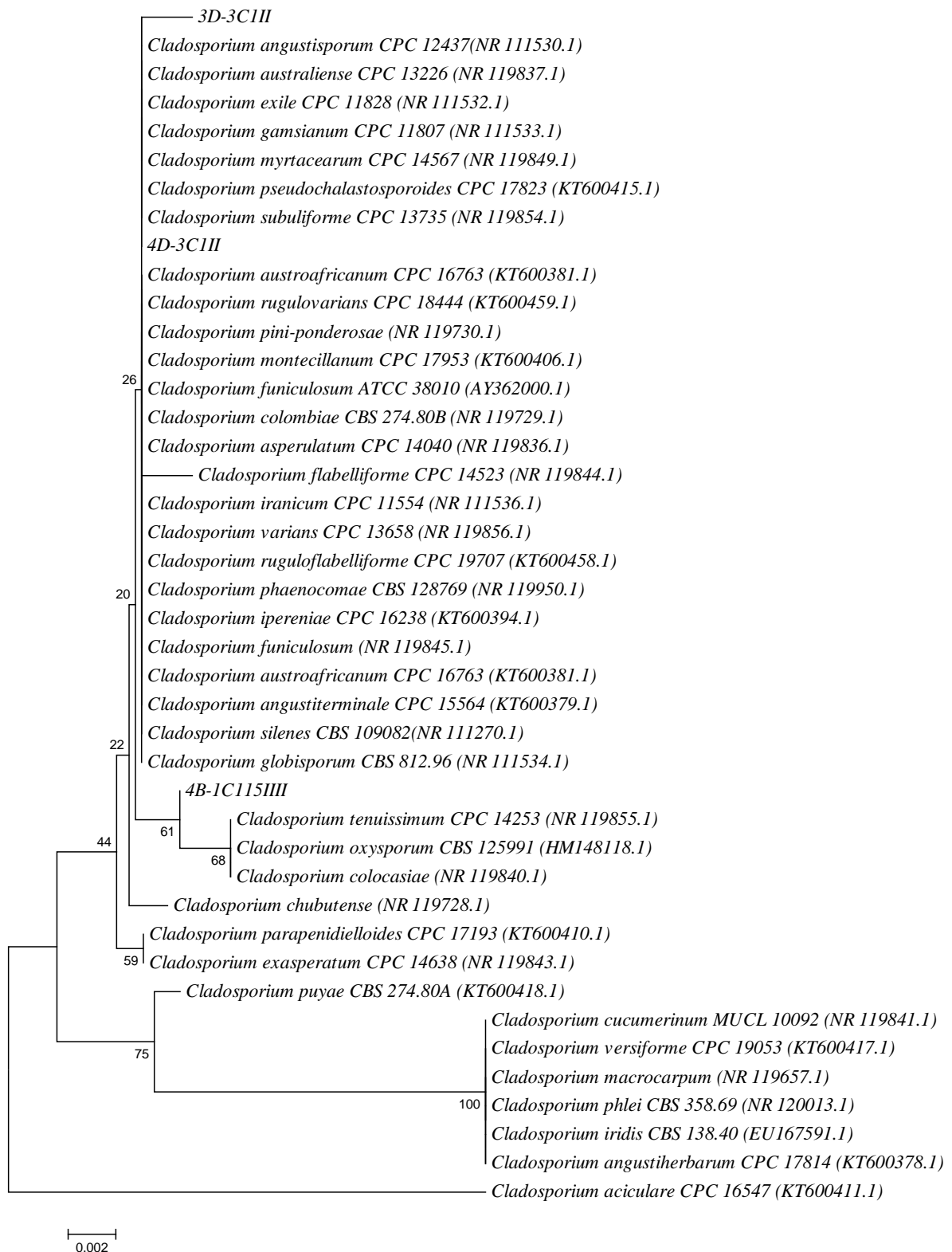


0.1

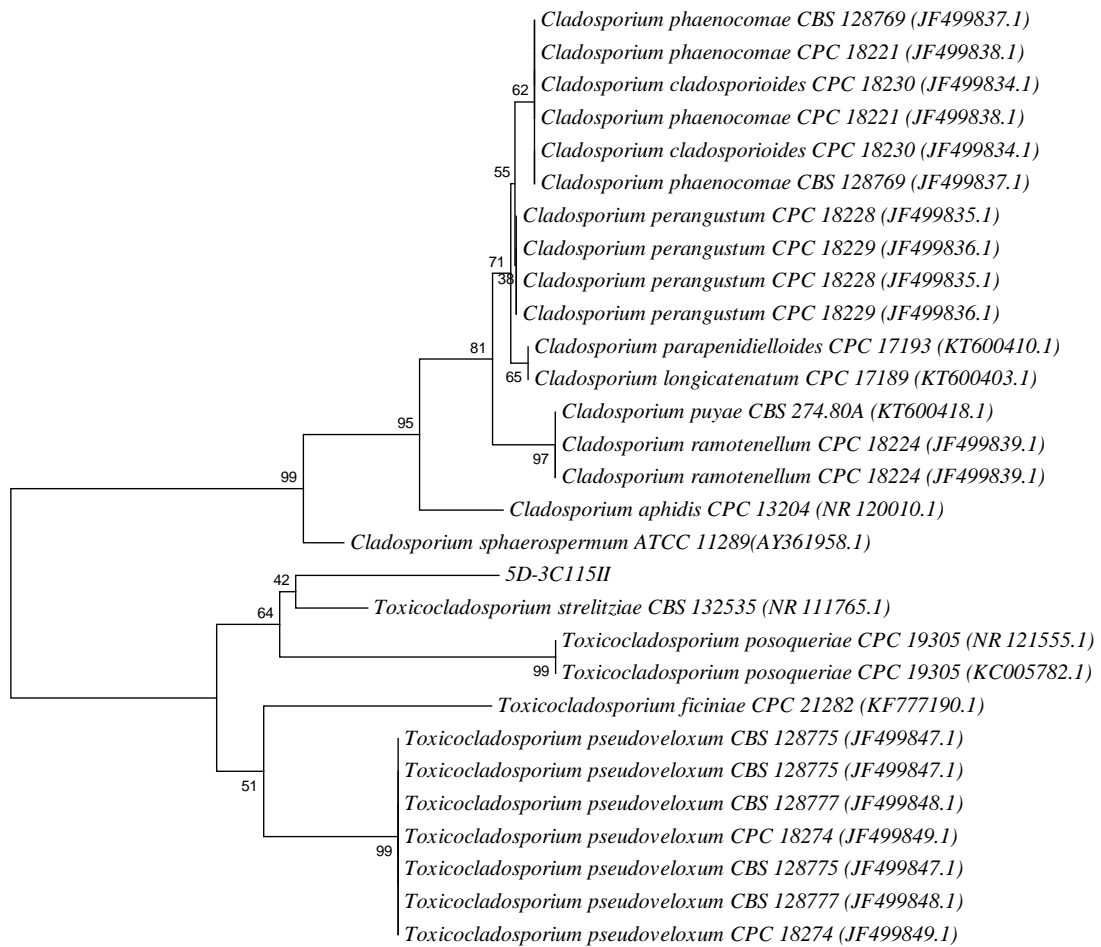
ANEXO XVIII – Árvore Filogenética *Cadophora*



