ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE

**Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos
marinhos e terrestres e prospecção de lipases**

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

São Paulo
2015

ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE

**Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos
marinhos e terrestres e prospecção de lipases**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa Dra. Lara Durães Sette

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

Duarte, Alysson Wagner Fernandes.

Biodiversidade de leveduras de ecossistemas antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases / Alysson Wagner Fernandes Duarte. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette.

Tese (Doutorado) – 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: Microbiologia de ambiente extremo.

Versão do título para o inglês: Biodiversity of marine and terrestrial yeasts from Antarctic ecosystems and prospection of lipases.

1. Levedura 2. Antártica 3. Lipase 4. Diversidade 5. Planejamento experimental 6. Sistema de duas fases aquosas 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/SBIB0181/2014

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

Candidato(a): Alysson Wagner Fernandes Duarte.

Título da Tese: Biodiversidade de leveduras de ecossistemas antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais Jorge Fernandes Duarte e Maria de Lourdes Fernandes Duarte, pela força e fé com que levam a vida, acreditando sempre que um mundo melhor depende de nossas atitudes rotineiras!! Pelos exemplos de determinação, força, superação, carinho, amor! Por tudo que sou!!!

A minha esposa Rafaela Tenório, por todos os momentos!! Por abdicar de parte de seus sonhos e embarcar comigo neste caminho!! Por todos os momentos de força, incentivo, espera e compreensão nessa caminhada! Te AMO!!!

AGRADECIMENTOS

A finalização de uma caminhada é feita ao lado de muitas pessoas importantes, sem as quais não seria possível a conclusão desse trabalho. Obrigado a todos que estiveram acompanhando esse trajeto. Aqui meus sinceros agradecimentos:

À minha Orientadora Profa. Dra. Lara Durães Sette pelos ensinamentos, confiança, liberdade na discussão do trabalho e pela amizade! Obrigado por ter me possibilitado ir a este ambiente tão especial que é o Continente Antártico!

A Divisão de Recursos Microbianos (DRM – CPQBA – UNICAMP) em nome das Profas. Dra. Valéria Maia de Oliveira, Dra. Fabiana Faninatti e Dra. Derlene Angelis por toda a infraestrutura e pela convivência durante o desenvolvimento deste trabalho;

Às técnicas da Divisão de Recursos Microbianos, Éricka Letícia, Milena Binatti, Samantha Fonseca e Viviane Piccin pela pronta disposição em auxiliar os alunos da DRM, pela convivência e amizade. Vivi, obrigado por todos os momentos de auxílio e reflexão a respeito da identificação taxonômica das leveduras;

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA – UNICAMP), em nome de toda a equipe técnica e administrativa, especialmente aos funcionários Célio, Celso, Laura, Lídia, Luíz, Paulo, Rita, Sandra e Valdir por todo o auxílio nos trâmites burocráticos, como a compra de reagentes ou no envio de malotes, ou trâmites rotineiros, como a utilização do restaurante universitário;

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP) pela parceria na abordagem dos Sistemas de Extração de Duas Fases Aquosas da lipase de *L. scottii* L117 e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Fernando C. Pagnocca e a Ifeloju Dayo-Owoyemi (UNESP – Rio Claro) pelo auxílio e discussão na avaliação taxonômica das leveduras;

À Profa. Eleni Gomes, a Ana Ferrarezi e Rafaela Brito (UNESP – São José do Rio Preto) pelas discussões no planejamento de purificação da lipase de *L. scottii* L117;

À equipe da Profa. Dra. Franciane Pellizzari (Universidade Estadual do Paraná) pela coleta e identificação taxonômica das macroalgas do ambiente Antártico;

À equipe das Profas Dra. Maria Virginia Petri (Universidade do Vale do Rio dos Sinos) e Profa. Dra. Rosalinda Carmela Monton (Instituto Oceanográfico - USP), especialmente ao Caio Cipro pela coleta e identificação dos líquens do ambiente Antártico;

À banca de qualificação pelas sugestões e conselhos em nome da Profa. Dra. Luiziana F. Silva (ICB – USP), Profa. Dra. Suzan P. Vasconcellos (UNIFESP) e Prof Dr. Wellington Luiz de Araújo (ICB – USP);
À banca de defesa de tese em nome dos Professores Dr. Fernando C. Pagnocca (UNESP – Rio Claro), Dra. Eleonora Carmona (UNESP – Rio Claro), Dr. Itamar S. Mello (EMBRAPA - Jaguariúna) e Dr. Wellington L. de Araújo (ICB - USP) pelas sugestões e colaborações na discussão do trabalho;

À Dra. Rafaella Bonugli (Universidade Federal da Integração Latino-Americana) pelo auxílio nas análises de Delineamento Experimental;

Aos amigos André M. Lopes e João V. D. Molino (Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica – USP) pelo auxílio no planejamento e discussão dos Sistemas de Extração de Duas Fases Aquosas da lipase de *L. scottii* L117;

Aos amigos Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrani Passarini (Universidade Federal da Integração Latino-Americana) e Dr. Tiago Palladino (DRM – CPQBA) pelas discussões a respeito das ferramentas em estudos de diversidade;

Aos amigos do Laboratório Divisão de Recursos Microbianos (DRM / CPQBA), por todos os momentos do café, pela descontração, convivência e pela amizade: Bruna, Cláudia, Daiane Daniela, Elmer, Fernando, Gileno, Gisele, Júlia, Leandro, Leonardo, Lucélia, Marcela, Mariana Nery, Maria Rapha, Michel, Milene, Meline, Natália, Nataly, Patrícia, Renan, Sanderson, Tiago Palladino, Tiago Rodrigues.

