FERNANDO SUZIGAN NOBRE

**ATIVIDADE LIPOLÍTICA E BIODIVERSIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS DERIVADOS DA ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2012

FERNANDO SUZIGAN NOBRE

**ATIVIDADE LIPOLÍTICA E BIODIVERSIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS DERIVADOS DA ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Lara Durães Sette

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Nobre, Fernando Suzigan.

Atividade lipolítica e biodiversidade de fungos filamentosos derivados da Antártica / Fernando Suzigan Nobre. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Enzimas adaptadas ao frio.

Versão do título para o inglês: Lipase activity and biodiversity of filamentous fungi derived from Antarctica.

1. Antártica 2. Fungos filamentosos 3. Lipase 4. Bioprospecção
5. Temperaturas extremas 6. Enzimas adaptadas ao frio I. Sette, Profa. Dra. Lara Durães II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0202/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Fernando Suzigan Nobre.

Título da Dissertação: Atividade lipolítica e biodiversidade de fungos filamentosos
derivados da Antártica.

Orientador(a): Profa. Dra. Lara Durães Sette.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho à memória de meu Pai
Hélio Ferreira Nobre.

AGRADECIMENTOS

A todos da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP pelo convívio e ajuda.

A Dra. Lara Durães Sette que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual e pela atenção, apoio e paciência durante o processo de orientação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço pelo suporte financeiro do projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram de alguma forma.

Muito obrigado!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um
novo começo, qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

NOBRE, F. S. **Atividade lipolítica e biodiversidade de fungos filamentosos derivados da Antártica**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os fungos filamentosos derivados de ambiente antártico têm sido foco de grande interesse devido principalmente ao fato de pouco se conhecer sobre a natureza biológica e os recursos genéticos associados a esse grupo de micro-organismos. A demanda por enzimas industriais, particularmente as de origem microbiana, tem crescido incessantemente devido às suas aplicações em uma vasta gama de processos. Com a descoberta do potencial biocatalítico das lipases microbianas, estas enzimas têm se tornado um grande foco de estudos e utilização em reações químicas diversas. Levando-se em consideração que as lipases ativas em temperaturas frias estão amplamente distribuídas em micro-organismos que sobrevivem em temperaturas baixas, o isolamento de fungos de ambiente antártico pode ser considerado estratégico para obtenção de lipases a baixas temperaturas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a produção de lipases e a diversidade de fungos filamentosos isolados de amostras do ambiente Antártico. Foram recuperados um total de 253 isolados a partir de 10 amostras marinhas e quatro terrestres coletadas no continente Antártico. Dos 72 fungos lipolíticos selecionados pelo método de triagem de alto desempenho, 68 apresentaram resultados positivo no teste individual e foram submetidos aos experimentos de avaliação da produção de lipase e caracterização da biodiversidade. Os dados derivados das análises de seqüenciamento e filogenia permitiram identificar os fungos produtores de lipase como pertencentes aos gêneros: *Geomyces*, *Penicillium*, *Cosmospora*, *Thelebolus*, *Chaetomium*, *Hypocrea*, *Antarctomyces*, *Mortierella* e *Cadophora*. Em adição, alguns isolados de um mesmo ribotipo foram afiliados à ordem Mucorales e, outro, revelou ser uma potencial nova espécie pertencente ao filo Basidiomycota. O fungo *Geomyces pannorum*. AL1-1B foi selecionado como o melhor produtor de lipase e apresentou aumento significativo na atividade desta enzima após a otimização por meio do desenho experimental. O pico de produção de lipase (761,68 U/L) foi obtido no 5º dia de cultivo em pH 8,0 a 15 °C com o uso de 2,21% de óleo de Soja, 2,79% de óleo de Girassol e 3,79% de extrato de levedura. Os resultados do presente estudo evidenciam o potencial biotecnológico do fungo *Geomyces pannorum* AL1-1B na produção de lipase a baixas temperaturas e estimulam novos estudos no campo da caracterização enzimática, detecção e caracterização de genes que codificam para a produção de lipases, bem como otimização da em escala industrial.

Palavras-chave: Antártica. Fungos filamentosos. Lipase. Bioprospecção. Temperaturas extremas.

ABSTRACT

NOBRE, F. S. **Lipase activity and biodiversity of filamentous fungi derived from Antarctica**. 2012. 68 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Filamentous fungi derived from Antarctic environment have been the focus of great interest mainly due to the fact that little is known about the biological nature and genetic resources of this group of micro-organisms. The demand for industrial enzymes, especially of microbial origin, has grown constantly because of their applications in a wide range of processes. With the discovery of the biocatalytic potential of microbial lipases, these enzymes have become a major focus of study and use in various chemical reactions. Taking into consideration that the cold-active lipases are widely distributed in micro-organisms which survive in low temperatures, fungal isolation from Antarctic environment can be considered strategic for obtaining lipases at low temperatures. In this context, this project aimed to assess the production of lipases and diversity of filamentous fungi isolated from samples of the Antarctic environment. A total of 253 isolates were retrieved from 10 marine and four terrestrial samples collected on the Antarctic continent. Amongst the 72 fungal lipolytic strains selected by a high-throughput screening method, 68 presented positive results in the individual test and were subjected to the experiments of lipase production evaluation and biodiversity characterization. Data derived from sequencing and phylogeny allowed the identification of lipase producing fungi as representatives of the genera: *Geomyces*, *Penicillium*, *Cosmospora*, *Thelebolus*, *Chaetomium*, *Hypocrea*, *Antarctomyces*, *Mortierella* and *Cadophora*. In addition, some isolates of the same ribotype were affiliated to the order Mucorales, and another one, showed to be a putative new species from phylum Basidiomycota. The fungus *Geomyces pannorum* AL1-1B was selected as the lipase best producer and showed an increase in the enzyme activity after optimization by using experimental design. Peak production of lipase (761.68 U / L) was obtained in the 5th day of cultivation at pH 8.0 at 15 °C using 2.21% soy oil, 2.79% of oil Sunflower and 3.79% yeast extract. Results from this study highlight the biotechnological potential of *Geomyces pannorum* AL1-1B for lipase production at low temperatures and stimulate further studies in the field of enzymatic characterization, detection and characterization of genes encoding lipase production and enzyme optimization on an industrial scale.

Keywords: Antarctic. Filamentous fungi. Lipase. Bioprospecting. Extreme temperatures.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Biodiversidade nos ecossistemas microbianos da Antártica	11
1.2 Taxonomia de fungos filamentosos	15
1.3 Bioprospecção de produtos de interesse biotecnológico por fungos da Antártica	16
1.3.1 <i>Propriedades, produção e aplicações das lipases</i>	18
1.3.2 <i>Influência do meio na produção de enzimas</i>	20
1.3.2.1 <u>Influência do pH</u>	20
1.3.2.2 <u>Influência da temperatura</u>	21
1.3.2.3 <u>Fonte de carbono</u>	21
1.3.2.4 <u>Fonte de nitrogênio</u>	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos específicos	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Isolamento de fungos filamentosos	23
3.2 High throughput screening- HTS de lipase	24
3.3 Confirmação da produção de lipase	25
3.4 Avaliação de polimorfismo genético: método de ARDRA	25
3.5 Taxonomia molecular - sequenciamento e análise filogenética	27
3.6 Atividade lipolítica	27
3.6.1 <i>Quantificação da atividade lipolítica</i>	28
3.6.2 <i>Otimização das condições de cultivo para produção de lipase</i>	29
3.6.3 <i>Determinação da atividade lipolítica específica</i>	31
3.6.3.1 <u>Dosagem de proteínas totais</u>	31
3.7 Quantificação da biomassa	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Coleta, isolamento e preservação de fungos filamentosos	33
4.2 Seleção de fungos lipolíticos por triagem de alto desempenho (HTS)	34
4.3 Fingerprinting Genético – ARDRA	36
4.4 Diversidade de fungos lipolíticos	38
4.5 Quantificação da produção de lipase	45
4.6 Otimização da produção de lipase pelo planejamento fatorial fracionado	46

4.7 Avaliação da atividade lipolítica específica do isolado, quantificação da massa seca e cinética enzimática.....	52
5 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE – Identificação taxonômica do fungo Geomyces sp. AL1-1B	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade nos ecossistemas microbianos da Antártica

Os grandes grupos de micro-organismos, incluindo as bactérias, fungos filamentosos e leveduras possuem importância fundamental na biosfera por serem colonizadores primários de novos habitats e fornecedores de biomassa e energia nas cadeias alimentares e por se apresentarem como patógenos e/ou simbioses de plantas e animais. Os micro-organismos influenciam também o balanço respiratório e fotossintético em alguns ecossistemas, e a disponibilidade de oxigênio, dióxido de carbono, metano e outros gases (HAWKSWORTH, 2004).

Inúmeros papéis biológicos essenciais têm sido associados aos micro-organismos, porém, o conhecimento das relações e evolução de muitos grupos taxonômicos microbianos ainda é escasso.

Com relação aos fungos, apenas 105 mil espécies (7%) são conhecidas pela ciência dentro de uma estimativa de 1,5 a 3 milhões de espécies a serem descobertas (HAWKSWORTH, 2004). Dado o baixo número de espécies descritas, pode-se notar que mesmo o desenvolvimento de novas técnicas não tem permitido avançar rapidamente na caracterização desses micro-organismos.

Micro-organismos provenientes de ambientes antárticos podem ser considerados fontes potenciais de recursos genéticos para aplicação biotecnológica, pois por pertencerem a ambientes ainda pouco explorados, podem representar a descoberta de novos medicamentos ou novos compostos bioativos. Neste sentido, estudos de biodiversidade e bioprospecção de compostos de interesse industrial derivados de micro-organismos da Antártica devem ser estimulados.

O ambiente antártico apresenta uma oportunidade única para a pesquisa sobre a biodiversidade e a evolução microbiana. Apesar disso, o tema da diversidade biológica na Antártica durante muitos anos esteve relacionado com a diversidade de peixes, aves e mamíferos marinhos e poucas vezes os micro-organismos foram contemplados.

O avanço das técnicas moleculares tem permitido um grande salto na compreensão da filogenia, biodiversidade e evolução dos micro-organismos em diversos ecossistemas e amostras ambientais. Entretanto, mesmo com a introdução

dessas técnicas modernas, o conhecimento atual da diversidade microbiana na Antártica representa apenas “a ponta do iceberg” (TINDALL, 2004).

Por se tratar de um continente isolado dos demais por correntes oceanográficas e pela distância, a Antártica é um ambiente que se caracteriza por extremos de clima, habitats e biogeografia. Nos ecossistemas antárticos ocorrem grandes variações de temperatura e salinidade, dessecação, escassez de nutrientes, alta incidência de radiação ultravioleta alternada com longos períodos de ausência de luz, mudanças climáticas acentuadas e descontínuas, além dos ciclos de congelamento e degelo, que influenciam a distribuição das massas de água no Oceano Austral e geram alterações locais de clima (CLARKE, 2003; VINCENT, 2000; WYN-WILLIAMS, 1996).

Em um ambiente tão extremo e restritivo, a diversidade de uma maneira geral tende a ser menor quanto mais alta as latitudes e, em alguns sistemas, os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares chegam a ser exclusivamente formadas por micro-organismos, como nos solos minerais dos desertos frios e em porções mais profundas de gelo glacial (VINCENT, 2000). Dessa forma, os micro-organismos têm um papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica (CLARKE, 2003).

Os ecossistemas existentes na Antártica apresentam uma grande variedade de características. Alguns exemplos são os solos minerais, ornitogênicos ou aquecidos geotermicamente, como os encontrados na Ilha de Decepção (Ilhas Shetland do Sul), gelo glacial, marinho ou de água doce, permafrost, lagos continentais de salinidade variada, cobertos perenemente ou sazonalmente por gelo, sistemas endolíticos, ecossistemas marinhos (bentônico e pelágico), entre outros. A maioria desses ambientes antárticos possui cadeias alimentares de complexidade reduzida, servindo como modelos para o estudo de processos microbianos em geral e das interações de significado evolutivo sem a influência das plantas e animais superiores.

As comunidades microbianas antárticas são temas de grande interesse por estarem sujeitas a longos períodos de isolamento com baixos níveis de perturbação. Entretanto, as atividades humanas na região Antártica podem impactar de forma irreversível a compreensão dos ecossistemas microbianos. A partir do final dos anos 50, esses habitats ficaram sujeito a maiores alterações devido tanto às

atividades humanas na Antártica quanto às mudanças climáticas globais (CLARKE, 2003).