ANEXO XXIX– Árvore Filogenética *Cladosporium*

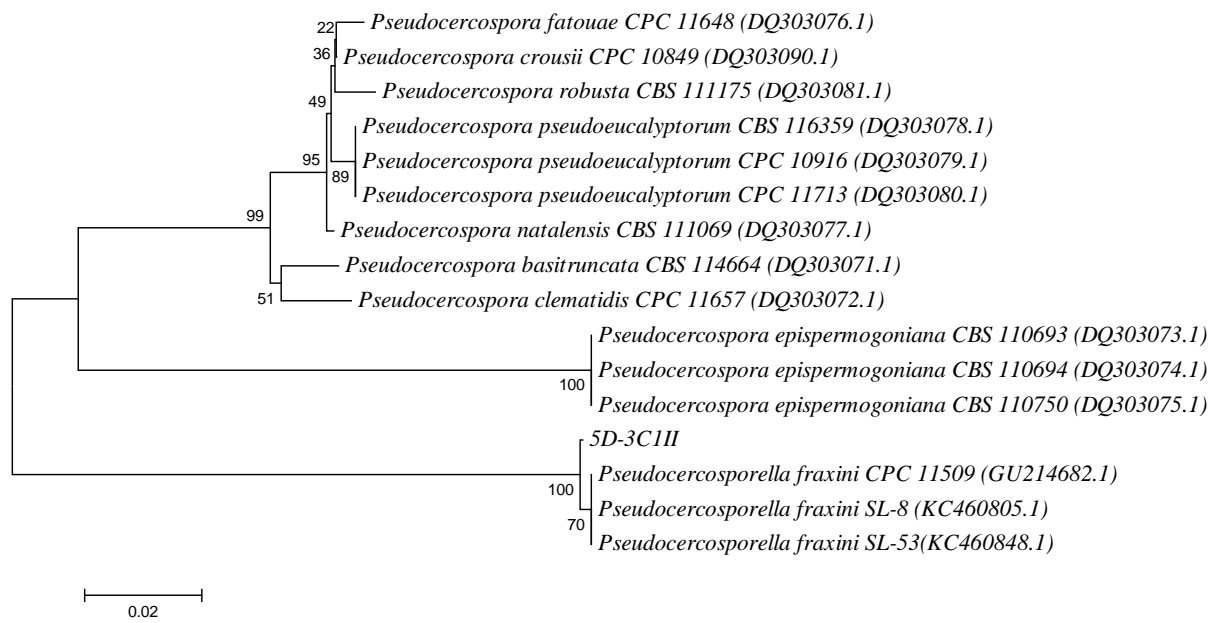


ANEXO XXX – Árvore Filogenética *Toxicocladosporium*