Aos amigos que fiz na viagem ao continente gelado, especialmente aos Prof. Dr. Luiz H. Rosa (UFMG), Prof. Dr. Itamar S. Mello e João Luiz (Embrapa - Jaguariúna); Diego Catillo e Amanda Bendia (Instituto Oceanográfico – USP);

À família de D. Natalina Oliveira e Roberto Oliveira, nossa família paulista, por toda a acolhida quando chegamos em Valinhos. Por toda a confiança genuína em acolher pessoas “desconhecidas” e que foi um diferencial quando aqui chegamos!! Por todos os momentos, pela pronta disposição em auxiliar sempre, pela referência do que é verdadeiramente ser uma Família Cristã!!! Por todos os momentos com aquele café quentinho e uma conversa muito agradável;

Ao Programa Brasileiro de Pesquisa na Antártica, em nome da Marinha do Brasil, Força Aérea Brasileira e Ministério de Ciência e Tecnologia pelo suporte e logística durante a viagem a Antártica;

A toda equipe embarcada do navio Polar Almirante Maximiano H41 da Marinha do Brasil assim como ao Capitão Benoni Valente Carneiro pela pronta disposição em auxiliar no desenvolvimento das pesquisas no ambiente Antártico durante a OPERANTAR XXXII.

À Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert (ICB – USP) e Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*) pela supervisão no estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE na disciplina Microbiologia de Ambientes Aquáticos e Costeiros;

À indústria CORN produtos (Mogi Guacú – SP) pelo fornecimento da amostra de milhocina;

À Universidade de São Paulo – USP e ao Programa de Pós Graduação em Interunidades em Biotecnologia;

A Secretaria de Pós-Graduação em Biotecnologia em nome dos secretários Eliane, Fabia e Marcos pela disponibilidade em auxiliar nos trâmites burocráticos durante esta caminhada;

A amiga Andréia Cavalcante de Melo pela pronta disposição em auxiliar em São Paulo, na ocasião dos experimentos na USP;

As Profas. Ana Cristina de Lima Normande e Ana Maria Queijeiro Lopez (Universidade Federal de Alagoas) pelos ensinamentos iniciais na vida acadêmica;

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Ensino Superior CAPES pelo apoio na concessão da bolsa de doutorado durante o período de junho de 2011 a julho de 2012;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio na concessão da bolsa de doutorado durante o período de agosto de 2012 a março de 2015 (processo FAPESP #2010/08352-5) e pelo auxílio financeiro nos projetos #2010/17033-0 e #2013/19486-0.

A minha família, especialmente minha esposa Rafaela, meus pais Jorge e Lourdes, irmãos Adilson e Luana, meu sogro Manoel e sua esposa Jane e minhas cunhadas Gabriela e Manuela por toda a força e compreensão;

A companheira de escrita de tese, nossa Lady, sempre atenta para dar uma força!!!

A Deus pelo Dom da Vida! Por me Sustentar nessa Caminhada!!

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho!!

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus pelo Dom da Vida! Por me Sustentar nessa Caminhada!!

RESUMO

DUARTE, A. W. F. **Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases**. 2014. 177f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O ambiente Antártico é caracterizado por condições ambientais restritivas de clima, hábitat e biogeografia. Os principais organismos adaptados a estas condições ambientais são os micro-organismos, em particular as leveduras, com potencial aplicação em diferentes processos biotecnológicos. Entre o arsenal enzimático dos fungos, estão as lipases (EC. 3.1.1.3), hidrolases que possuem ampla aplicação industrial devido a versatilidade em sua estrutura molecular e em suas propriedades catalíticas. Além disto, a diversidade microbiana neste ambiente encontra-se em estágio inicial de descoberta. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de leveduras em amostras marinhas e terrestres do ambiente Antártico, bem como prospectar lipases que atuem em processos que requerem temperaturas baixas e moderadas. Para isto, os objetivos específicos foram: **i)** Identificar as leveduras recuperadas de diferentes amostras (marinhas e terrestres, coletadas durante a OPERANTAR XXVIII – março de 2010) do ambiente Antártico por meio de isolamento e cultivo; **ii)** Prospectar lipases produzidas a baixas e moderadas temperaturas pelas leveduras derivadas do ambiente Antártico; **iii)** Otimizar a produção de lipase produzida por *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scottii* L117 (por meio do delineamento experimental); **iv)** Caracterizar o sobrenadante “extrato bruto” de lipase de *L. scottii* L117; **v)** Extrair por Sistema de Duas Fases Aquosas a lipase produzida por *L. scottii* L117; **vi)** Avaliar a diversidade de leveduras recuperadas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico (coletadas durante a OPERANTAR XXXII – Dezembro de 2013). De acordo com os resultados obtidos, 97 leveduras foram recuperadas por semeadura em meio de cultura Extrato de Malte Ágar e Ágar Dextrose Batata (PDA) a partir de diferentes amostras coletadas na OPERANTAR XXVIII, das quais foram identificados 12 gêneros e 21 espécies. Este total foi submetido a triagem de lipase e 45 apresentaram atividade enzimática, sendo duas leveduras selecionadas para os ensaios de otimização da produção enzimática: *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scottii* L117. A produção de lipase pelos isolados *C. laurentii* L59 e *L. scottii* L117 aumentou 6,2 vezes (0,143 para 0,887 U.mL⁻¹) e 9 vezes (0,230 para 2,07 U.mL⁻¹), respectivamente, após a condução do delineamento experimental. A lipase de *L. scottii* L117 foi avaliada por Sistema de Duas fases Aquosas e o sistema micelar utilizando o surfactante Triton X-114 foi o mais eficiente para purificação parcial desta enzima, sendo as condições de extração otimizadas com um aumento do coeficiente de partição de 0,75 para 7,7. A avaliação da diversidade das 405 leveduras recuperadas de macroalgas (n = 205) e líquens (n = 200) revelou a ocorrência de 24 táxons recuperados de macroalgas e 18 táxons de recuperados de líquens, sendo apenas cinco táxons