Pouco é conhecido sobre os níveis de endemidade dentro dos diversos grupos microbianos na Antártica ou mesmo da presença ou adaptações dentro da população de espécies invasoras. O Quadro 1 apresenta uma lista de espécies de micro-organismos que foram descritos como endêmicos na região antártica.

Quadro 1 - Candidatos a endemismo microbiano: exemplos de espécies que foram apenas descritas e registradas na Antártica

(continua)

	Taxa	Habitat	Referência
Bactérias	<i>Antarctobacter* heliothermus</i>	Lago salino, Vestfold Hills	Labrenz et al., 1998
	<i>Clostridium vincentii</i>	Sedimentos anóxicos, McMurdo Ice Shelf	Mountfort et al., 1997
	<i>Colwellia</i> spp.	Gelo marinho	Bowman et al., 1998 ^a
	<i>Flavobacterium gondwanense</i>	Lago salino, Vestfold Hills	Dobson et al., 1993
	<i>Gelidibacter* algens</i>	Gelo marinho	Bowman et al., 1997 ^a
	<i>Halomonas subglaciescola</i>	Lago salino, Vestfold Hills	Franzmann et al., 1987
	<i>Methylosphaera* hansonii</i>	Lago salino, Vestfold Hills	Bowman et al., 1997b
	<i>Modestobacter* multiseptatus</i>	Solo, Trans-Antarctic Mountains	Mevs et al., 2000
	<i>Nocardiopsis antarcticus</i>	Placa de gelo	Abyzov, 1993
	<i>Octadecobacter antarcticus</i>	Gelo marinho	Gosink et al., 1997
	<i>Polaribacter</i> spp.	Gelo marinho	Gosink et al., 1998
	<i>Polaromonas* vacuolata</i>	Gelo marinho	Irgens et al., 1996
	<i>Pseudomonas antarctica</i>	Ross Island	Obata et al., 1999
	<i>Psychroflexus* gondwanense</i>	Gelo marinho	Bowman et al., 1998b
	<i>Psychrofexus* torquis</i>	Gelo marinho	Bowman et al., 1998 ^a
	<i>Psychromonas* antarcticus</i>	Sedimentos anóxicos, McMurdo Ice Shelf	Mountfort et al., 1998
	<i>Psychroserpens* burtonensis</i>	Lago salino	Bowman et al., 1997 ^a
	<i>Shewanella frigidimarina</i>	Gelo marinho, Prydz Bay	Bowman et al., 1997c

(conclusão)

	Taxa	Habitat	Referência
Bactérias	<i>Shewanella gelidimarina</i>	Gelo marinho, Prydz Bay	Bowman et al., 1997c
	<i>Sphingobacterium antarcticus</i>	Solo, Schirmacher Oasis	Shivaji et al., 1992
Fungos	<i>Cryptococcus antarcticus</i>	Solo, McMurdo Dry Valley	Vishniac e Baharaeen, 1982
	<i>Cryptococcus vishniacii</i>	Solo, McMurdo Dry Valley	Vishniac e Baharaeen, 1982
	<i>Friedmanniomyces* endolithicus</i>	Rochas	Onofri et al., 1999
Microalgas	<i>Eucampia antarctica</i>	Oceano austral	Hasle e Syvertsen, 1996
	<i>Hemichloris* antarctica</i>	Rochas, McMurdo Dry Valley	Tschermak-Woess e Friedmann, 1984
	<i>Polarella* glacialis</i>	McMurdo Sound	Montresor et al., 1999
	<i>Pseudopleurochloris* antarctica</i>	Banquisa, Ross Sea	Andreoli et al., 1999
	<i>Koliella antarctica</i>	Ross Sea	Andreoli et al., 1998
	<i>Pyramimonas gelidicola</i>	Lago e gelo marinho	McFadden et al., 1982
	<i>Thalassiosira antarctica</i>	Gelo à deriva	Hasle e Syvertsen, 1996
	<i>Thalassiothrix antarctica</i>	Oceano Austral	Hasle e Syvertsen, 1996
Protozoa	<i>Commation spp.</i>	Oceano Austral	Thomassen e Larsen, 1993
	<i>Euplotes antarcticus</i>	Gelo marinho, Weddell Sea	Fenchel e Lee, 1972
	<i>Kiitoksia kaloista</i>	Lago	Tong et al., 1997
	<i>Notodendrodes* antarctikos</i>	Sedimento, Ross Sea	De Laca et al., 1980
	<i>Spiroprorodon glacialis</i>	Gelo marinho, Weddell Sea	Fenchel e Lee, 1972

* gêneros, que até o momento, foram registrados apenas na Antártica.
 Fonte: (VINCENT, 2000).

Estudos de diversidade microbiana da Antártica são extremamente escassos. Em sua maioria cobrem a diversidade de algas em solo e lagos, poucos relatos em diversidade envolvendo fungos e rotíferos em lagos ou em solos associados aos musgos e líquens. As atividades microbianas foram estudadas através de medidas de respirometria e atividades enzimáticas. No entanto, são poucos os relatos sobre o isolamento de micro-organismos ou da estrutura de comunidade microbiana de bactérias e fungos (PIKUTA et al., 2007).

Desta forma, o presente projeto pretende avaliar a biodiversidade de fungos filamentosos lipolíticos presentes em diferentes amostras provenientes da Antártica por meio de isolamento e cultivo. Os resultados derivados deste estudo poderão trazer novos conhecimentos sobre as comunidades de fungos que habitam o ecossistema antártico. Em adição, os isolados serão utilizados em estudos de bioprospecção e serão depositados na Coleção Temática de Micro-organismos da Antártica associada à Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) onde ficará disponível para estudos futuros de exploração dos mecanismos de adaptação ao frio destes micro-organismos, busca por compostos de interesse biotecnológico, entre outros.

1.2 Taxonomia de fungos filamentosos

A identificação e classificação adequada dos fungos é crítica para o estudo de compostos com bioatividade. Sem a identificação e preservação adequada dos isolados, investigações biotecnológicas tornam-se difíceis, senão impossíveis de serem reproduzidas (BUGNI; IRELAND, 2004; DAS et al., 2006).

Historicamente os fungos são identificados e classificados primariamente a partir de caracteres morfológicos. Entretanto, atualmente, os micologistas empregam um diferente número de técnicas para auxiliar na identificação e sistemática. A morfologia ainda tem um importante papel na taxonomia, porém o uso de dados moleculares tem se tornado mais comum (BUGNI; IRELAND, 2004).

As fases sexuais e assexuais são precisamente a base da taxonomia e nomenclatura dos fungos (GUARRO et al., 1999). Estudos morfológicos que utilizam identificação baseada em caracteres sexuais (taxonomia convencional) podem apresentar dificuldades para serem realizados devido a vários motivos: a inabilidade de alguns fungos de crescer e esporular em meios de cultura; diferentes taxas de

esporulação; presença de formas desconhecidas do ciclo de vida e limitações na distinção de espécies com morfologias semelhantes (PANG ; MITCHELL, 2005).

As técnicas moleculares caracterizam os ácidos nucléicos presentes em todos os estágios do ciclo de vida do fungo, e desta forma não estão passíveis a muitos dos problemas associados com as técnicas baseadas em análises macro e microscópicas (DAS et al., 2006). Uma das técnicas moleculares mais empregadas na identificação e no estudo filogenético de fungos é o sequenciamento do DNA do operon ribossomal (Figura 1). Os genes DNAr18S e 28S e as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e IGS (Internal Gene Spacer) estão entre as regiões do operon ribossomal mais estudadas em fungos. Visto que as regiões ITS são consideravelmente divergentes entre si e variam entre as espécies de um mesmo gênero, as mesmas têm grande utilidade na taxonomia (BUGNI & IRELAND, 2004).

Figura 1 - Esquema representando o *operon* ribossomal dos fungos.

1.3 Bioprospecção de produtos de interesse biotecnológico por fungos da Antártica

A exploração da biodiversidade Antártica como fonte de potenciais agentes quimioterapêuticos, agroquímicos ou para obtenção de produtos biotecnológicos, é extremamente promissora, pois a escassez de conhecimento sobre a microbiota antártica pode propiciar a descoberta de novas espécies e novos compostos bioativos (FELLER; GERDAY, 2003). Ambientes extremos como o da Antártica, podem derivar micro-organismos psicrófilos de importância biotecnológica em diversos setores socioeconômicos, pois os micro-organismos adaptados ao frio são fontes potenciais de enzimas com atividade em baixas e médias temperaturas (JOSEPH et al., 2007).

Estes micro-organismos produzem enzimas capazes de suportar altos níveis de stress ambiental causado pelas baixas temperaturas que os cercam, como a redução das velocidades reacionais e o aumento da viscosidade do meio. Essa

adaptação dos micro-organismos é conseguida através de uma redução na energia de ativação de cada reação química catalisada por uma determinada enzima, levando a uma eficiência catalítica, que possivelmente é originada de um aumento na flexibilidade de uma determinada região da enzima, ou de sua estrutura total.

Esta flexibilidade é responsável pela fraca estabilidade térmica das enzimas adaptadas ao frio (FELLER; GERDAY, 2003; GERDAY et al., 1997). Neste sentido, trabalhos desenvolvidos nos ecossistemas antárticos objetivando a bioprospecção de metabólitos de possível aplicação industrial, farmacêutica e biotecnológica devem ser estimulados.

O conhecimento da diversidade fúngica e o potencial biotecnológico destes micro-organismos são de extrema relevância, e estratégico para o conhecimento da dinâmica dos ecossistemas antárticos e para a obtenção de substâncias bioativas. O fungo leveduriforme alcalofílico *Candida* antártica isolado de sedimentos do Lago Vanda apresenta grande potencial de exploração, como demonstrado por Raguenes et al. (1997).

A exploração de produtos a partir de organismos antárticos teve início nos projetos científicos focados em estudos de biodiversidade. São escassas as propostas voltadas diretamente para a bioprospecção e poucos são os produtos explorados comercialmente (FELLER; GERDAY, 2003). Um dos maiores problemas relacionados à exploração comercial de novos compostos pelas indústrias deve-se ao fato da ausência de conhecimento básico sobre os micro-organismos isolados. Assim, para que a indústria possa explorar com maior segurança e sem maiores prejuízos deveria haver um amplo investimento em pesquisa sobre as propriedades metabólicas e genéticas dos organismos alvo (FELLER; GERDAY, 2003).

O Brasil vem estimulando as atividades de pesquisas na Antártica objetivando geração de conhecimento e utilização dos organismos que habitam esses ecossistemas. O estabelecimento de um programa de prospecção biotecnológica de organismos marinhos e terrestres na região antártica, visando identificação de moléculas e material genético com potencial econômico foi uma diretriz prioritária do Plano de Ação (2007-2010) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). A descoberta de novos produtos a partir de micro-organismos psicrófilos tais como as glicoproteínas anticongelantes e enzimas tolerantes ao frio, novos antibióticos e antitumorais, agentes antioxidantes, entre outros, pode alavancar o desenvolvimento biotecnológico e movimentar a bioeconomia em diversos setores.

1.3.1 Propriedades, produção e aplicações das lipases

Lipases são enzimas hidrolíticas pertencentes ao grupo das serinas (E.C. 3.1.1.3) que agem em meios orgânico-aquosos, catalisando a clivagem de ligações do tipo éster em triglicerídeos, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. Entretanto, em meios com pouca disponibilidade de água, as lipases têm a capacidade de catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação de glicerídeos e fosfoglicerídeos, bem como de uma variedade de ligações do tipo éster não glicerídicas, sendo assim biocatalisadores bastante versáteis.

As características únicas das lipases incluem a especificidade de substrato, estereoespecificidade, regioespecificidade e a habilidade de catalisar reações heterogêneas na interface de sistemas solúveis e insolúveis em água (CAVALCANTI et al., 2005; CHOI et al., 2003; FERRER et al., 2000; HOUDE et al., 2004; JOSEPH et al., 2007; MAIA et al., 1999; SAVITHA et al., 2007).