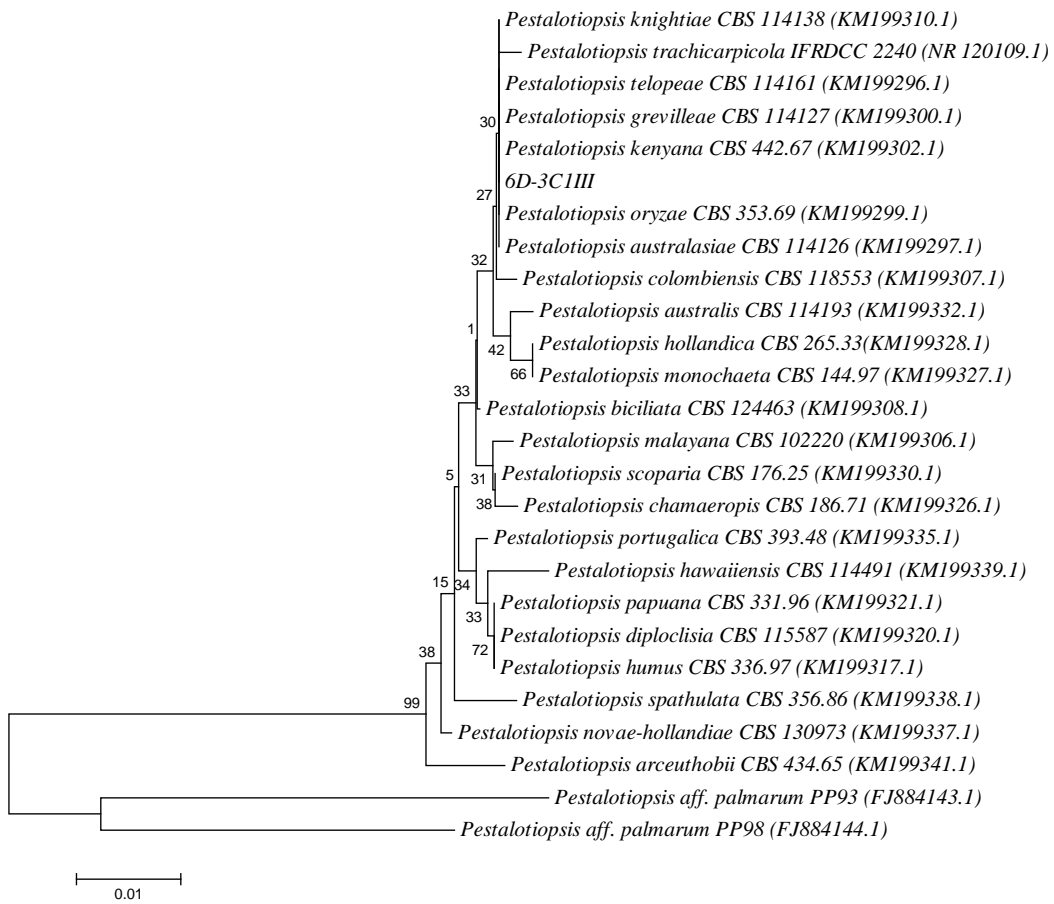


0.01

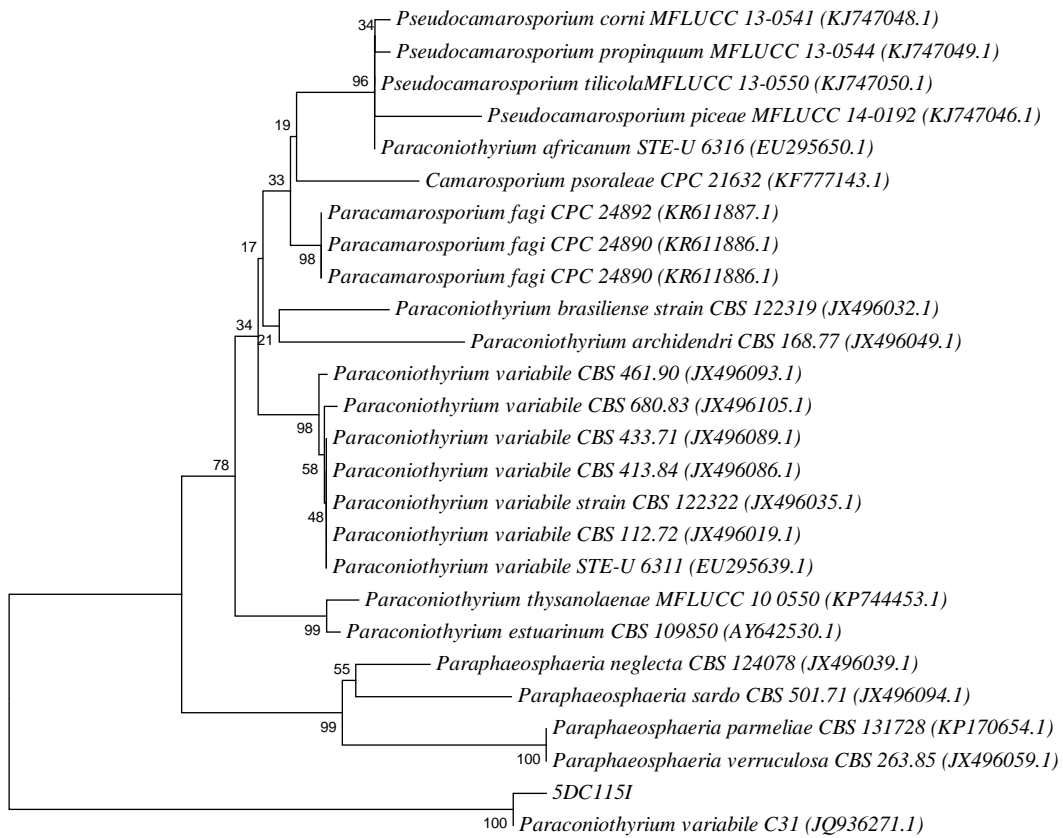
ANEXO XXXI – Árvore Filogenética *Pseudocercospora*