comuns a estes dois substratos. A comunidade de leveduras recuperadas de macroalgas apresentou maior diversidade (Fisher- α) e riqueza de espécies (Margalef) quando comparada com a comunidade de leveduras recuperadas de líquens. Ademais, 6 táxons de leveduras recuperadas de líquens e 4 táxons de leveduras recuperadas de macroalgas apresentaram baixa similaridade de sequência quando comparada com espécies conhecidas, podendo assim serem espécies novas. Considerando que o ambiente Antártico é uma rica fonte de recursos genéticos com propriedades específicas (extremófilos), a coleção de leveduras obtidas no presente estudo poderá ser utilizada em estudos futuros que visem o entendimento de mecanismos de adaptação a baixas temperaturas; produção de compostos naturais para aplicação biotecnológica, bem como descrição de possíveis novas espécies desconhecidas para a ciência.

Palavras-chave: Levedura. Antártica. Lipase. Diversidade. Planejamento Experimental. Sistema de Duas Fases Aquosas.

ABSTRACT

DUARTE, A. W. F. **Biodiversity of yeasts from marine and terrestrial Antarctic ecosystems and prospection of lipases.** 2014. 177f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The Antarctic continent is characterized by restrictive environmental conditions of climate, habitats and biogeography. The main organisms adapted to the conditions of this environment are the micro-organisms, in particular the yeasts, with potential application in several biotechnological processes. Among the enzymatic arsenal of fungal strains we can find lipases (EC. 3.1.1.3), hydrolases which have wide industrial applications because of the versatility in its molecular structure and their catalytic properties. Moreover, the microbial diversity in this environment is only in early stages of knowledge. In this sense, the objective of this study was to evaluate the diversity of yeasts in marine and terrestrial samples of the Antarctic environments, as well as the prospecting of lipases that can act in processes that require low and moderate temperatures. For this, the specific objectives were: i) to assess the taxonomic identity of yeasts from different samples (marine and terrestrial, collected during OPERANTAR XXVIII) of the Antarctic continent based on isolation and cultivation; ii) to prospect lipase at low and moderate temperatures produced by yeasts derived from the Antarctic continent; iii) to optimize the lipase production by *Cryptococcus laurentii* L59 and *Leucosporidium scottii* L117 (by experimental design); iv) to characterize the supernatant “brute extract” of lipase *L. scottii* L117; v) to extract the lipase produced by *L. scottii* L117; vi) to evaluate the diversity of yeasts isolated from lichens and seaweeds from Antarctic (collected during OPERANTAR XXXII). According to the results, 97 yeasts were recovered from different samples collected in OPERANTAR XXVIII (summer 2010), representing 21 different species. Among them, 45 showed lipase activity and two were selected for the optimization of enzyme production: *C. laurentii* L59 and *L. scottii* L117. Lipase production by L59 and L117 increased 6.2 fold (0.143 to 0.887 U.mL⁻¹) and 9 fold (0.230 to 2.07 U.mL⁻¹) respectively, after the application of experimental design. Extraction of *L. scottii* L117 lipase was assessed by Aqueous Two-Phase System and the micellar system TX-114 was the most efficient for partial enzyme purification. The diversity evaluation of 405 isolates from seaweeds and lichens (collected in XXXII OPERANTAR, summer of 2013) revealed the occurrence of 24 taxa from macroalgae samples and 18 taxa from lichens samples, being only five substrates common to these two substrata. The communities of yeasts recovered from macroalgae showed greater diversity (Fisher- α) and species richness (Margalef) compared to the communities of yeasts recovered from lichens. In addition, 6 taxa of yeasts recovered from lichens and 4 taxa of yeasts recovered from macroalgae showed low similarities in D1/D2 26S rDNA sequence with reported species possibly being putative new “species”. Considering that the Antarctic environment is a rich source of genetic

resources with specific properties (extremophiles), the yeast collection obtained in this study could be used in future studies aimed at understanding the mechanisms of adaptation to low temperatures; production of natural compounds for biotechnological applications, as well as description of possible new unknown species.