Fungos filamentosos, especialmente os pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, são amplamente utilizados como fonte de lipases (FERRER et al., 2000; SAVITHA et al., 2007). As lipases fúngicas são preferidas por serem geralmente excretadas no meio extracelular, o que facilita a sua extração dos meios de fermentação, além de apresentarem maior estabilidade a variações de temperatura e pH e de serem ativas em solventes orgânicos (MAIA et al., 1999; SAXENA et al., 1999).

A demanda por enzimas industriais, particularmente as de origem microbiana, tem crescido incessantemente devido as suas aplicações em uma vasta gama de processos. Com a descoberta do potencial biocatalítico das lipases microbianas nas últimas duas décadas, estas enzimas têm se tornado um grande foco de estudos e utilização em reações químicas diversas. As lipases utilizadas industrialmente são geralmente pertencentes a uma classe especial de esterases que agem em gorduras e óleos, e os hidrolisam primariamente em glicerídeos e ácidos graxos, para então catalisar a hidrólise total em glicerol e ácidos graxos (CAVALCANTI et al., 2005; SAXENA et al., 1999).

Substratos típicos para a produção de lipases são: óleo vegetal, gordura de origem animal, óleo de peixes, azeite de oliva, gordura do leite e alguns triacilglicerídeos sintéticos como a trioleína. Entre as características desejáveis que as lipases comerciais precisam apresentar estão a tolerância a pH alcalino e a

termoestabilidade. A maioria das lipases reportadas até o momento são ativas em pH neutro (SAVITHA et al., 2007).

As lipases podem ser utilizadas em diversos setores industriais: a) Indústria alimentícia e de bebidas, onde são aplicadas para melhorar o sabor, aroma e aparência de alimentos, prolongar a conservação e até mesmo reduzir o teor de gorduras (CAVALCANTI et al., 2005; CHOI et al., 2003); b) Indústria química e farmacêutica, onde atuam como catalisadores de reações para obtenção de compostos e lipídeos específicos, na síntese de surfactantes, além da utilização como auxiliar em medicamentos para dietas (FERRER et al., 2000; HOUDE et al., 2004); c) Indústrias papéis e de couros, onde são utilizadas como catalisadores de reações de hidrólise (JOSEPH et al., 2007); d) Indústria de produtos de limpeza, onde atuam como coadjuvante em detergentes e sabões em pó (MAIA et al., 1999); e) Indústria de cosméticos, onde são utilizadas como emulsificante e agente umidificante; (SAVITHA et al., 2007; SAXENA et al., 1999).

Outra importante aplicação para as lipases de origem microbiana, e mais especificamente as de origem fúngica, está relacionada com a biodegradação de hidrocarbonetos, visto que estes, devido à dominância de produtos derivados de petróleo no mercado, constituem importantes fontes de contaminação de ecossistemas (ADEKUNLE; ADEBAMBO, 2007). Os inevitáveis derramamentos de petróleo decorrentes de operações de rotina e de forma acidental mantêm atualmente um grande interesse das pesquisas nessa área. A atenção tem sido voltada para os ecossistemas marinhos, pois estes são os maiores receptores de hidrocarbonetos poluentes (ATLAS, 1981; LEAHY; COLWELL, 1990). De acordo com Adekunle e Adebambo (2007) os fungos são mais eficientes na degradação de petróleo quando comparados com as bactérias utilizadas em técnicas tradicionais de biorremediação.

Levando-se em consideração que as lipases ativas em temperaturas frias estão amplamente distribuídas em micro-organismos que sobrevivem em temperaturas próximas a 5 °C (JOSEPH et al., 2007), o isolamento de fungos de ambiente antártico marinho com atividade lipolítica poderá representar uma vantagem biológica para a utilização em biorremediação de ambientes impactados com hidrocarbonetos do petróleo e em regiões de águas frias. Em adição, lipases ativas em baixas temperaturas oferecem novas oportunidades de exploração biotecnológica devido à alta atividade catalítica em baixas e médias temperaturas e

alto nível de flexibilidade (JOSEPH et al., 2007). Lipases psicrofílicas normalmente possuem grande flexibilidade de sua estrutura, o que permite sua aplicação em sistemas com baixo conteúdo de água, comportamento diferente pode ser apresentado pelas enzimas mesófilas ou termófilas, devido à rigidez de suas propriedades catalíticas (JOSEPH et al., 2008).

Seguem abaixo listados alguns exemplos de setores onde as lipases produzidas a baixas e médias temperaturas podem ser aplicadas (MARGESIN et al., 2008, 2010):

- a) indústria de detergentes e sabão em pó → remoção de manchas e sujeiras com redução de custo relacionado ao aquecimento da água de lavagem;
- b) indústria de alimentos → aceleração da produção de queijos de amadurecimento lento que requerem temperaturas e umidade baixas; modificação de grupos sulfidríla livres no processo de produção de farinha (30-35° C);
- c) setor ambiental → biorremediação de ambientes ou processos a baixas temperaturas.

1.3.2 *Influência do meio na produção de enzimas*

As numerosas variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) até às condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (BURKERT et al., 2003). Isto ocorre, segundo Borzani et al. (2001), devido à estrutura e a forma do sítio ativo da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica.

1.3.2.1 Influência do pH

Entre os parâmetros físicos-químicos, o pH do meio de crescimento desempenha uma função importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio, em certos casos, elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA et al., 2004).

1.3.2.2 Influência da temperatura

Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, causando a perda da estrutura nativa das enzimas por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. A desnaturação é causada pelo rompimento das ligações de hidrogênio, que são bastante termolábeis, desencadeando uma cascata de alterações estruturais. Para os micro-organismos mesófilos, a temperatura que provoca a desnaturação naturalmente varia para a cadeia proteica, mas, geralmente, está pouco acima da sua temperatura ótima (BORZANI et al., 2001). Entretanto, as enzimas psicrófilas são inativadas a temperaturas maiores do que a temperatura ótima para a catálise (FELLER; GERDAY, 2003).

1.3.2.3 Fonte de carbono

Numerosas fontes de carbono podem ser citadas para o cultivo de micro-organismos para a produção de enzimas, dentre elas, fontes sintéticas (glicose, maltose, glicerol) e fontes naturais (bagaço de cana, farelo de aveia, farelo de trigo, óleo de soja, óleo de pescado, óleo de oliva, óleo de girassol) (GOMBERT et al., 1999). As fontes de carbono parecem ser essenciais para a obtenção de um alto rendimento de lipases, no entanto alguns autores alcançaram bons rendimentos na ausência de gorduras e óleos, sendo estes substituídos por glicose e ácido oléico (SHARMA, 2001).

1.3.2.4 Fonte de nitrogênio

Segundo Becker et al. (1997), as fontes de nitrogênio já presentes no meio de cultura (dependendo dos compostos inseridos no meio) contêm algumas, senão todas as vitaminas necessárias para o metabolismo do micro-organismo. Porém, existem casos onde alguma vitamina ou uma suplementação é necessária para o crescimento celular.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho é parte dos projetos INCT Criosfera - CNPq (coordenado pelo Prof. Dr. Jefferson Simões - UFRGS) e *Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin*, BAMMBO – Comunidade Européia (coordenado pelo Dr. Daniel Walsh – Limerick Institute of Technology) e tem como objetivo principal avaliar a produção de lipases a baixa temperatura e a diversidade de fungos filamentosos isolados de amostras do ambiente Antártico.

2.1 Objetivos específicos

- Coleta de material biológico e isolamento de fungos filamentosos a partir de diferentes amostras de ambiente antártico (terrestres e marinhas);
- seleção de fungos produtores de lipases utilizando a triagem de alto desempenho (*High Throughput Screening* – HTS);
- seleção de linhagens lipolíticas representantes de grupos taxonômicos distintos por meio de técnica molecular (ARDRA – *Amplified Ribosomal Restriction Analysis*);
- produção e quantificação da atividade lipolítica pelo fungo filamentoso selecionado em diferentes condições de cultivo;
- caracterização taxonômica molecular das linhagens representantes de grupos taxonômicos distintos visando avaliação da diversidade de fungos filamentosos lipolíticos presente nas amostras estudadas.

3 METODOLOGIA

3.1 Isolamento de fungos filamentosos

Foram utilizados no presente projeto fungos filamentosos isolados a partir das seguintes amostras coletadas na Antártica:

- sedimentos marinhos coletados pela equipe da Dra. Vivian Pellizari (IO/USP) na Enseada Martel, Enseada McKellar, Estreito de Bransfield e Baía do Almirantado;
- solos de duas diferentes pinguineiras (Demay e Arctowski) coletados pelo Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA, Jaguariúna);
- amostras marinhas e terrestres (**Quadro 2**) coletadas na expedição de Março de 2010, no âmbito do Programa Antártico Brasileiro – PROANTAR.

Quadro 2 - Material coletado ao redor da Estação Antártica Comandante Ferraz

TIPO	LOCAL
Isópode	Punta Plaza
Nacella	EACF
Anfípode	Punta Plaza
Esponja	EACF
Ascídia	EACF
Salpa	Punta Plaza
Caramujo	EACF
Ouriço do mar	EACF
Estrela do Mar	EACF
Sedimentos	Punta Ulmann
	Refugio 2
	Botany Point
	EACF
Liquens	Punta Plaza
Algas	Punta Plaza
Madeira	Punta Plaza
Ossos de baleia	Punta Plaza
Solo de pinguineira	Demay
	Arctowski

Para o isolamento dos fungos filamentosos associados às amostras da Antártica foram utilizados os seguintes meios de cultivo suplementados com rifampicina (300 µg/mL): Extrato de Malte (MA: 20 g/l de extrato de malte, 15 g/l de ágar) e Agar Batata Dextrose (PDA: 200 g/l de batata, 20 g/l de dextrose, 15 g/l de ágar). As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e processadas logo após a coleta no módulo de química da Estação Antártica Comandante Ferraz.

Com o intuito de eliminar os micro-organismos presentes no exterior do material coletado, as amostras foram previamente lavadas com uma solução de água do mar estéril, com exceção das amostras de sedimentos marinhos. Em seguida, pequenos pedaços e/ou diluições das amostras foram plaqueados nos meios acima citados e as placas mantidas em incubadora a 15 °C e 25 °C por 30 dias. O crescimento dos fungos filamentosos foi monitorado a cada dois dias, onde as primeiras colônias que surgiram foram transferidas para novas placas contendo os meios específicos. Os isolados purificados foram preservados por dois métodos distintos:

- ultracongelamento a -80 °C: com o auxílio de um bisturi, blocos de ágar de 4 a 6 mm³ contendo os micélios fúngicos aderidos foram colocados em tubos contendo uma solução de glicerol 10% e preservados a -80 °C (HUNTER-CEVERA; BELT, 1996);
- Castellani: com o auxílio de um bisturi, blocos de ágar de 4 a 6 mm³ contendo os micélios fúngicos aderidos foram transferidos para tubos contendo água destilada esterilizada e preservados a 4 °C (CASTELLANI, 1939).

3.2 High throughput screening- HTS de lipase

Os fungos filamentosos isolados das amostras da antártica foram avaliados quanto à capacidade de produção de lipases utilizando um método de triagem de alto desempenho (*High-Throughput Screening* – HTS). Esta metodologia envolve a medida de fluorescência causada pela interação da rodamina B com os ácidos graxos liberados pela hidrólise enzimática do azeite de oliva.

Os fungos filamentosos foram previamente cultivados no mesmo meio utilizado para o isolamento sem adição de ágar e após o crescimento micelial (3-5 dias), 1,0 mL foi transferido para uma placa de 96 poços e utilizado como inóculo. Como os fungos filamentosos esporulados se desenvolvem rapidamente, um poço de cada lado do poço inoculado foi mantido vazio, permitindo a análise de 24 isolados por placa de 96 poços.

Com auxílio de um replicador os fungos foram inoculados na superfície de uma placa de Petri (grande) contendo meio TM (em g/L: glicose, 3,0; extrato de levedura, 0,5; peptona, 1,0; K₂HPO₄, 1,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; FeSO₄.7H₂O, 0,01; ágar, 15,0) adicionado de azeite de oliva (31,25 ml/L) e solução de rodamina B 0,001% v/v (10 ml/L). A leitura das placas foi feita após 72 horas de incubação a 15 °C. A produção de lipase foi então detectada pela irradiação das placas com luz UV 366 nm. Nas culturas que apresentaram atividade lipolítica positiva, foi observada a formação de halo fluorescente na cor laranja ao redor das colônias.