ANEXO XXXII – Árvore Filogenética *Pestalotiopsis*

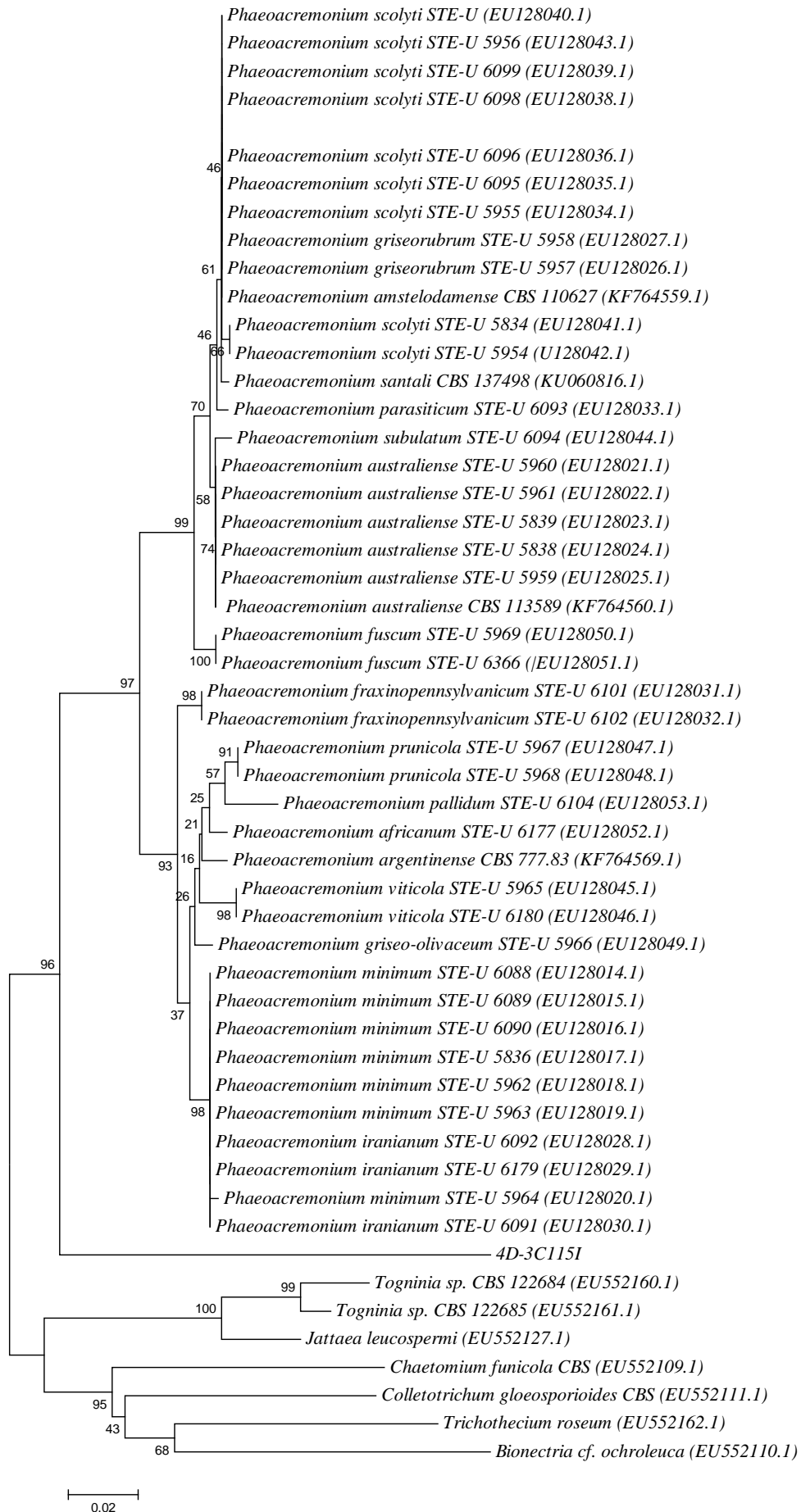


ANEXO XXXIII – Árvore Filogenética *Paraconiothyrium*

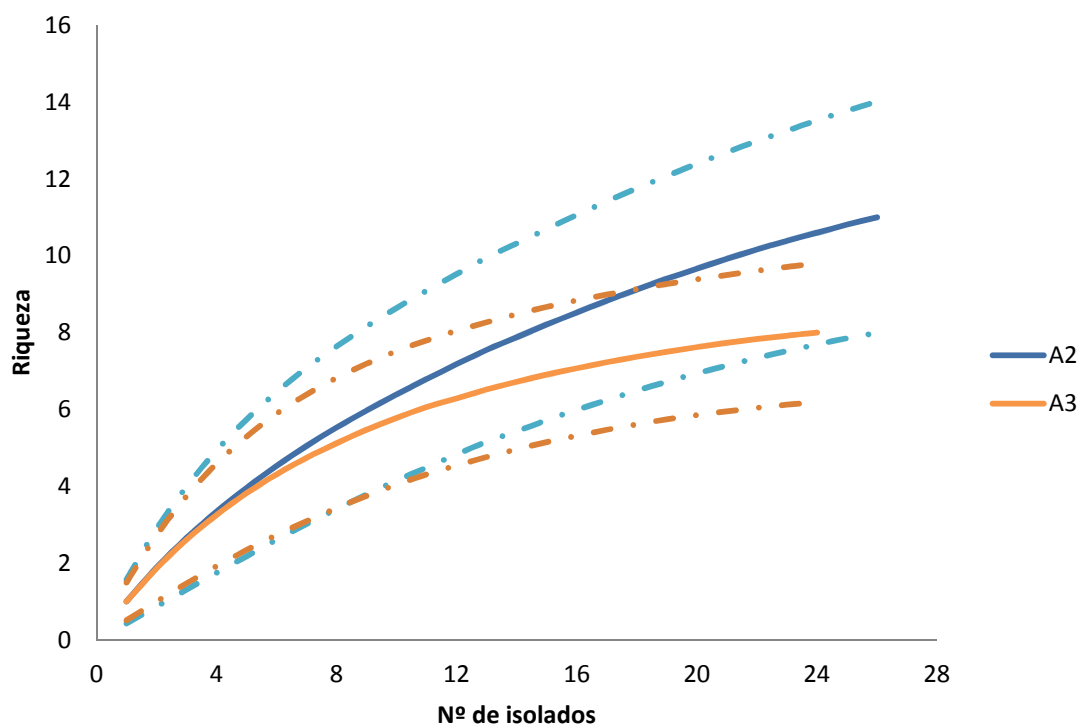


0.01

ANEXO XXXIV – Árvore Filogenética Fungo Não Identificado