Keywords: Yeast. Antarctic. Lipase. Diversity. Experimental Design. Aqueous Two-Phase Systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da região Antártica abaixo do paralelo de 60 °S indicando a localização do arquipélago <i>Shetlands</i> do Sul. A linha tracejada representa a transição entre a Antártica Continental e a Antártica Marítima.....	30
Figura 2. Macroalgas <i>Adenocystis utricularis</i> (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg 1907 associadas a costões rochosos na região entre marés na ilha <i>Half Moon</i> (Antártica marítima).....	32
Figura 3. (A) Líquens crustáceos aderidos a rochas na ilha <i>Half Moon</i> (Antártica marítima); (B) Líquens fruticulosos <i>Usnea</i> sp. aderidos a rochas na ilha Nelson (Antártica marítima).....	35
Figura 4. Líquens crustáceos alaranjados aderidos a rochas na ilha Nelson (Antártica marítima).....	36
Figura 5. Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas com o tensoativo não iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas (<20 °C); com o aumento da temperatura ocorre a separação das fases. Fase Top (FT) – fase pobre em micelas e fase Bottom (FB) – fase rica em micelas.....	45
Figura 6. Mapa da Baía do Almirantado na Ilha Rei George (Península Antártica). O símbolo (▲) indica o local de coleta das amostras em março de 2010.....	50
Figura 7. Locais de coleta das amostras de macroalgas e líquens no Arquipélago <i>Shetlands</i> do Sul (Antártica marítima) na expedição OPERANTAR XXXII (Dezembro de 2013).....	52
Figura 8. Material coletado no continente Antártico na OPERANTAR XXVIII (março de 2010) e utilizado para o isolamento de leveduras. A) – Ouriço, B) – Molusco marinho; C) – Ascídea; D) – Kril; E) – Estrela do mar, F) Ophiuroidea; G) – <i>Salpa</i> sp.; H) – Esponja; I, J, K, L) – Algas.....	53
Figura 9. Esquema ilustrativo dos sistemas de Extração de Duas Fases Aquosas utilizados na extração da lipase de <i>L. scottii</i> L117.....	63
Figura 10. Gel de agarose do <i>fingerprint</i> genético para as regiões microssatélites (MSP-PCR) utilizando como marcador molecular o primer (GTG) ₅	70
Figura 11. Árvores filogenéticas das sequências de DNA ribossomal 26S para as 21 espécies leveduras isoladas de amostras do ambiente Antártico utilizando o método de <i>Neighbour-joining</i> , o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) e <i>bootstraps</i> com 1000 repetições. (A) Leveduras do Filo Basidiomycota, sendo a sequência de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> NRRL-Y-12796 utilizada como <i>outgroup</i> ; (B) Leveduras do Filo Ascomycota e a sequência de <i>Udeniomyces megalosporus</i> CBS 7236 utilizada como <i>outgroup</i>	72
Figura 12. (A) HTS utilizado para seleção de leveduras lipolíticas derivadas de amostras marinhas e terrestres do ambiente Antártico após 72 h de incubação a 15 °C em meio TM modificado com	

Rodamina B; (B) Teste confirmativo (individual) para produção de lipase (nas mesmas condições de cultivo).....	75
Figura 13. Incidência percentual de isolados com atividade lipolítica nas diferentes amostras da Antártica.....	76
Figura 14. Identificação e número de leveduras com atividade lipase positivo na triagem em meio sólido.....	76
Figura 15. Quantificação das lipases produzidas por leveduras do ambiente Antártico. A leitura enzimática foi realizada a cada 24 h de incubação a 20 °C e 180 rpm de agitação. Atividade enzimática realizada a 25 °C.....	77
Figura 16. Produção de lipase pelas leveduras <i>C. laurentii</i> L59, <i>L. scottii</i> L117 e <i>C. adeliensis</i> L121 durante 144 h de incubação a 20 °C e 180 rpm.....	78
Figura 17. Gráfico de Pareto para o ensaio de <i>Plackett-Burman</i> com 9 variáveis para produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59 ($p < 0,1$) (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	81
Figura 18. Superfícies de resposta e de contorno para produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59, DCCR 2 ³ . (A) Óleo de soja versus milhocina ($p < 0,1$); (B) extrato de levedura versus milhocina ($p < 0,1$); (C) Óleo de soja versus extrato de levedura ($p < 0,1$).....	83
Figura 19. Ensaio de validação da otimização do meio de cultura para produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59 (20 °C e 180 rpm).....	84
Figura 20. Influência da concentração de sal (NaCl 2.5 e 5.0 %) e da água do mar artificial (ASW 50 % e 100 %) na produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59 após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm.....	85
Figura 21. Gráfico de Pareto para o ensaio de <i>Plackett-Burman</i> com 9 variáveis para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117 ($p < 0,1$) (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	87
Figura 22. Superfícies de resposta e de contorno para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117, DCCR 2 ³ . (A) Azeite de oliva versus milhocina ($p < 0,1$); (B) Óleo de soja versus milhocina ($p < 0,1$).....	90
Figura 23. Superfície de resposta e superfície de contorno para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117, DCCR 2 ² com a função óleo de soja versus milhocina ($p < 0,05$).....	93
Figura 24. Superfície de resposta e superfície de contorno para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117, DCCR 2 ² com a função azeite de oliva versus milhocina ($p < 0,1$).....	94
Figura 25. Porcentagem de atividade relativa de lipase de <i>L. scottii</i> L117 quando comparado ao meio de cultivo contendo apenas azeite de oliva como fonte indutora. Tributirina (C4:0), Tricaprilato glicerol (C8:0) e Ácido oléico (C18:1).....	97