3.3 Confirmação da produção de lipase

Os isolados que apresentaram resultados positivos de produção de lipase no teste HTS foram avaliados individualmente nas mesmas condições para confirmação dos resultados. Para tanto, os fungos foram reativados em meio PDA e cilindros de cinco mm de diâmetro do meio de cultura contendo o micélio fúngico aderido foram inoculados em placas de Petri contendo meio TM adicionado de azeite de oliva e rodamina B (mesmo meio utilizado na seção 5.3.). Após incubação por 72h a 15 °C o resultado foi visualizado por meio de irradiação das placas com luz UV 366 nm, sendo consideradas positivas as culturas que apresentaram fluorescência na cor laranja ao redor das colônias.

3.4 Avaliação de polimorfismo genético: método de ARDRA

O *fingerprinting* genético dos fungos lipolíticos foi realizado através da restrição enzimática de seqüências de DNA do *operon* ribossomal (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* - ARDRA). Após o crescimento de cada linhagem em meio líquido Sabouraud Dextrose (*Sabouraud Dextrose* - SDB) durante 3 a 5 dias, o DNA genômico foi extraído segundo a metodologia apresentada por

Raeder e Broda (1985): O micélio foi transferido para um tubo de Eppendorf de 1,5 ml e lavado. Após o processo de lavagem e homogeneização o material foi suspenso em 600 ml de tampão de extração (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi retirado da amostra com o auxílio de uma pipeta e adicionado igual volume (600 ml) de fenol equilibrado, misturado e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado novamente e adicionado a ele 600 ml de clorofórmio, o material foi misturado e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo Eppendorf estéril e adicionado uma mistura de fenol-clorofórmio 1:1, sendo 350 ml de fenol e 350 ml de clorofórmio, misturado e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo Eppendorf estéril e adicionado um volume igual ao da amostra retirada de clorofórmio, misturado e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf e adicionado a ela 0,6 volume de isopropanol, o material foi homogeneizado e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. O pellet foi lavado com 50 ml de etanol 70% (gelado) e o tubo foi vertido em papel toalha por 10 minutos para secar. O pellet seco foi suspenso em 50 ml de água Mili-Q gelada e 1 ul de RNase foi adicionado seguido de incubação por 1 hora a 37 °C, visando a digestão de RNA.

Os resultados das extrações foram visualizados por eletroforese em géis de agarose 0,8% (120V, 500 mA, 40 minutos), corados com brometo de etídeo (1 $\mu\text{L} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) e fotodocumentados pelo sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System). As concentrações de DNA foram estimadas pela comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ).

A amplificação das regiões ITS1-5, 8S-ITS2 e/ou D1/D2 foi realizada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras, com a utilização de primers complementares a regiões conservadas do *operon* ribossomal do grupo dos fungos. Os produtos amplificados passaram por digestão pelas enzimas de restrição *MspI*, *HaeIII*, *HhaI* e os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 2,5% (120V, 500 mA, 150 minutos). Os géis foram fotodocumentados e analisados visualmente e um representante de cada ribotipo distinto foi submetido à caracterização taxonômica molecular.

3.5 Taxonomia molecular - sequenciamento e análise filogenética

A identificação molecular dos ribotipos distintos foi realizada por meio da análise das seqüências de DNA do *operon* ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2). A extração e amplificação do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente (seção 3.4). Os produtos de amplificação foram purificados em minicolumnas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e seqüenciados em seqüenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o *kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare).

As seqüências da região ITS1-ITS2 e/ou D1/D2 obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* e comparadas com as seqüências dessa mesma região do *operon* ribossomal de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>). Seqüências de organismos relacionados à seqüência do organismo alvo foram recuperadas do GenBank para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007), onde o modelo de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo *neighbor-joining* (NJ) foi utilizado para as reconstruções filogenéticas, com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 replicatas.

3.6 Atividade lipolítica

Após o crescimento dos fungos nos meios sólidos contendo rodamina B e óleo de oliva como fonte de carbono por 48-96h, foram retirados dois cilindros de 5 mm em diâmetro da margem das colônias e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 150 mL contendo 50 mL do meio descrito por Savitha et al. (2007) (composição em g/L: KH₂PO₄, 7.0; Na₂HPO₄, 2.0; MgSO₄.7H₂O, 1.5; extrato de levedura, 1.0;

CaCl₂.2H₂O, 0.1; FeCl₂.4H₂O, 0.008; ZnSO₄.7H₂O, 0.0001; tartarato de amônia, 1.5; pH 6.0).

As culturas foram incubadas durante 7 dias sob agitação de 150 rpm a 15 °C. Após incubação, as culturas foram filtradas e o filtrado utilizado para a quantificação da atividade lipolítica.

3.6.1 Quantificação da atividade lipolítica

A atividade de lipase foi determinada conforme proposto por Yang et al. (2002), utilizando o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (pNPP). A hidrólise do pNPP foi determinada descontinuamente, a 37 °C, acompanhando a liberação do íon p-nitrofenolato. O substrato pNPP foi solubilizado em 500 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluído com 19,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 mM, pH 8,0, contendo 0,5% de Triton X-100. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL do sobrenadante livre de células, diluído convenientemente, a 900 µL de meio reacional, mantido a 37 °C. A reação foi interrompida por choque térmico a 90 °C por 1 minuto em banho Maria, seguida pela adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio (Na₂B₄O₇·10H₂O). O branco da reação correspondeu ao meio de cultivo sem o inóculo que apresentou uma absorbância média de 0,017 nm. Controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. O p-nitrofenol liberado foi determinado pela leitura de absorbância a 405 nm. A curva padrão foi construída com a utilização de p-nitrofenol (0,4 a 16,0 µmoles) (Figura 2).

Figura 2 - Curva padrão utilizando *p*-Nitrofenol (0,4 a 16,0 µmoles) a 405 nm.

Uma unidade de lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por mL por minuto nas condições descritas. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a fórmula geral:

$$U/L = [\text{Abs}/\epsilon \times 1/VE \times 1/tR \times DF \times 1000]$$

Onde:

- **U/L** é a unidade de atividade enzimática, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;
- **Abs** é a absorvância a λ (nm);
- ϵ é o coeficiente de extinção molar (mg.mL^{-1});
- **VE** é o volume de enzima utilizado no ensaio (mL);
- **tR** é o tempo de reação (minutos);
- **DF** é o fator de diluição e
- **1000** é o fator de conversão de M para $\mu\text{mol/mL}$.

3.6.2 Otimização das condições de cultivo para produção de lipase

A otimização das condições do meio de cultivo foi realizada pela metodologia do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* - P&B (PLACKETT ; BURMAN, 1946) e posteriormente através do planejamento fatorial fracionado e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) por meio do software STATISTICA 7.0 (2325 13th Street Oriente, Tulsa, OK, 74 104, EUA). Foram estipuladas para a seleção inicial no P&B as variáveis extrato de levedura (fonte de nitrogênio), Azeite de Oliva, Óleo de Soja e Óleo de Girassol (fontes de carbono) e o pH, um importante fator na aplicação biotecnológica da lipase nas quantidades listadas na Quadro 3.

Quadro 3 - Variáveis estudadas e níveis do P&B

Variáveis	-1	0	1
PH	6	7	8
Oliva	0%	1%	2%
Girassol	0%	1%	2%
Soja	0%	1%	2%
Extr. De Lev.	0%	1,5%	3%

Os valores das variáveis utilizadas no DCCR 2³ estão apresentados no Quadro 4. Foram avaliados neste ensaio 3 diferentes variáveis com adição de três pontos centrais, totalizando 17 ensaios. Estes experimentos foram realizados visando obtenção de um modelo de segunda ordem, para prever a atividade lipolítica em funções das diferentes variáveis estudadas. Todos os experimentos foram realizados em um estudo randomizado sendo as distâncias dos pontos centrais calculadas pela equação:

$$\alpha = (2^2)^{1/4} \text{ ou } \alpha = (2^3)^{1/4}$$

Onde α é a distância dos pontos axiais e n o número de variáveis independentes.

Quadro 4 - Variáveis estudadas e níveis do Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR (%).

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
Soja	2,00%	2,21%	2,50%	2,79%	3,00%
Girassol	2,00%	2,21%	2,50%	2,79%	3,00%
Extr. de Levedura	3,00%	3,21%	3,50%	3,79%	4,00%

Os dados foram tratados com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (2325 13th Street Oriente, Tulsa, OK, 74 104, EUA). A qualidade do ajuste da equação do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 , e sua significância estatística foi determinada pelo teste F (análise de variância - ANOVA).

3.6.3 *Determinação da atividade lipolítica específica*

A atividade específica da enzima foi determinada por meio da divisão da atividade específica da enzima (3.6.1) pela atividade de proteínas totais (item 3.6.3.1). Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

3.6.3.1 Dosagem de proteínas totais

Os sobrenadantes (extratos enzimáticos) obtidos após a validação da repetição do ensaio que apresentou a maior atividade foram utilizados para a dosagem de proteínas de acordo com o método de Bradford (1976), o qual é baseado na interação entre o corante Coomassie brilliant blue BG250 (Merck, Alemanha) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm (COMPTON; JONES, 1985).

Para a preparação do reagente de proteína dissolveu-se 100 mg de Coomassie brilliant blue BG250 em 50 mL de etanol 95%. A essa solução adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil) e a solução final foi diluída em volume de 1 L e o reagente foi então filtrado com papel de filtro.

Para elaborar a curva padrão (Figura 3) foi utilizada a solução estoque de soro de albumina bovina (BSA, Sigma, EUA) numa concentração de 1 mg/mL de água destilada esterilizada. Foram pipetados volumes de 10, 20, 40, 60, 80, e 100 μ L da solução padrão de BSA em tubos de ensaio, completando-se com água destilada até 100 μ L. Em seguida, adicionou-se 5 mL do reagente de proteína a cada tubo de ensaio que foi agitado em vórtex. As amostras foram transferidas para cubetas e a absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UVmini - 1240) entre 2 minutos e 1 h após a agitação contra um branco preparado

com 100 µL de água destilada esterilizada e 5 mL de reagente de proteína. Para a dosagem proteica foi utilizado 100 µL do extrato enzimático.

A curva padrão usando a solução estoque de BSA é apresentada no gráfico da Figura 3. O gráfico também apresenta a linha de tendência com a equação da reta e o coeficiente de correlação. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada dia da leitura: 3, 5, 7 e 9 dias.

Figura 3 - Curva padrão para dosagem de proteínas.

3.7 Quantificação da biomassa

O crescimento dos isolados foi quantificado em termos de peso seco micelial (mg) por mL de meio de cultura. Os cultivos submersos foram precipitados por meio de centrifugação por 15 min a 12857 G (10.000 rpm). O extrato enzimático foi filtrado em papel filtro. O micélio foi lavado com água destilada e determinado gravimetricamente (80 °C até peso constante) (MIRANDA et al., 1999). A massa micelial foi calculada pela diferença entre o peso seco total e o peso seco do papel de filtro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta, isolamento e preservação de fungos filamentosos

As amostras de sedimentos marinhos utilizadas no presente trabalho para o isolamento dos fungos filamentosos coletadas pela equipe da Dra. Vivian Pellizari (IO/USP) na Enseada Martel, Enseada McKellar, Estreito de Bransfield e Baía do Almirantado resultou na obtenção de sete isolados de fungos filamentosos. No caso dos solos de duas diferentes pinguineiras (Demay e Arctowski) coletados pelo Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA, Jaguariúna) foram obtidos 19 isolados.

Em adição, a coleta de amostras marinhas e terrestres (Tabela 2) durante a expedição para a Antártica em março de 2010 no âmbito do Programa Antártico Brasileiro – PROANTAR resultou na obtenção de 227 fungos filamentosos. As coletas foram realizadas na Baía do Almirantado (62°09'S, 58°28'W) localizada no Arquipélago Shetland do Sul em uma área de aproximadamente 131km² e os locais de coleta escolhidos foram Ponta Plaza, Arctowski, EACF, Ponta Ulmann, Refugio 2 e Botany Point (triângulos vermelhos da Figura 4).

Figura 4 - Mapa da Baía do Almirantado, Ilha rei Jorge, Península Antártica. O símbolo (▲) indica o local de coleta das amostras.