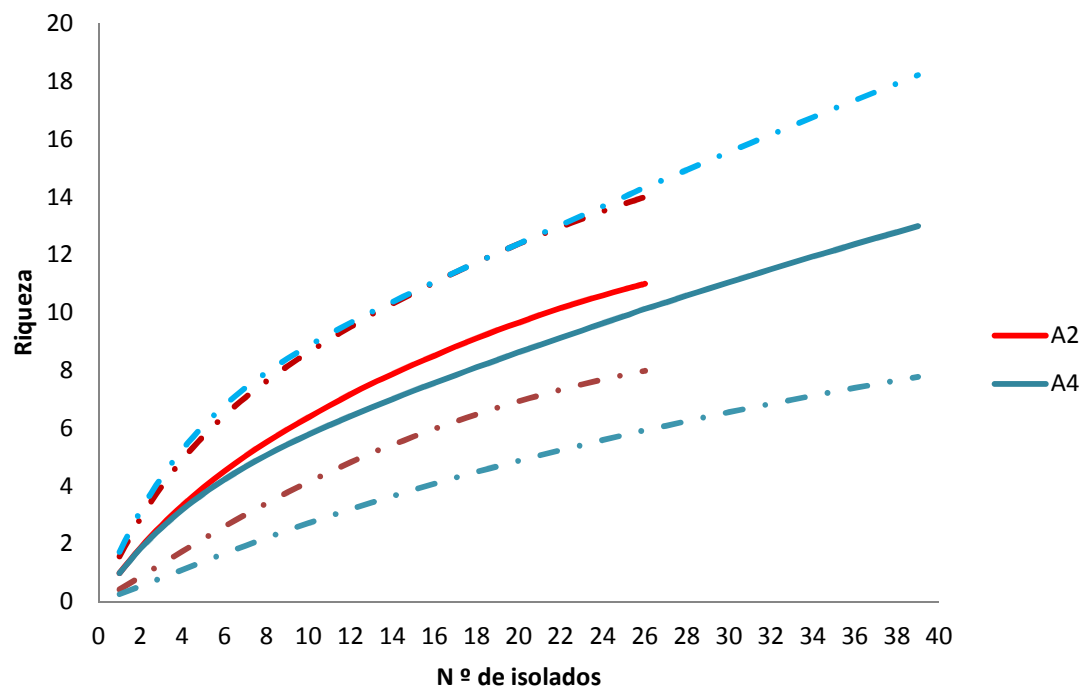


ANEXO XXXV – Curva rarefação amostra A2 e A3



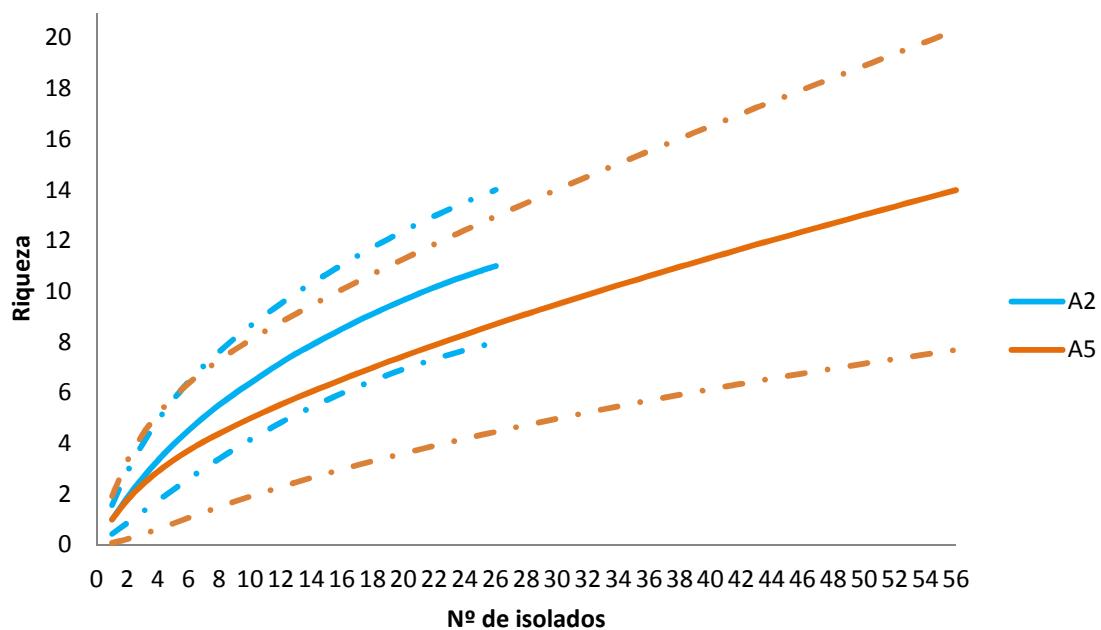
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XXXVI – Curva rarefação amostra A2 e A4