Figura 26. Porcentagem de atividade relativa de lipase de <i>L. scotti</i> L117 com diferentes agentes emulsificantes (SDS, Tween 80, Tween 20, TX-100, TX-114 e Goma Arábica) quando comparado ao meio de cultivo basal sem emulificante.....	97
Figura 27. Porcentagem de atividade relativa de lipase L117 quando comparado com o meio de cultivo sem NaCl.....	98
Figura 28. Atividade de lipase (U.mL ⁻¹) em função da agitação após 120 h de incubação a 20°C.....	99
Figura 29. Atividade residual de lipase produzida por <i>C. laurentii</i> L59 e <i>L. scottii</i> L117 em diferentes temperaturas de incubação.....	99
Figura 30. Atividade e Estabilidade de lipase de <i>L. scottii</i> L117 em diferentes (A) pH e (B) Temperaturas. Os ensaios de pH foram realizados a 25 °C e com os tampões a 50 mM: tampão glicina/HCl (pH 2.0 and 3.0), citrate de sódio (pH 4.0 and 5.0), tampão MES (pH 6.0), tampão MOPSO (pH 7.0), tampão TAPS (pH 8.0 and 9.0) e tampão CAPS (pH 10.0 and 11.0). Os ensaios de temperatura foram realizados em tampão citrato de sódio.....	100
Figura 31. Superfícies de resposta e de contorno para atividade de lipase de <i>L. scottii</i> L117, DCCR 2 ² com a função pH versus temperatura ($p < 0,1$).....	102
Figura 32. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida 8 % para lipase de <i>L. scottii</i> L117. EB e EB2 – Extrato bruto; E – Precipitado com etanol, 1:3 – Precipitado com Acetona, FS – Precipitado com acetona Filtrado contendo sal, FB – FB – Filtrado bruto, BL – extrato bruto liofilizado ressuscitado 1:5 do volume inicial, FL – Precipitado com acetona Filtrado Liofilizado ressuscitado em 1:5 do volume inicial.....	104
Figura 33. Gel de zimograma de esterificação de lipase <i>L. scottii</i> 117. Amostra BL – Extrato bruto liofilizado e ressuscitado em 1:5 do volume inicial; PA – Precipitada com Acetona; PE – Precipitada com álcool etílico.....	105
Figura 34. Balanço de atividades (%BA) de lipase de <i>L. scotti</i> L117 em sistema micelar utilizando TX-114 (4-12 %, m.m ⁻¹) e 16 h de incubação. A) 25 °C, B) 30 °C. O eixo X representa o tempo após a separação de fases. Os ensaios a 12% de TX-114 12% a 25°C e 2% de TX-114 a 30°C não apresentaram separação de fases. No tempo 0 o balanço de atividades foi de 100%.....	109
Figura 35. Visualização do sistema micelar TX-114 (ensaio 11) após a completa separação de fases. Fase <i>Top</i> (FT) – fase pobre em micelas e fase <i>Bottom</i> (FB) – fase rica em micelas.....	112
Figura 36. Superfícies de respostas e de contorno para (%) de recuperação de lipase na fase bottom do sistema micelar. (A) Temperatura versus pH; (B) TX114 versus pH; (C) TX114 versus Temperatura.....	113
Figura 37. Superfícies de respostas e de contorno para avaliação da partição da lipase (K) em sistema micelar. A) TX-114 versus Temperatura; B) TX-114 versus pH.....	115

Figura 38. Macroalgas coletadas no arquipélago das <i>Shetlands</i> do Sul (Antártica Marítima) e utilizadas no isolamento de leveduras a 5 e 15 °C. 1. <i>Adenocystis utricularis</i> (Bory de Saint-Vicent) Skottsberg (Austrália, Nova Zelândia e Antártica); 2. <i>Ascoseira mirabilis</i> Skottsberg (Antártica e Ilhas subantárticas); 3. <i>Curdiea racovitzae</i> Hariot (Antártica e Ilhas subantárticas); 4. <i>Desmarestia anceps</i> Montagne (Cosmopolita); 5. <i>Desmarestia menziesii</i> J Agardh (Antártica e Ilhas subantárticas); 6. <i>Cystosphaera jacquiniotii</i> Montagne (Skottsberg) (Antártica e Ilhas subantárticas); 7. <i>Gigartina skottsbergii</i> Setchell & NL Gardner (América do Sul e Antártica), 8. <i>Himantothallus grandifolius</i> (A Gepp and Gepp) Zinova (Antártica e Ilhas subantárticas); 9. <i>Iridaea cordata</i> (Turner) Bory de Saint-Vincent (Cosmopolita). Barra corresponde a 1cm.....	119
Figura 39. Ocorrência de leveduras isoladas de seus respectivos substratos de origem (macroalgas da Antártica). Todas as macroalgas foram amostras de apenas 1 ilha, exceto <i>Gigartina skottsbergii</i> (3 ilhas); <i>Iridaea cordata</i> e <i>Desmarestia menziesii</i> (2 ilhas).....	121
Figura 40. Árvore filogenética da sequência de DNA ribossomal 26S para <i>Mrakia</i> sp. isolada de macroalga do ambiente Antártico utilizando o método de <i>Neighbour-joining</i> , o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e <i>bootstraps</i> com 1000 repetições. <i>Guehomyces pullulans</i> AFTOL-ID 1958 ^T foi utilizada como <i>outgroup</i>	125
Figura 41. Diagrama de Venn indicando a origem (ilha de coleta) dos diferentes táxons de leveduras recuperadas de macroalgas do ambiente Antártico.....	125
Figura 42. Árvore filogenética da sequência de DNA ribossomal para o isolado de macroalga <i>Palmaria decipiens</i> 8.PDDEC utilizando o método de <i>Neighbour-joining</i> , modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e <i>bootstrap</i> com 1000 repetições. (A) região D1/D2 do rDNA 26S; (B) região ITS1-ITS2 do rDNA 26S. <i>Cryptococcus terricolus</i> CBS 4517 ^T e <i>Cryptococcus antarcticus</i> CBS7689 ^T , <i>Cryptococcus antarcticus</i> CBS7689 ^T foram utilizados como <i>outgroup</i> para o rDNA D1/D2 e ITS1-ITS2, respectivamente.....	126
Figura 43. Líquens coletados no arquipélago <i>Shetlands</i> do Sul (Antártica Marítima) e utilizados no isolamento de leveduras a 5 e 15 °C. Barra corresponde 1 cm.....	128
Figura 44. Ocorrência de leveduras (número de isolados) de seus respectivos substratos de origem (líquens da Antártica).....	129
Figura 45. Curvas de rarefação para os isolados de macroalgas e líquens do ambiente Antártico. Foram utilizadas todas as sequências do domínio D1/D2 dos 205 isolados de macroalgas e 200 isolados de leveduras. Cuttof de 0,03 e 0,05%.....	132
Figura 46. Diagrama de Venn para os táxons de leveduras recuperadas de macroalgas (n = 24) e líquens (n = 18) coletados no arquipélago <i>Shetlands</i> do Sul (Antártica Marítima).....	133
Figura 47. Visualização esquemática das leveduras recuperadas de macroalgas e líquens do arquipélago <i>Shetlands</i> do Sul (Antártica Marítima).....	133