Um total de 253 isolados foi recuperado a partir das amostras coletadas pelo nosso grupo de pesquisa no continente Antártico em março de 2010 e das amostras cedidas pela Dra. Vivian Pellizari (IO/USP) e pelo Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA, Jaguariúna).

Durante o isolamento a temperatura de crescimento foi considerada um fator relevante, pois a grande maioria se desenvolveu a 15 °C e apenas uma minoria se desenvolveu quando incubados a 25 °C. Quanto aos meios utilizados para a recuperação dos micro-organismos a partir das amostras marinhas e terrestres da Antártica o meio PDA propiciou o melhor crescimento e isolamento dos fungos. Para o meio Extrato de malte (MA) poucos fungos conseguiram se desenvolver, apresentando crescimento muito baixo nas condições utilizadas para o isolamento.

As amostras coletadas em ambiente marinho derivaram o maior número de isolados (63%) em comparação as amostras terrestres (37%) (Figura 5). Cabe ressaltar que um maior número de amostras marinhas foi utilizado para o isolamento dos fungos filamentosos.

Figura 5 - Porcentagem de fungos filamentosos isolados a partir de ambientes antárticos marinhos e terrestres.

4.2 Seleção de fungos lipolíticos por triagem de alto desempenho (HTS)

Dentre os 253 fungos filamentosos recuperados das amostras da Antártica e submetidos ao experimento de triagem de alto desempenho em placa de 96 poços contendo 24 inóculos por placa, 72 apresentaram resultado positivo para lipase (Figura 6). Destes, 68 (21%) tiveram atividade lipolítica confirmada quando avaliados individualmente (Figuras 7 e 8).

Estes resultados demonstram a possibilidade de ocorrência de falsos positivos devido à esporulação excessiva de alguns fungos, contaminando áreas correspondentes a outros isolados estudados, confirmando a necessidade de realizar ensaios adicionais individuais.

Figura 6 - HTS utilizado para seleção de fungos filamentosos lipolíticos após 72 horas de incubação a 15°C em meio TM modificado + Rodamina B + azeite de oliva.

Figura 7 - Confirmação do resultado positivo da produção de lipase no teste individualizado após 72 horas de incubação a 15 °C em meio TM modificado + Rodamina B + azeite de oliva.

A produção de lipases por fungos derivados de ecossistemas Antárticos pode estar associada aos mecanismos de tolerância ao frio que vem sendo discutidos em literatura (CROWE et al., 1992; MARGESIN, 2008; RUSSELL, 1990). Em ambientes de baixas temperaturas o congelamento e/ou desidratação das células pode ser causado pela transição de lipídios da membrana do estado líquido para a fase gel (CROWE et al., 1987). Portanto, a manutenção da fluidez da parede celular é

essencial para a sobrevivência e pode ser alcançada mediante o aumento do grau de insaturação de ácidos graxos. Em adição, a produção de compostos crioprotetores como o glicerol e a trealose tem sido também reportado como um dos mecanismos de adaptação celular ao frio (BRADNER, 2003; MARGESIN, 2008). Frente a estas afirmações, podemos concluir a importância da atividade lipolítica nos mecanismos de adaptação ao frio, visto que a lipase é a enzima que catalisa a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos.

Figura 8 - Resultados positivos no teste de confirmação da produção de lipase

4.3 Fingerprinting Genético – ARDRA

As análises de *fingerprinting* genético pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) utilizando três enzimas de restrição (*HaeIII*, *HhaI* e *MspI*) foram aplicadas com o objetivo de identificação de grupos taxonômicos distintos entre os 68 fungos lipolíticos da Antártica. Um total de 18 ribotipos diferentes foi obtido a partir dos isolados estudados (Tabela 5).

Um representante de cada ribotipo distinto foi submetido ao sequenciamento e análise filogenética visando: 1) o conhecimento da diversidade de fungos lipolíticos nas amostras terrestres e marinhas da Antártica (seção 4.4) e 2) a quantificação da atividade lipolítica (seção 4.5)

Quadro 5 - Ribotipos distintos obtidos dos fungos filamentosos isolados até o momento.

(continua)

Código	MspI	HaeIII	HhaI	Ribotipo
Amf1	A	A	A	1
E2	A	A	A	1
E2-1	A	A	A	1
E2a	A	A	A	1
E2-c	A	A	A	1
E3	A	A	A	1
Is2	A	A	A	1
L1-12	A	A	A	1
L1-25	A	A	A	1
Is1b	B	B	B	2
N1b	B	B	B	2
N1b1	B	B	B	2
S2	C	C	C	3
S3	C	C	C	3
C2	D	D	D	4
E2b	D	D	D	4
Is4	D	D	D	4
L1-23	D	D	D	4
L1-4	D	D	D	4
N5	D	D	D	4
A1-1a	E	E	E	5
E4a	E	E	E	5
E4b	E	E	E	5
N2-1c	E	E	E	5
N2a	E	E	E	5
N2c	E	E	E	5
N2e	E	E	E	5
A11-1b	C	G	E	6
ITA-3E	C	G	E	6
L1-8	C	G	E	6
L1-9	C	G	E	6
S4	C	G	E	6
S4a	C	G	E	6
S6	C	G	E	6
ITA-3G	F	F	C	7
ITA-2C	F	F	C	7
ITA-E	F	F	C	7
P.U-1	G	H	F	8
L1-1	H	H	G	9
L1-10	H	H	G	9
L1-11	H	H	G	9
L1-2	H	H	G	9

L1-3	H	H	G	9
Is1a	I	I	I	10
L1-24	I	I	I	10
L1-13	I	J	J	11
L1-22	I	J	J	11
OB-1a	I	J	J	12
OB-2	I	J	J	12
OB-5a	I	J	J	12
Ob-7a	I	J	J	12
L1-14	L	G	E	13
L1-15	L	G	E	13
L1-16	L	G	E	13
L1-7	L	G	E	13
S1a	L	G	E	13
S1-b	L	G	E	13
SD1a	L	G	E	13
SD1b	L	G	E	13
L1-5	M	G	H	14
L1-6	M	G	H	14
L1-17	M	N	I	15
L1-18	M	N	I	15
L1-19	N	J	J	16
L1-20	N	J	J	16
L1-21	N	J	J	16
E4	O	O	H	17
E1-1	M	O	H	18

4.4 Diversidade de fungos lipolíticos

A grande maioria dos fungos lipolíticos recuperados das amostras da Antártica no presente trabalho pertence ao filo Ascomycota (88,23%), sendo 10,29% afiliado ao filo Zygomycota (ordem Mucorales) e 1,47% ao filo Basidiomycota.

Os dados derivados das análises de seqüenciamento e filogenia (Tabela 6 e Figuras 9 e 10) permitiram identificar os fungos lipolíticos da Antártica como pertencentes aos gêneros *Geomyces* (ribotipo 2, n=3; ribotipo 3, n=2; ribotipo 5, n=7, ribotipo 6, n=7 e ribotipo 13, n=8), *Penicillium* (ribotipo 1, n=9; ribotipo 4, n=6; e ribotipo 10, n=2), *Cosmospora* (ribotipo 12, n=4), *Thelebolus* (ribotipo 7, n=3), *Chaetomium* (ribotipo 16, n=3), *Hypocrea/Trichoderma* (ribotipo 11, n=2), *Antarctomyces* (ribotipo 14, n=2), *Mortierella* (ribotipo 15, n=2), *Cadophora* (ribotipo 17, n=1 e ribotipo 18, n=1) (Ascomycota). Em adição, o ribotipo 9 foi caracterizado

como pertencente à ordem Mucorales (n=5) (Zygomycota) e o ribotipo 8 como pertencente à ordem Atheliales (n=1) (Basidiomycota).

Figura 9 - Árvore filogenética da região D1/D2 do gene DNAr 28S dos fungos filamentosos lipolíticos representantes e ribotipos distintos. (Modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1,000 replicatas)

Figura 10 - Árvore filogenética da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr dos fungos filamentosos lipolíticos representantes e ribotipos distintos. (Modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1,000 replicatas)

Quadro 6 - Identificação molecular dos representantes de ribotipos distintos.

Ribotipo	D1/D2 Sequências mais próximas – BLASTn (n° de acesso GenBank)	% similaridade	ITS Sequências mais próximas – BLASTn (n° de acesso GenBank)	% similaridade	ID molecular
1	<i>Penicillium camembertii</i> CBS 303.48 (AF033474) <i>Penicillium commune</i> CBS 311.48 (AY213616) <i>Penicillium cavernicola</i> CBS 100540 (JQ434692)	99 99 99	NS		<i>Penicillium</i> sp.
2	<i>Geomyces pannorum</i> UAMH10473 (GU951697) <i>Geomyces</i> sp. R-4246 (FJ977925) <i>Geomyces destructans</i> MYC80251 (GU951681)	99 99 99	NS		<i>Geomyces</i> sp.
3	<i>Geomyces pannorum</i> UAMH10473 (GU951697) <i>Geomyces</i> sp. R-4246 (FJ977925) <i>Geomyces destructans</i> MYC80251 (GU951681)	99 99 99	NS		<i>Geomyces</i> sp.
4	<i>Penicillium glabrum</i> NRRL 35684 (EF200097) <i>Penicillium purpurescens</i> NRRL 720 (AF033408)	99 99	NS		<i>Penicillium</i> sp.
5	<i>Geomyces pannorum</i> UAMH733 (GU951689) <i>Geomyces</i> sp. 798_2_CP02 (AB470574) <i>Geomyces</i> sp. FMCC-4 (DQ520622)	100 100 100	NS		<i>Geomyces</i> sp.
6	<i>Geomyces pannorum</i> UAMH733 (GU951689) <i>Geomyces</i> sp. FMCC-4 (DQ520622)	99 99	<i>Geomyces</i> sp. BC7 (DQ317337) <i>Geomyces pannorum</i> VKM FW-2236 (DQ189228)	100 99	<i>Geomyces</i> sp.
7	<i>Thelebolus ellipsoideus</i> AFTOL-ID 5005 (FJ176895) <i>Thelebolus globosus</i> AFTOL-ID 5016 (FJ176905)	100 100			<i>Thelebolus</i> sp.
8	<i>Athelia rolfsii</i> AFTOL-ID 664 (AY635773) <i>Athelia rolfsii</i> ATCC 201126 (AF499019) <i>Sclerotium coffeicola</i> CBS 521.92 (FJ212345) <i>Sclerotium delphinii</i> ATCC 15200 9 FJ212326)	97 97 96 96			<i>Athelia</i> sp.
9	<i>Mucor flavus</i> CBMAI 1355 (JN903561) <i>Mucor flavus</i> DSMZ 2184 (EU071390) <i>Thamnidium elegans</i> NRRL 2467 (AF157217)	99 99 98			<i>Mucor</i> sp.
10	<i>Penicillium commune</i> CBS 311.48 (AY213616) <i>Penicillium cavernicola</i> CBS 100540 (JQ434692) <i>Penicillium camembertii</i> CBS 303.48 (AF033474)	100 100 100			<i>Penicillium</i> sp.
11	NS		<i>Hypocrea pachybasoides</i> CBS898.72 (AF501333) <i>Hypocrea</i> sp. IMI 206039 (EU294196) <i>Trichoderma polysporum</i> CBS 820.68 (Z48815)	99 99 99	<i>Trichoderma</i> sp.
12	NS		<i>Cosmospora</i> sp. GJS 10247 (JN995629) <i>Nectria flavoviridis</i> BBA 65542 (HQ897791) <i>Cosmospora coccinea</i> CBS 341.70 (HQ897827)	99 98 97	
13	NS		<i>Geomyces pannorum</i> VKM FW-1103 (DQ189226) <i>Geomyces</i> sp. LBC-2012 (JX171173)	100 99	<i>Geomyces</i> sp.
14	NS		<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> PI-WI-1 (GU004189) <i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> UFMGCB 2625 (FJ911878)	100 100	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>

15	NS		<i>Mortierella</i> sp. GW20-2 (JQ670951) <i>Mortierella fimbricystis</i> CBS 943.70 (GU559986)	97 95	<i>Mortierella</i> sp.
16	NS		<i>Chaetomium madrasense</i> C36 (HM365252) <i>Chaetomidium pilosum</i> CBS 335.67 (JN573177) <i>Chaetomium globosum</i> DAOM 221179 (JN942918)	100 99 99	<i>Chaetomium</i> sp.
17	NS		<i>Cadophora malorum</i> 7R73 (GU212434) <i>Cadophora malorum</i> CBS 687.96 (GU128592)	100 99	<i>Cadophora</i> sp.
18	NS		<i>Cadophora malorum</i> 7R73 (GU212434) <i>Cadophora malorum</i> CBS 687.96 (GU128592)	99 99	<i>Cadophora</i> sp.