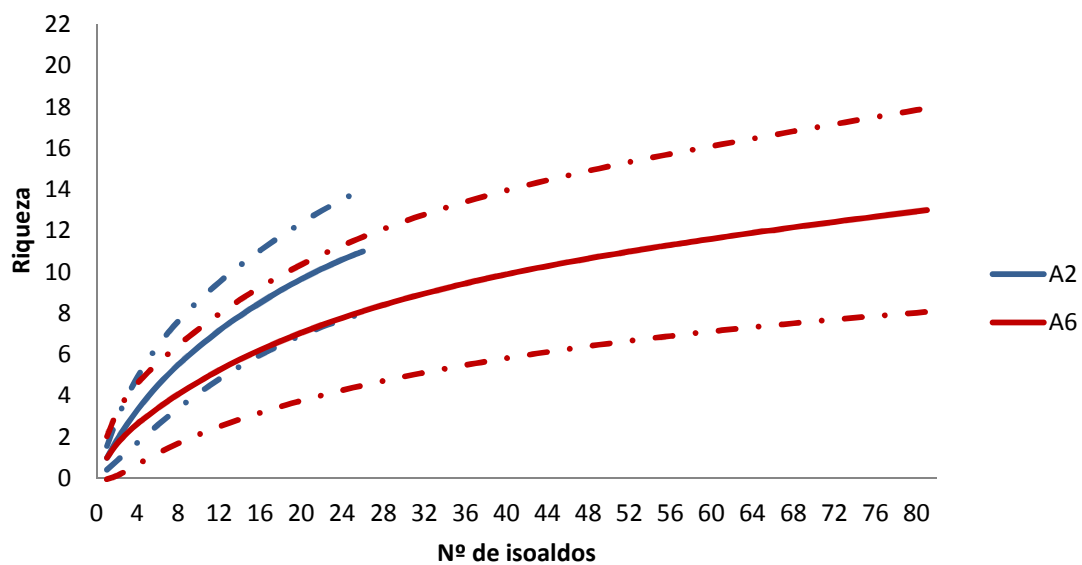
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XXXVII – Curva rarefação amostra A2 e A5



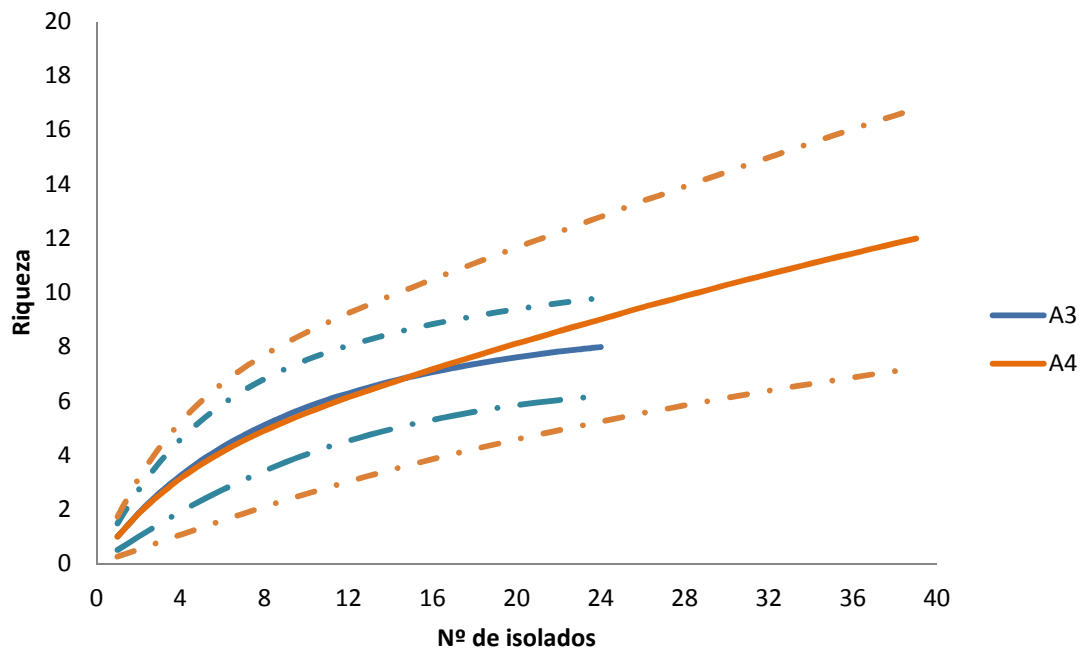
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XXXVIII – Curva rarefação amostra A2 e A6