Figura 48. Dendograma de similaridade (<i>Bray-Curtis</i>) da comunidade de leveduras isoladas de macroalgas do ambiente Antártico. Os resultados foram calculados com 95% de confiança e bootstrap com 1000 repetições. Amostras de mesma cor indica o mesmo local de coleta.....	134
Figura 49. Dendograma de similaridade (<i>Bray-Curtis</i>) da comunidade de leveduras isoladas de líquens do ambiente Antártico. Os resultados foram calculados com 95% de confiança e bootstrap com 1000 repetições. Amostras de mesma cor indica o mesmo local de coleta.....	134
Figura 50. Dendograma de similaridade (<i>Bray-Curtis</i>) da comunidade de leveduras isoladas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico (substratos com n acima de 20). Os resultados foram calculados com 95% de confiança e bootstrap com 1000 repetições. Amostras de mesma cor indica o mesmo local de origem.....	135
Figura 51. Análise dos Componentes Principais (PCA) calculado entre os parâmetros físico-químicos da água do mar no momento da coleta das macroalgas no ambiente Antártico (temperatura e salinidade) e índices de diversidade (Fisher- α), riqueza (Margalef) e dominância (Simpson) da comunidade de leveduras associadas às macroalgas.....	136
Figura 52. Árvores filogenéticas das sequências de DNA ribossomal 26S (região D1/D2) para leveduras isoladas de macroalgas do ambiente Antártico utilizando o método de <i>Neighbour-joining</i> , o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e <i>bootstraps</i> com 1000 repetições. A) 46.HGRG - <i>Cryptococcus</i> sp. 1; B) 2.PDDEC – <i>Ustilaginaceae</i> sp. 1 e 6.AURO – <i>Ustilaginaceae</i> sp. 2.....	138
Figura 53. Árvores filogenéticas das sequências de DNA ribossomal 26S (região D1/D2) isoladas de líquens do ambiente Antártico utilizando o método de <i>Neighbour-joining</i> , o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) e <i>bootstraps</i> com 1000 repetições. A) <i>Sarcinomyces</i> sp. 10.12.L25; B) <i>Cryptococcus</i> sp. 2 e 24.L31; C) <i>Cryptococcus</i> sp. 3; D) <i>Flagellospora curvula</i> e <i>Mycosymbiocytes mycenaphila</i> 19.L27; E) <i>Rhodotorula</i> sp.2 D.L9; F) <i>Rhodotorula</i> sp.2 10.10.L31.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais terminologias associadas aos micro-organismos de ambientes extremos.....	29
Tabela 2. Origem das amostras coletadas durante as expedições a Antártica realizadas em 2010 (OPERANTAR XXVIII) e em 2013 (OPERANTAR XXXII) e utilizadas para isolamento de leveduras.....	51
Tabela 3. Níveis de variáveis estudadas no delineamento de <i>Plackett-Burman</i> para produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59 e <i>L. scottii</i> L117.....	59
Tabela 4. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2 ³ para produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59.....	59
Tabela 5. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2 ³ para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117.....	60
Tabela 6. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2 ² (milhocina versus azeite de oliva) para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117.....	60
Tabela 7. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2 ² (milhocina versus óleo de soja) para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117.....	60
Tabela 8. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2 ³ para extração micelar de lipase de <i>L. scottii</i> L117.....	64
Tabela 9. Origem das leveduras isoladas a partir de diferentes amostras coletadas no ambiente Antártico em março de 2010 (OPERANTAR XXVIII).....	69
Tabela 10. Lista de táxon de leveduras isoladas de amostras marinhas e terrestres do continente Antártico por similaridade do domínio D1/D2, da região 26S do DNA ribossomal. Os isolados em negritos representam os depositados na coleção de culturas do CPQBA/UNICAMP (CBMAI).....	71
Tabela 11. Matriz do planejamento <i>Plackett-Burman</i> com 16 ensaios e 3 pontos centrais utilizada para avaliar o efeito de 9 variáveis na produção de lipase por <i>Cryptococcus laurentii</i> L59 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	80
Tabela 12. Matriz do planejamento DCCR 2 ³ com 8 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para avaliar 3 variáveis na produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	81
Tabela 13. Coeficiente de Regressão DCCR 2 ³ para atividade de lipase de <i>C. laurentii</i> L59.....	82
Tabela 14. Anova do modelo quadrático para atividade de lipase (U.mL ⁻¹) de <i>C. laurentii</i> L59.....	82
Tabela 15. Matriz do planejamento <i>Plackett-Burman</i> com 16 ensaios e 3 pontos centrais utilizada para avaliar o efeito de 9 variáveis na produção de lipase por <i>Leucosporidium scottii</i> L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	86