NS = Não Sequenciado

Representantes do gênero *Geomyces* (n=27 isolados) foram os isolados em maior abundância, seguido pelos representantes do gênero *Penicillium* (n=17), *Mucorales* (n=5), sendo os demais gêneros isolados em quantidade menor ou igual a 4 (Figura 11). Dentre os isolados representantes do gênero *Geomyces*, 21 são de origem marinha e seis de origem terrestre. Para o grupo dos *Penicillium*, 12 são de origem marinha e cinco terrestre e para os *Mucorales* todos são de origem terrestre.

Figura 11 - Abundância dos táxons de fungos lipolíticos isolados das amostras da Antártica.

Dentre os Ascomycota identificados no presente trabalho, o gênero *Geomyces* apresenta características queratinolíticas e psicrófilicas e tem uma distribuição uniforme nas regiões Ártica e na Antártica (MERCANTINI et al., 1989). Este gênero é halotolerante (POOLE; PRICE, 1971) e moderadamente celulolítico (KUTHUBUTHEEN; PUGH, 1979), com capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono (ARENZ et al., 2006). Os representantes do gênero *Geomyces* caracterizados no presente trabalho foram recuperados de amostras do continente Antártico marinhas (isópode, *Nacella*, *Salpa*, alga, estrela do mar e sedimento) e terrestres (solo de pinguineira e líquens) (Tabela 6).

Os gêneros *Penicillium* e *Trichoderma* (anamórfico de *Hypodrea*) são cosmopolitas e podem ser encontrados em quase todos os lugares, dos trópicos aos pólos, tanto no solo, quanto no ar e na água, incluindo o ambiente marinho

(DOMSCH; GAMS, 1993; HARAN et al., 1996; MENEZES et al., 2010). Representantes do gênero *Trichoderma* podem produzir e secretar diversas enzimas extracelulares de importância econômica (SIVAN; CHET, 1989). No presente trabalho, os ribotipos identificados como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma/Hypocrea* foram recuperados de amostras marinhas (anfípode, isópode, *Nacella* e estrela do mar) e terrestres (líquens).

Representantes do gênero *Cadophora* são conhecidos como degradadores e foram reportados como decompositores de madeiras da Antártida (ARENZ et al., 2006). A predominância destes fungos em vários locais na Antártica sugere que eles sejam endêmicos (BLANCHETTE et al., 2004a, b). No presente trabalho, representantes deste gênero foram recuperados apenas de amostras de estrela do mar. O gênero *Antarctomyces* é também endêmico da região Antártica e composto por uma única espécie, *Antarctomyces psychotrophicus* (STCHIGEL et al., 2001). Representantes deste gênero foram isolados apenas de amostras de líquens (Quadro 6).

Representantes do gênero *Thelebolus* têm sido frequentemente isolados no Ártico e zonas climáticas da Antártica. No presente trabalho, fungos pertencentes a este gênero foram isolados a partir de amostras de solo de pinguineira (Tabela 6). Em um estudo sobre a diversidade de fungos em lagos antárticos realizadas por de Hoog et al. (2005) revelaram que *T. microsporus* foi uma das espécies mais abundantes. Em adição, *Thelebolus* foi o gênero predominante encontrado por Brunati et al. (2009) em sedimentos bentônicos de lagos da Antártica.

O gênero *Chaetomium* está associado à degradação de madeira e atividade celulolítica (NILSSON, 1973). Isolados de *Chaetomium globosum* foram encontrados associados a madeiras de cabanas históricas de Cabo Royds na Antártica (BLANCHETTE et al., 2010). Representantes deste gênero foram recuperados no presente trabalho a partir de amostras de líquens (Tabela 6).

Cosmospora (Nectria) é um gênero de fungo encontrado frequentemente em árvores de madeira de lei e arbustos lenhosos em todas as regiões temperadas do Hemisfério Norte, considerado como agente patogênico de plantas e patógenos de insetos (SINCLAIR; LYON 2005). Isolados de *Cosmospora villor* foram detectados em lagos da Antártica (GONÇALVES et al., 2012). No presente trabalho, representantes deste gênero foram recuperados de amostras de osso de baleia (Quadro 6).

Quanto aos representantes dos Zygomycota, a ordem Mucorales é constituída por um grupo de micro-organismos capazes de produzir enzimas de interesse industrial, tais como amilases, pectinases, proteases e lipases (NIELSEN; OXENBOLL, 1998). No entanto, apenas as espécies *Mucor miehei*, *M. javanicus*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis* e *M. racemosus* têm sido relatadas como produtores de lipase (SHARMA et al., 2001). Em adição, o gênero *Mortierella* (ordem *Mortierellales*) é frequentemente encontrado em solos, dentro da (HIBBETT; ZHANG, 2007) e algumas espécies desse gênero foram descritas como produtoras de quantidades excepcionalmente elevadas de ácido araquidônico (NISHA; VENKATESWARAN 2009). Na Antártica, espécies de *Mortierella* têm sido detectados em solos (BRIDGE; NEWSHAM, 2009), lagos (GONÇALVES et al., 2012) e associada à musgos (TOSI et al., 2002). No presente trabalho representantes desse gênero foram isolados de amostras de líquens (Quadro 6).

O filo Basidiomycota foi representado por apenas um isolado (ribotipo 8) recuperado de sedimento marinho (Punta Ulman), que apresentou 97-96% de similaridade de sequência com fungos representantes dos gêneros *Sclerotium* e *Athelia* (Tabela 6), demonstrando na árvore filogenética estar próximo a esses gêneros (Figura 9), mas com certa distância evolutiva. Este resultado pode ser indicativo de uma nova espécie. Estudos adicionais de taxonomia polifásica devem ser conduzidos para a confirmação da hipótese da espécie nova. A primeira espécie de fungo descrita proveniente da Antártica foi o *Sclerotium antarcticum* (BOMMER; ROUSEAN, 1905), encontrado durante a expedição antártica belga.

Cabe ressaltar que, os isolados representantes de grupos taxonômicos distintos (ribotipos distintos), que foram submetidos ao sequenciamento e análises filogenéticas estão sendo depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e no Centro de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

4.5 Quantificação da produção de lipase

Dentre os 11 fungos filamentosos representantes de ribotipos distintos submetidos aos experimentos de quantificação da atividade lipolítica, um apresentou atividade de lipase superior a 10 U/L frente ao substrato sintético p-Nitrofenil Palmitato (Figura 12) e foi selecionado para os experimentos subsequentes de

avaliação de diferentes fatores e otimização da produção enzimática utilizando o desenho experimental.

Figura 12 - Quantificação enzimática dos ribotipos com maior produção de lipase.

O fungo selecionado (linhagem AL1-1B) foi identificado por taxonomia molecular e convencional como pertencente à espécie *Geomyces pannorum* (APÊNDICE).

4.6 Otimização da produção de lipase pelo planejamento fatorial fracionado

Visando o aumento da atividade lipolítica a avaliação das condições físico-químicas do processo pode ser considerada como um fator relevante. Neste sentido, o uso de abordagens estatísticas foi empregado para a otimização da produção enzimática do fungo *Geomyces pannorum* AL1-1B, recuperado a partir da macroalga da região Antártica *Palmaria decipiens*. A estratégia utilizada inicialmente foi a da realização de um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (P&B) que permite a avaliação de um número maior de variáveis, com redução no número de ensaios. Os fatores relevantes na produção de lipase são diversos, sendo destacados a composição do meio de fermentação, aeração, agitação, pH do meio de fermentação, temperatura, etc. Esta abordagem é interessante uma vez que avalia as variáveis independentemente além do efeito sinérgico entre elas.

Atualmente diversas fontes de carbono são estudadas e como as informações relacionadas com a produção de lipases pelo gênero *Geomyces* são escassas (LOPERENA et al., 2012).

Pesquisas demonstraram que culturas de *Geomyces pannorum* isoladas de diferentes ambientes extremos podem apresentar diferenças em sua morfologia e fisiologia. De fato, os limites de adaptação ao frio em um isolado particular podem variar dependendo da fonte de isolamento, embora os isolados sejam geneticamente idênticos (KOCHKINA et al., 2007). Por exemplo, representantes do gênero *Geomyces* demonstraram alterar a composição e o teor total de ácidos graxos, dependendo da temperatura de crescimento (FINOTTI et al., 1996). A quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e o índice de insaturação total aumentou quando os fungos foram incubados a 5 °C (WEINSTEIN et al., 2000).

Estudos sugerem que um mecanismo bioquímico de tolerância a baixa temperatura é alcançado através da alteração da composição e do teor total dos ácidos graxos em sua membrana (FINOTTI et al., 1993; WEINSTEIN et al., 2000), o que poderia estar relacionado com a produção e atuação das lipases.

De acordo com a literatura, o uso de óleos vegetais para a produção de lipases constitui uma alternativa de baixo custo (BECKER et al., 1997; CARLILE; WATKINSON, 1997; GUPTA et al., 2004; SAXENA et al., 2003). Desta forma, foram estipuladas para a seleção inicial as variáveis: extrato de levedura (fonte de nitrogênio), Azeite de Oliva, Óleo de Soja e Óleo de Girassol (fontes de carbono) e o pH, um importante fator na aplicação biotecnológica da lipase.

Os valores centrais das variáveis (Tabela 3) são os valores padrões utilizados na literatura ou determinados em estudos anteriores. Utilizou-se uma matriz do planejamento Plackett-Burman 16 (RODRIGUES; IEMMA, 2005), com adições de quatros pontos centrais para avaliar as cinco variáveis independentes acima citadas na produção de lipase pelo fungo *Geomyces* sp. AL1-1B, totalizando 20 ensaios numa única batelada.

Os resultados do P&B após 7 dias de cultivo sob agitação de 150 rpm e a 15°C revelaram um aumento significativo da atividade lipolítica inicial obtida utilizando o meio de cultivo descrito por Savitha et al. (2007) que foi de 14,29 U/ L para 506,21 U/L (Quadro 7, ensaio 15). Os maiores resultados de atividade lipolítica (Quadro 7, ensaios 14 e 15) foram obtidos na ausência de fonte de nitrogênio (extrato de levedura), quando apenas uma fonte de carbono estava presente em sua

maior concentração (óleo de girassol e óleo de soja) e em pH 6. Em adição, a análise do P&B mostrou que apesar do Azeite de Oliva ser considerada uma importante fonte de carbono para a produção de lipase (JENSEN, 1983; LIMA et al., 2003) para o fungo estudado ele teve efeito negativo quando utilizado juntamente com outras fontes de carbono.

Quadro 7 - Matriz do planejamento Plackett-Burman 16 com adição de quatro pontos centrais com valores codificados e reais e atividade lipolítica (U/L).

Ensaio	PH	Azeite	Girassol	Soja	Extr.Lev.	Ativ. U/L
1	1	-1	-1	-1	1	230,51
2	1	1	-1	-1	-1	108,47
3	1	1	1	-1	-1	103,95
4	1	1	1	1	-1	101,69
5	-1	1	1	1	1	214,69
6	1	-1	1	1	1	277,97
7	-1	1	-1	1	1	257,63
8	1	-1	1	-1	1	246,33
9	1	1	-1	1	-1	108,47
10	-1	1	1	-1	1	237,29
11	-1	-1	1	1	-1	216,95
12	1	-1	-1	1	1	334,46
13	-1	1	-1	-1	1	273,45
14	-1	-1	1	-1	-1	485,88
15	-1	-1	-1	1	-1	506,21
16	-1	-1	-1	-1	-1	65,54
17	0	0	0	0	0	214,69
18	0	0	0	0	0	205,65
19	0	0	0	0	0	235,03
20	0	0	0	0	0	221,47

O nível de significância de 10% ($p < 0,1$) foi considerado para as variáveis que tiveram influência significativa na atividade enzimática. Conforme a análise dos efeitos obtidos através da avaliação estatística plotados no Diagrama de Pareto

(Figura 13) apenas as variáveis pH e Azeite de Oliva apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$), ambos influenciando negativamente a produção de lipase.