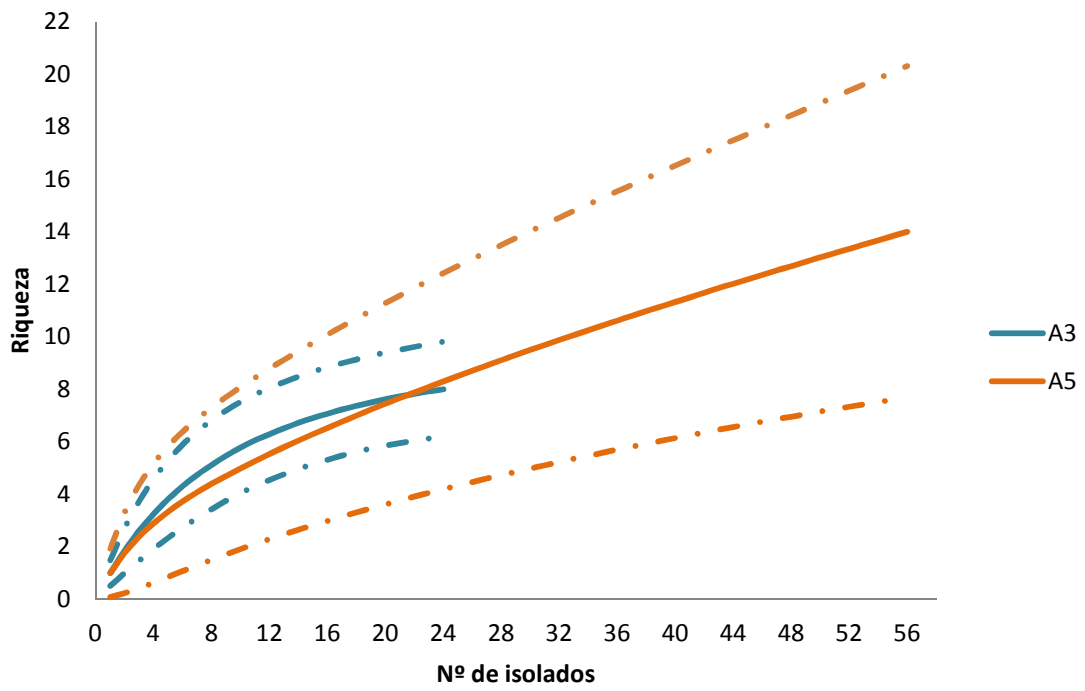
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XL – Curva rarefação amostra A3 e A4



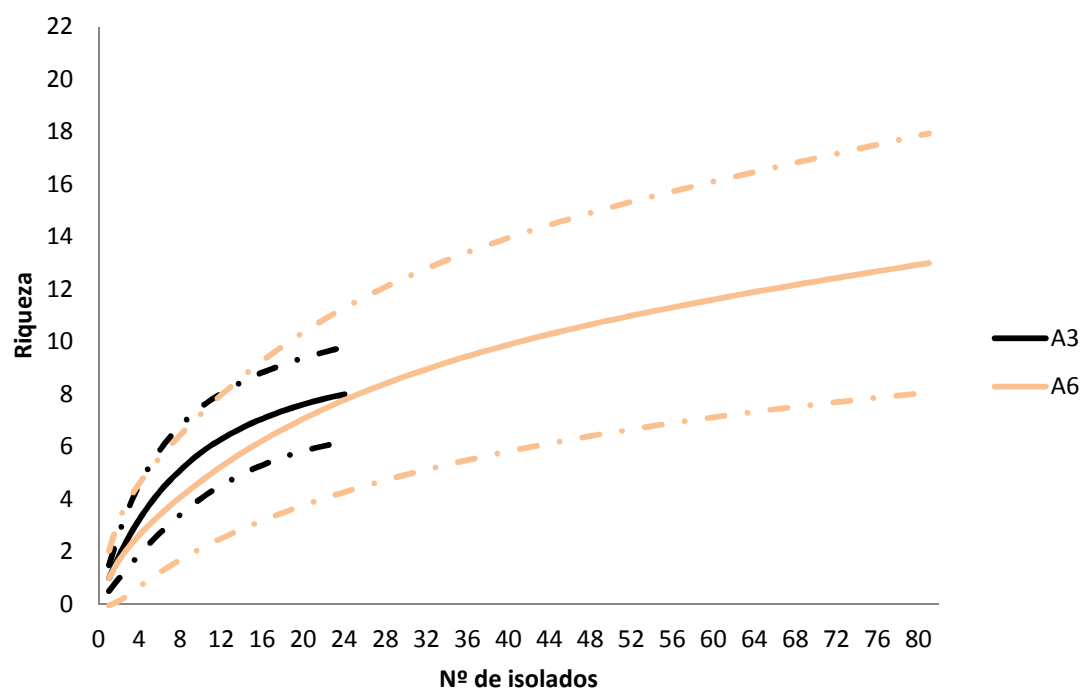
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XLI – Curva rarefação amostra A3 e A5