Tabela 16. Matriz do planejamento DCCR 2 ³ com 17 ensaios, 6 pontos axiais + 3 pontos centrais para avaliação de 3 variáveis na produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	88
Tabela 17. Coeficiente de Regressão DCCR 2 ³ para atividade de lipase por <i>L. scottii</i> L117. R ² =0,9298.....	88
Tabela 18. Tabela Anova do DCCR 2 ³ para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117.....	89
Tabela 19. Matriz do planejamento DCCR 2 ² com 12 ensaios. 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para avaliação de 2 variáveis na produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	91
Tabela 20. Coeficiente de regressão para o DCCR 2 ² da atividade de lipase por <i>L. scottii</i> L117, função óleo de soja versus milhocina. R ² =0,827.....	92
Tabela 21. Tabela Anova do DCCR 2 ² (milhocina versus óleo de soja) para produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117.....	92
Tabela 22. Matriz do planejamento DCCR 2 ² com 12 ensaios, 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para avaliar 2 variáveis na produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).....	93
Tabela 23. Composição química da água de maceração de milho (milhocina) utilizada nos experimentos de otimização experimental para produção de lipase pela levedura <i>L. scottii</i> L117.....	95
Tabela 24. Composição dos óleos vegetais em ácidos graxos (g.100g ⁻¹).....	96
Tabela 25. Valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura usados no DCCR 2 ² para atividade de lipase de <i>L. scottii</i> L117.....	101
Tabela 26. Matriz do planejamento DCCR 2 ² com 12 ensaios, 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para avaliar a influência do pH e da temperatura na atividade de lipase de <i>L. scottii</i> L117.....	101
Tabela 27. Coeficiente de regressão para o DCCR 2 ² da atividade ótima de lipase de <i>L. scottii</i> L117, função pH versus temperatura. R ² =0,87.....	102
Tabela 28. Planilha de purificação para precipitação com acetona gelada.....	103
Tabela 29. Atividade enzimática nas fases <i>Top</i> e <i>Bottom</i> dos três sistemas de extração SDFA (PEG/Fosfato, PEG/NaPA e Micelar com TX-114).....	107
Tabela 30. Matriz do planejamento DCCR 2 ³ com 8 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis TX-114, pH e temperatura na partição da lipase de <i>L. scottii</i> L117 em sistema micelar (após 6 de incubação).....	111
Tabela 31. Coeficiente de regressão DCCR 2 ³ para extração de lipase de <i>L. scottii</i> L117 por sistema micelar com Triton X114. Variável Resposta – (%) de recuperação de lipase na fase <i>Bottom</i> . R ² = 0,855.....	112

Tabela 32. Tabela Anova do DCCR 2 ³ para extração de lipase de <i>L. scottii</i> L117 por sistema micelar utilizando como variável resposta a (%) de recuperação na fase <i>Bottom</i> . $p < 0,05$	112
Tabela 33. Coeficiente de regressão DCCR 2 ³ para extração de lipase por sistema micelar utilizando Triton 114. Variável Resposta – Coeficiente de partição (K). $R^2 = 0,938$ ($p < 0,1$).....	114
Tabela 34. Tabela Anova do DCCR 2 ³ para extração de lipase de <i>L. scottii</i> L117 por sistema micelar. Variável Resposta Coeficiente de Partição (K). ($p < 0,1$).....	114
Tabela 35. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no segundo DCCR 2 ³ para extração de lipase de <i>L. scottii</i> L117 por sistema micelar utilizando TX-114.....	116
Tabela 36. Matriz do planejamento DCCR 2 ³ com 17 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para avaliar 3 variáveis no sistema de extração de lipase de <i>L. scottii</i> L117.....	116
Tabela 37. Origem das leveduras isoladas a partir de diferentes amostras de macroalgas coletadas no ambiente Antártico em dezembro de 2013 (OPERANTAR XXXII).....	122
Tabela 38. Origem das leveduras isoladas a partir de diferentes amostras de líquens coletadas no ambiente Antártico em dezembro de 2013 (OPERANTAR XXXII).....	130
Tabela 39. Índices de diversidade das comunidades de leveduras associadas a macroalgas e líquens do ambiente Antártico.....	131
Tabela 40. Similaridade entre táxons distintos isolados de macroalgas do ambiente Antártico.....	132
Tabela 41. Identificação molecular de leveduras isoladas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico por meio da análise das sequências dos domínios D1/D2 e região ITS1/ITS2 do DNA ribossomal 26S.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASW – Água do mar artificial;

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*;

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de cálcio;

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior;

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias;

DCCR – Delineamento do Composto Central Rotacional;

DMRO – Dimetil sulfóxido;

DRM – Divisão de Recursos Microbianos;

dNTP – Desoxirribonucleotídeos;

EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz;

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético;

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;

g – grama;

g/L – grama por litro;

H_2O – Água;

HCl – Ácido clorídrico;

H_3BO_3 – Ácido bórico;

HTS – *High Throughput Screening*;

INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia;

ITS – Região espaçadora transcrita interna;

K – Coeficiente de partição

Kg – quilogramas;

KBr – Brometo de potássio;

KCl – Cloreto de potássio;

L – Litro;

MA – Ágar extrato de malte;

mg – Miligramas;

min – Minutos;

mL – Mililitros;

mm – milímetros;

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de magnésio;