Figura 13 - Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) de 5 variáveis na produção de lipase pela cepa AL1-1B.

Visando otimização da produção as variáveis devem ser selecionadas e alteradas conforme seus efeitos (efeito negativo= concentração ou valores inferiores ou efeito positivo= concentração ou valores superiores aos estudados). Entretanto, tendo em vista que as lipases comerciais agem preferencialmente em condições alcalinas (DOMINGUEZ et al., 2005; GUPTA et al., 2004) o pH inferior a 6 foi desconsiderado. Assim, o valor de pH foi fixado no ponto maior (pH 8), e o Azeite de Oliva, que apresentou efeito negativo, foi excluído dos experimentos da etapa subsequente (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR 2³).

Os valores das variáveis utilizadas no DCCR 2³ estão apresentados no Quadro 4. Apesar das variáveis escolhidas não apresentarem efeito significativo para o delineamento do DCCR novas faixas foram delimitadas, uma vez que estas variáveis apresentaram efeito positivo. O melhor resultado de atividade lipolítica (723,16 U/L) foi obtido com 2,21% de óleo de Soja, 2,79% de óleo de Girassol e 3,79% de extrato de levedura (Quadro 8, ensaio 7). Na análise estatística a única

variável significativa foi o extrato de levedura linear, influenciando positivamente a produção de lipase (Quadro 9).

Quadro 8 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR com adição de três pontos centrais com valores codificados e reais e atividade lipolítica (U/L).

Ensaio	Soja	Girassol	Ex. Leved.	Ativ. U/L
1	-1	-1	-1	393,22
2	1	-1	-1	361,58
3	-1	1	-1	338,98
4	1	1	-1	341,24
5	-1	-1	1	409,04
6	1	-1	1	461,02
7	-1	1	1	723,16
8	1	1	1	372,88
9	-1,68	0	0	381,92
10	1,68	0	0	404,52
11	0	-1,68	0	400,00
12	0	1,68	0	368,36
13	0	0	-1,68	296,05
14	0	0	1,68	515,25
15	0	0	0	411,30
16	0	0	0	390,96
17	0	0	0	366,10

Quadro 9 - Coeficientes de regressão gerados a partir dos resultados obtidos da atividade lipolítica no DCCR.

Variáveis	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p
Media	425,8397	42,41918	10,03885	0,000021
Óleo de soja (L)	-21,2328	19,93206	-1,06526	0,322117
Óleo de soja (Q)	8,1359	21,95870	0,37051	0,721961
Óleo de girassol (L)	7,2013	19,93206	0,36129	0,728540
Óleo de girassol (Q)	4,9331	21,95870	0,22465	0,828666
Extrato de levedura (L)	65,9112	19,93206	3,30679	0,012999*
Extrato de levedura (Q)	12,5397	21,95870	0,57106	0,585818
Interação: Óleo de soja com Óleo de girassol	-46,0452	26,03100	-1,76886	0,120236
Interação: Óleo de soja com extrato de levedura	-33,6158	26,03100	-1,29138	0,237578
Interação: Óleo de girassol com extrato de levedura	37,5706	26,03100	1,44330	0,192152

* p < 0,1

Baseado nos resultados do coeficiente de regressão (Quadro 9) um modelo de segunda ordem para a atividade lipolítica deveria ser estabelecido. Contudo, a significância estatística (Quadro 10) não foi confirmada pelo teste *F* (Anova), mesmo com o valor do teste *F* (10,57) para a regressão sendo significativo, ou seja, maior do que o valor do *F* tabelado (4,06). Uma vez que a porcentagem de variação explicada pelo modelo não foi adequada ($R^2 = 85\%$), e o modelo não pode ser considerado previsível o gráfico de contorno e superfície de resposta não pôde ser gerado.

Quadro 10 - Anova do modelo quadrático para a atividade lipolítica.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	59276,85041	1	59276,85	10,57118407
Resíduo	84110,98983	15	5607,399	
Total	143387,8	16		

$R^2 = 85\%$ e p-valor = 0.0001.

F 1;15,0,1 (F tabelado)= 4,06

Apesar da análise estatística não proporcionar a obtenção de um modelo de segunda ordem, para prever a atividade lipolítica em funções das diferentes variáveis estudadas, as mesmas foram essenciais para a conclusão dos resultados obtidos, onde 5 variáveis foram estudadas em diferentes concentrações, em apenas 2 bateladas de estudos, totalizando 37 ensaios e resultando em um aumento de mais de 5.000 % na atividade lipolítica inicial do fungo *Geomyces pannorum*. AL1-1B (Figura 14) quando cultivado em pH 8,0 e a 15 °C.

Figura 14 - Otimização da produção de lipase por *Geomyces pannorum*. AL1-1B.

O ensaio que apresentou maior atividade (Tabela 7, ensaio 7) foi validado pela repetição (triplicata) do mesmo nas condições previamente utilizadas e foi utilizado na avaliação da atividade lipolítica específica (Figura 16) e da cinética enzimática (Figura 17).

4.7 Avaliação da atividade lipolítica específica do isolado, quantificação da massa seca e cinética enzimática

A atividade específica da lipase é influenciada pelas condições da reação em que ela atua como pH, temperatura e presença de compostos. A especificidade em relação ao comprimento e posição da cadeia do ácido graxo na molécula de triacilglicerol também influencia a atividade da mesma (CORZO; REVAH, 1999).

A determinação e comparação de atividade específica e da especificidade de substrato de diferentes lipases são necessárias para a busca de funções fisiológicas da enzima e para julgar a sua utilidade em aplicações biotecnológicas. A atividade específica de enzimas é determinada pela divisão da atividade da enzima pela atividade de proteínas totais. A atividade da enzima é proporcional à sua concentração no meio, o que define a atividade específica. No presente estudo, a dosagem de proteínas variou entre 0,05 e 0,18 mg/ml de proteínas, sendo os maiores valores encontrados no dia 9 (Quadro 11, Figura 14). Esses resultados foram utilizados para o cálculo da atividade lipolítica específica do fungo *Geomyces* sp. AL1-1B (Figura 16).

Quadro 11 - Valores de absorbância e concentração de proteínas em mg/ml.

Dias	Abs	Conc. mg/ml	Média mg/ml	Ativ. Espec. U/mg	Ativ. Espec. Média U/mg
3	0.011	0.049	0.05	7.13	6.93
	0.01	0.048		7.47	
	0.014	0.052		6.19	
	0.024	0.062		8.08	
5	0.025	0.063	0.06	7.56	7.88
	0.018	0.056		8.02	
	0.116	0.154		2.92	
	0.123	0.161		2.18	
7	0.198	0.236	0.18	1.85	2.31
	0.147	0.185		1.71	
	0.14	0.178		1.94	
	0.152	0.190		1.82	
9	0.14	0.178	0.18	1.94	1.82
	0.152	0.190		1.82	

Figura 15 - Leitura da concentração de proteínas no decorrer dos dias analisados.

A atividade específica da enzima para o isolado estudado variou entre 1,82 e 7,88 U/mg de proteína sob condições de pH 8 e temperatura de 15 °C. Sendo os maiores valores encontrados no dia 9 (Figura 16).

A atividade lipolítica do fungo *Fusarium solani* cultivado a 28 °C e 120 rpm em óleo de sésamo como fonte de carbono e pH 7,8 foi de 0,06 e 0,45 U/mg (MAIA et al., 2001). Corzo e Revah (1999) analisaram a influência dos parâmetros temperatura, pH e tempo de incubação na atividade específica da levedura *Yarrowia lipolytica* pelo método de titulação de ácidos graxos liberados. Nas condições de pH 6 e temperatura 30 °C, foram encontradas atividades específicas de $2,0 \pm 0,1$ U/mg tanto a 48 como a 60 h de incubação. Nas mesmas condições, porém à temperatura de 34 °C, a atividade lipolítica reduziu para $1,4 \pm 0,0$ U/mg a 48 h e $0,8 \pm 0,0$ U/mg a 60 h de incubação. Um maior tempo de incubação proporcionou um aumento na biomassa, mas não necessariamente na produção de lipase.

As enzimas puras comerciais apresentam uma atividade normalmente mais alta que as lipases avaliadas em cepas de micro-organismos. A atividade lipolítica (específica) da enzima comercial Lipase FAP (Amano) obtida de uma cultura do fungo *Rhizopus* em reação de hidrólise de gordura de babaçu a 40 °C variou entre 0,566 U/mg para concentração enzimática de 279,6 U/mL e 26,6 h de reação e

22,740 U/mg em concentração de 165U/mL e 1h de reação (OLIVEIRA; GIOIELLI ; OLIVEIRA, 1999). Em adição, PLOU et al. (1998) avaliaram a atividade lipolítica de enzimas comerciais em condições ótimas de pH variando entre 7 e 8 a temperatura de 25 °C usando a trioleína como substrato e obtiveram atividades de 7,6 U/mg para lipase de *Candida rugosa*, 0,6 U/mg para lipase de *Rhizopus* sp., 0,3 U/mg para lipase de *Humicola*, 0,6 U/mg para lipase pancreática, e 7,0 U/mg para Lipozyme de *Mucor miehei*. Em um estudo de transesterificação enzimática usando a enzima lipase pura de *Penicillium expansus* imobilizada foram obtidos rendimentos de 92,8 e 85,0% na produção de biodiesel. A enzima utilizada apresentava atividade lipolítica detectada em reação de hidrólise de 6,7 U/mg (LI; ZONG; WU, 2009).

No presente trabalho, a atividade lipolítica específica obtida para o isolado de *Geomyces pannorum* AL1-1B se assemelha a atividade lipolítica encontrada na enzima pura de *Penicillium expansus* e da enzima comercial Lipozyme de *Mucor miehei*, porém em temperatura mais baixa, indicando o potencial para aplicação biotecnológica.

Figura 16 - Atividade lipolítica específica dos isolados bacterianos em U/mg de proteína.

Os resultados da quantificação da biomassa fúngica resultante do crescimento nas condições de cultivo avaliadas tanto para o cálculo da dosagem de proteínas quanto para o cálculo da atividade específica estão apresentados na Tabela 12 e na Figura 17.

Quadro 12 - Valores de massa seca e de produção enzimática.

Dias	Ensaio	Papel (g)	Papel + M. Seca	Total	Média	Abs	Ativ. U/L
3	1	0.34	0.46	0.12	0.1033	0.153	345.76
	2	0.38	0.48	0.1		0.157	354.80
	3	0.34	0.43	0.09		0.141	318.64
5	4	0.38	0.56	0.18	0.19	0.22	497.18
	5	0.38	0.53	0.15		0.209	472.32
	6	0.37	0.61	0.24		0.197	445.20
7	7	0.36	0.79	0.43	0.5267	0.14	447.46
	8	0.36	0.92	0.56		0.152	350.28
	9	0.39	0.98	0.59		0.153	436.16
9	10	0.38	1.52	1.14	1.27	0.198	316.38
	11	0.36	1.7	1.34		0.155	343.50
	12	0.33	1.66	1.33		0.193	345.76

O pico de produção de lipase (471,60 U/L) foi obtido no 5º dia de cultivo, seguido, de uma queda progressiva até o ultimo dia de leitura (9º dia). Neste mesmo período, de acordo com os resultados da quantificação de crescimento micelial (massa seca) o fungo estava iniciando o crescimento exponencial (fase de aceleração), indicando que a produção da enzima foi necessária para a quebra do substrato e utilização das fontes de carbono (Figura 17).

Figura 17 - Crescimento celular e cinética enzimática.

Na validação da otimização a atividade de lipase obtida após 7 dias de cultivo (Tabela 11) foi cerca de 45% menor do que a obtida no ensaio de otimização (Tabela 7). Levando-se em consideração que os resultados nos pontos centrais do ensaio de otimização foram similares (validando o ensaio), a diferença de atividade enzimática obtida na validação pode ser justificada pela origem do inóculo ou por algum fator inerente aos sistemas biológicos que fogem ao controle do avaliador. Entretanto, esses resultados não invalidam os dados do presente trabalho, onde a produção de lipase foi obtida a 15 °C e em pH 8,0.