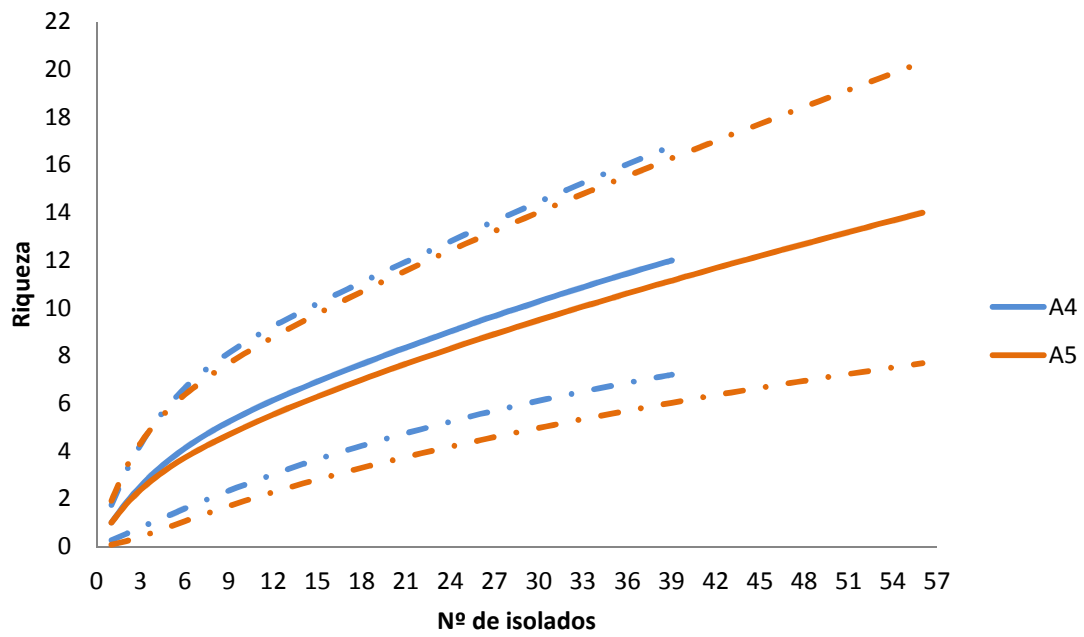
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XLII – Curva rarefação amostra A3 e A6



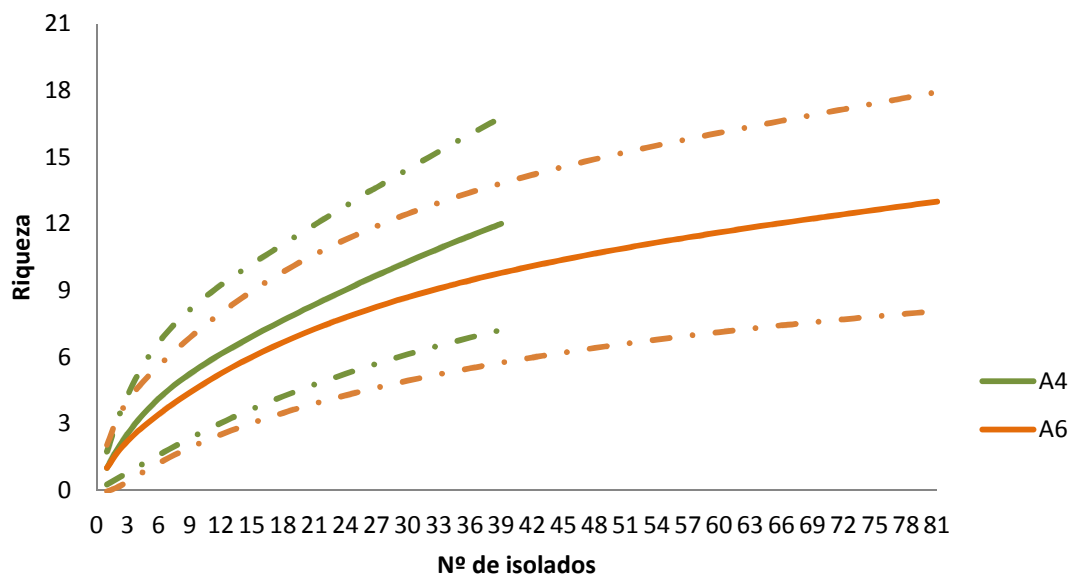
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XLIII – Curva rarefação amostra A4 e A5



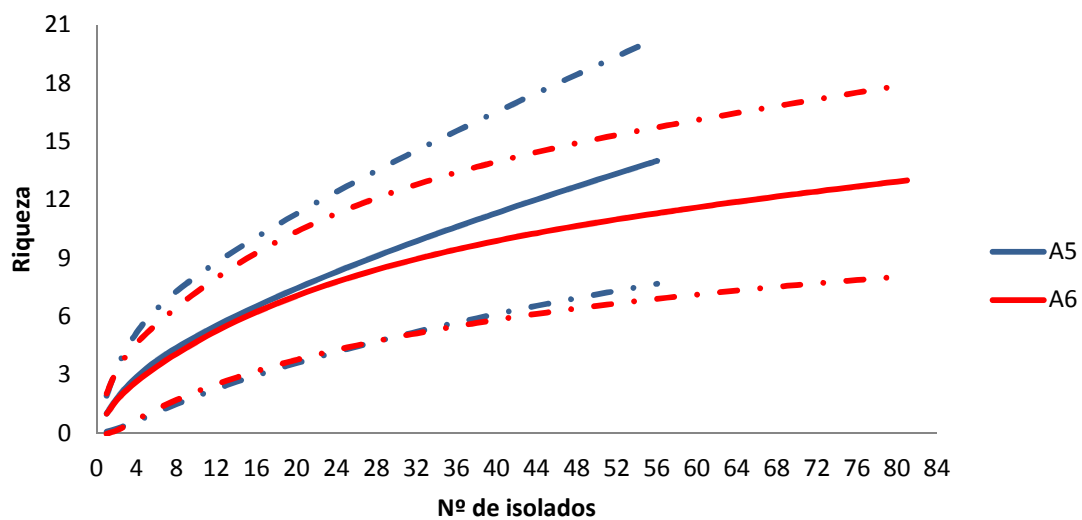
Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XLIV – Curva rarefação amostra A4 e A6



Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.

ANEXO XLV – Curva rarefação amostra A5 e A6



Obs. As linhas tracejadas são os intervalos de confiança.