De acordo com a literatura consultada, não há relatos da produção de lipases por isolados de fungos a temperaturas menores ou iguais a 15 °C. Fungos filamentosos isolados a partir da decomposição de algas coletadas perto da Passagem de Drake e da água do Lago Uruguai na Base Antártica Uruguiaia e identificados como *Geomyces pannorum*, foram reportados como produtores de lipases 4 °C (LOPERENA et al., 2012). Entretanto, a produção de lipase foi qualitativa (formação de halo ao redor da colônia), determinada pelo método de difusão em meios sólidos com Tween 80. Portanto, cabe destacar que o presente estudo é o primeiro trabalho a quantificar lipase em meio líquido por um fungo da espécie *Geomyces pannorum*.

5 CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para o isolamento de fungos filamentosos a partir de amostras marinhas e terrestres da Antártica foi aplicada com sucesso, visto que foram recuperados 253 isolados;
- a metodologia de triagem de alto desempenho utilizada proporcionou rápida triagem dos fungos lipolíticos, permitindo nas etapas subsequentes a seleção do isolado *Geomyces* sp. AL1-1B como o melhor produtor de lipases;
- o planejamento experimental e sua análise estatística mostraram ser uma ferramenta eficiente e importante para os estudos de avaliação de diferentes fatores na produção de lipases, agregando confiabilidade aos resultados. A aplicação do planejamento experimental resultou em condições de cultivo otimizadas;
- Os resultados do presente estudo evidenciam o potencial biotecnológico dos fungos da Antártica para a produção de lipases a baixas temperaturas, em especial o *Geomyces pannorum* AL1-1B

REFERÊNCIAS*

- ADENKUNLE, A. A.; ADEBAMBO, O. A. Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium senegalense* (J. F.Gmelin) seeds. **Journal of American Science**, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2007.
- 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 Biol. Biochem.**, v.38, p. 3057–3064, 2006.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.
- BECKER, P.; ABU-REESH, I.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G.; MARKE, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 o olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 184-190, 1997.
- BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**: fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.
- BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; JURGENS, J. A.; AISLABIE, J.; DUNCAN, S.; FARRELL, R. L. Environmental pollutants from the Scott and Shackleton expeditions during the 'Heroic Age' of Antarctic exploration. **Polar Record**. v. 40, n. 213, p. 143–151, 2004a.
- BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; JURGENS, J. A.; MCNEW, D. L.; HARRINGTON, T. C.; DUNCAN, S. M.; FARRELL, R. L. Wood destroying soft-rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**; v. 70, p. 1328–1335; 2004b
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADNER, J. R. The application of PCR for the isolation of a lipase gene from the genomic DNA of an Antarctic microfungus. **Current Genetics**, v. 44, p. 224–230, 2003.
- BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOS, I. D.; GO“TTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Mar. Genomics**, v. 2: p. 43–50. 2009

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

BURKERT, J F. M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Otimização da Agitação e Aeração na Produção da Lipase de *Geotrichum candidum* em Reator de Mistura. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis, SC, 2003. 1 CD-ROM.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1997. 460 p.

CASTELLANI, A. J. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CAVALCANTI, E. D. C. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. spe, p. 79-84, 2005.

CHATURVEDI, V.; SPRINGER, D. J.; BEHR, M. J.; RAMANI, R.; LI, X. Morphological and Molecular Characterizations of Psychrophilic Fungus *Geomyces destructans* from New York Bats with White Nose Syndrome (WNS). **PLoS ONE**, v. 5, p. 10783. 2010.

CHOI, S. A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 36, n. 4, p. 417-420, jul. 2003.

CLARKE, A. Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context. In: HUISKES, A. H. L.; GIESKES, W. W. C.; ROZEMA, J.; SCHORNO, R. M. L.; VAN DER VIES, S. M.; WOLFF, W. J. (Ed.). **Antarctic biology in a global context**. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. p. 3-17.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 173-180, 1999.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p. 369-374, 1985.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F.; WISTROM, C. A.; Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.**, v. 242, p. 1-10, 1987.

CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. Anhydrobiosis. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 579-599, 1992.

DAS, S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current science**, Bangalore, v. 90, n. 10, p. 1325-1335, 2006.

DE HOOG, G. S. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 33-76, 2005.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2nd ed. Utrecht: CBS, 2000. 1126 p.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 75–80, 1998.

DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M. L.; RÚA, M. L.; SANROMAN, M. A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochem. Eng. J.**, v. 26, p. 95-99. 2005.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. 859 p.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucl. Acids. Res.**, v. 32, p. 1792-1797. 2004.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: CMI, 1971. 608 p.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: CABI, 1976. 507p.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 200-208, 2003.

FERRER, M. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, West Sussex, v. 75, p. 569-576, 2000.

FINOTTI, E.; MORETTO, D.; MARSELLA, R.; MERCANTINI, R. Temperature effects and fatty acid patterns in *Geomyces* species isolated from Antarctic soil. **Polar Biol.**, v. 13, p. 127-130, 1993.

FINOTTI, E.; PAOLINO, C.; LANCIA, B.; AND MERCANTINI, R. Metabolic Differences Between Two Antarctic Strains of *Geomyces pannorum*. **Curr. Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 7–10, 1996.

GERDAY, C.; AITTALEB, M.; ARPIGNY, J. L.; BAISE, E.; CHESSA, J. P.; GARSOUX, G.; PETRESCU, I.; FELLER, G. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. **Biochim Biophys Acta.**, v. 131, p. 1342-119, 1997.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 85-90, 1999.

GUARRO, J. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.64, p. 763-781, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Stud. Mycol.**, v. 50, p. 9–18, 2004.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v. 142, p. 2321-2331, 1996.

HIBBETT, D. S.; YAO, Y.; ZHANG, N. "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi." **Mycological Research**, p. 509–547, 2007.

HOUDE, A. et al. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, Heidelberg, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HUNTER-CEVERA, J. C.; BELT, A. **Maintenance cultures for biotechnology and industry**. London: Academic Press, 1996. 263 p.

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

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (Acylglycerol Hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.

JOSEPH, B. et al. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 2, p. 39-48, 2007.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457-470, 2008.

KAMINI, N. R. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 317-324, 2000.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. New South Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 116 p.

KOCHKINA, G. A.; IVANUSHKINA N. E.; AKIMOV, V. N.; GILICHINSKII D. A.; OZERSKAIA, S. M. Halo- and psychrotolerant *Geomyces* fungi from arctic cryopegs and marine deposits [in Russian]. **Mikrobiologiya**, v. 76, p. 39–44. 2007.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LI, N.; ZONG, M.; WU, H. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 685–688, 2009.

LIMA, V. M. G. et al. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41. p. 105-110, 2003.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 98-102, 2006.

LOPERENA, L.; SORIA, V.; VARELA, H.; LUPO, S.; BERGALLI, A.; GUIGOU, M.; PELLEGRINO, A.; BERNARDO, A.; CALVIÑO, A.; RIVAS, F.; BATISTA, S. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 2249-2256, 2012

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A. L. F.; RANDALL, R. F. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275. 1951.

MAIA, M. M. D. et al. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 304-309, 1999.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M. M. C.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR., M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; MARX, J.-C.; GERDAY, C. **Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology**. 2008. 462 p.

MARGESIN, R.; FELLER, G. Biotechnological applications of psychrophiles. **Environmental Technology**, v. 31, p. 835–844, 2010.

MIRANDA, O. A. et al. Lipase production by a brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 145-147, 1999.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, p. 69-71, 1998.

NILSSON, T. Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. **Stud. Suec.**, n. 104, 1973.

NISHA, A. AND VENKATESWARAN, G. Safety evaluation of arachidonic acid rich *Mortierella alpina* biomass in albino rats – a subchronic study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 3, p. 186–194. 2009.

OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, 1999.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; SEGURA, R. L.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Methods in Biotechnology**, v. 22, p. 143-152, 2006.

PANG, K.; MITCHELL, J. I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, Berlim, v. 48, p. 332-347, 2005.

PASTORE, G. M.; COSTA V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PEINTNER, U.; MOSER, M. M.; THOMAS, K. A.; MANIMOHAN, P. First records of ectomycorrhizal *Cortinarius* species (*Agaricales*, *Basidiomycetes*) from tropical India and their phylogenetic position based on rDNA ITS sequences. **Mycological Research**, v. 107, p. 485-494, 2003.

PIKUTA, E. V. et al. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 33, p. 183-209, 2007.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 1979. 634 p.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

PLOU, F. J.; FERRER, M.; NUERO, O. M.; CALVO, M. V.; ALCALDE, M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 3, p. 183-186, 1998.

RAEDER, J.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17 - 20, 1985.

RAGUENES, G. et al. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 989-995, 1997.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; LEOW, T. C.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. **BMC Microbial**, v. 7, p. 77, 2007.

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

RUSSELL, N. J. Cold adaptation of microorganisms. **Philos. Trans. Roy Soc. London Ser. B**, v. 326, p. 595–611, 1990.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. centraalbureau voor schimmelcultures. 6th ed. Utrecht, 2002. 389 p.

SAVITHA, J. et al. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 564-568, 2007.

SAXENA, R. K. et al. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 101-115, 1999.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 239-247, 2003.

SCHABEREITER-GURTNER, C.; GUADALUPE, P.; WERNER, L.; SABINE, R. Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18 rDNA sequence analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, p. 345–354, 2001.

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE-UFES**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SINCLAIR, W. A.; LYON, H. **Diseases of trees and shrubs**. 2nd. ed. Ithaca: Cornell University Press, 2005.

SIVAN, A.; CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**, v. 135 p. 675-682, 1989.

STCHIGEL, A. M.; CANO, J.; MACCORMACK, W.; GUARRO, J. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov, a new ascomycete from Antarctica. **Mycological Research**, v. 105 p. 377–382, 2001.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*: and other methods)**. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

TINDALL, B. J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 271-283, 2004.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v. 12, p. 374-385, 2000.

WEINSTEIN, R. N.; MONTIEL, P.O.; JOHNSTONE, K.; Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. **Mycologia**, v. 92, n. 2, p. 222-229, 2000.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 138, p. 663-670, 1979.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 1271-1293, 1996.

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 Eng**, v. 15 p. 147-152, 2002.

ZUCCONI, L.; PAGANO, S.; FENICE, M.; SELBMANN, L.; TOSI, S.; ONOFRI, S. Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. **Polar Biol.**, v. 16, p. 53-61, 1996.

APÊNDICE - Identificação taxonômica do fungo *Geomyces* sp. AL1-1B

O fungo *Geomyces* sp. AL1-1B selecionado como o melhor produtor de lipase foi submetido à experimentos taxonômicos adicionais visando especiação. Após análises moleculares e morfológicas o fungo foi identificado pelo Prof. Dr. André Rodrigues do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos – UNESP campus Rio Claro como pertencente à espécie *Geomyces pannorum*.

As sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 foram obtidas e alinhadas no software Muscle (EDGAR, 2004) com as sequências do estudo de CHATURVEDI et al. (2010). A reconstrução filogenética da árvore foi realizada utilizando o algoritmo de neighbour-joining utilizando o software PAUP (SWOFFORD, 2002). As distâncias filogenéticas foram calculadas segundo o modelo de Kimura 2 parâmetros e os sítios contendo "gaps" foram excluídos da análise. Valores bootstrap de suporte da árvore foram calculados com 1000 pseudoréplicas. A árvore final foi editada em Adobe Illustrator v. 10 (Figura 18). De acordo com os dados moleculares, o isolado AL1-1B mostrou-se estar evolutivamente mais próximo de *Geomyces pannorum*.

Figura 18 - Árvore filogenética mostrando a relação evolutiva entre o isolado AL1-1B e representantes do gênero *Geomyces*, *Pseudogymnoascus*, *Gymnostellaspore*, *Bulgaria*, *Phacidiopycnis*, *Allantophomopsis* e *Myxotrichum*.

A caracterização convencional corroborou o resultado da taxonomia molecular. A descrição morfológica seguiu a descrita em DE HOOG et al. (2000). O fungo AL1-1B apresentou colônias de crescimento lento (15 °C), aspecto flocoso, elevada no centro e de coloração creme em meio ágar malte 2%. Conidióforos originam-se da hifa do substrato. Formação de artroconídios em cadeias ou solitários. Conídios terminais da cadeia elipsóides (na maioria) a obvóides, de parede espessa e rugosa. Conídios intercalares com formato de barril, de parede espessa e rugosa.

Os dados derivados das análises da taxonomia molecular e morfológica permitiu identificar o fungo AL1-1B, selecionado para a quantificação e otimização da produção de lipase, como *Geomyces pannorum*.