MSP – PCR - *Micro/minisatellite-primed PCR*;

NaPA – Ácido poliacrílico;
NaF – Fluoreto de sódio;
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio;
NaCl – Cloreto de sódio;
Na₂SO₄ – Sulfato de sódio;
NCBI – National Center for Biotechnology Information;
OPERANTAR – Operação Brasileira a Antártica;
PAST – *Palaeontological Statistics*;
PCA – Análise dos Componentes Principais;
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase;
PDA – Ágar Dextrose Batata;
PDB – Caldo Dextrose Batata;
PEG – Politetilenoglicol;
pH – potencial hidrogeniônico;
pNPP – p-nitrofenil palmitato;
P&B – Planejamento de *Plackett & Burman*;
RDPipeline – *Ribosomal Database Project*;
rDNA – ácido desoxirribonucléico ribossomal;
rpm – Rotações por minuto;
SDS – Sódio dodecil sulfato;
SDFA – Sistema de Duas Fases Aquosas;
SrCl₂·6H₂O – Cloreto de estrôncio;
Taq – Enzima Taq polimerase;
TBE – Tris borato;
Tris-HCl – Trishidroximetilaminometano;
TX-114 – Triton X-114;
YMA – *Yeast Malt Agar*;
YMB – *Yeast Malt Broth*;
μL – microlitros;
μmol – micromolar;
% – por cento;
°C – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1 Características de Ambientes Extremófilos	28
2.2 Características do Ambiente Antártico	29
2.3 Macroalgas do Ambiente Antártico.....	31
2.4 Líquens do Ambiente Antártico.....	33
2.5 Leveduras do Ambiente Antártico.....	37
2.5.1 Caracterização taxonômica de leveduras.....	39
2.6 Bioprospecção em Ecossistemas Antárticos: Enzimas Adaptadas ao Frio	40
2.6.1 Lipases microbianas: Características, produção e aplicações	42
2.7 Purificação / Extração Enzimática por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)	44
2.8 Otimização por Delineamento Experimental	46
3 OBJETIVOS.....	48
4. MATERIAS E MÉTODOS	49
4.1 Amostragem	49
4.1.1 Coleta realizada em Março de 2010 (OPERANTAR XXVIII)	49
4.1.2 Coleta realizada em Dezembro de 2013 (OPERANTAR XXXII).....	50
4.2 Isolamento das Leveduras	53
4.3 Agrupamento das linhagens representantes de grupos taxonomicamente distintos e Identificação molecular	54
4.3.1 Caracterização morfológica	54
4.3.2 Extração de DNA	55
4.3.3 Fingerprinting Genético – Micro/minisatellite-primed PCR (MSP-PCR)	55
4.3.4. Caracterização taxonômica.....	55
4.4 Avaliação da Diversidade de Leveduras Associadas a Macroalgas e Líquens.	56
4.5 Prospecção de lipase por leveduras isoladas da Antártica.	57
4.5.1 Seleção de leveduras produtoras de lipase por Triagem de Alto Desempenho (<i>High Throughput Screening</i>).....	57
4.5.2. Quanificação da atividade lipolítica.....	57
4.6 Otimização da produção de lipases através do delineamento experimental	58
4.7 Purificação de lipase de <i>L. scottii</i> L117.....	60
4.7.1 Purificação clássica com solventes orgânicos e sais.....	60

4.7.1.1 Precipitação com álcool etílico	61
4.7.1.2 Precipitação com acetona	61
4.7.1.3 Precipitação com sulfato de amônio	61
4.7.2 Extração Líquido/Líquido da lipase de <i>L. scottii</i> L117 por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA).....	62
4.7.2.1 Sistemas Poliméricos polietilenoglicol (PEG) / Fosfato e PEG / ácido poliacrílico (NaPA).....	62
4.7.2.2 Sistema Micelar (Triton X-114 / tampão McIlvaine, pH 7,0)	
4.7.2.3 Ensaio de Estabilidade frente ao Triton X-114	63
4.8 Otimização do sistema de extração micelar.....	63
4.9 Caracterização do extrato enzimático bruto de <i>L. scottii</i> L177	65
4.9.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	65
4.10 Eletrofore em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Zimograma baseado na atividade de esterificação	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. Capítulo 1: Avaliação Taxonômica de Leveduras do Ambiente Antártico e Prospecção de Lipases.....	68
5.1.1 Isolamento de leveduras, seleção e identificação molecular dos isolados representantes de grupos taxonomicamente distintos (amostras provenientes da OPERANTAR XXVIII).....	68
5.1.2 Seleção de leveduras da Antártica produtoras de lipase	75
5.1.2.1. <i>Triagem em meio sólido: Triagem de Alto Desempenho</i>	75
5.1.2.2 Quantificação da produção de lipase pelas leveduras da Antártica	77
5.2 Capítulo 2: Otimização das condições de cultivo de <i>Cryptococcus laurentii</i> L59 e <i>Leucosporidium scottii</i> L117 por meio de delineamento experimental	79
5.2.1 Otimização da produção de lipase por <i>C. laurentii</i> L59	79
5.2.2 Otimização da produção de lipase por <i>L. scottii</i> L117	85
5.2.3 Caracterização do sobrenadante “extrato bruto” de <i>L. scottii</i> L117.....	100
5.3 Capítulo 3: Purificação parcial da lipase de <i>L. scottii</i> L117	103
5.3.1 Precipitação do extrato enzimático	103
5.3.2 Extração por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA).....	105

5.3.3 Otimização das Condições de Extração de Lipase de <i>L. scottii</i> L117 por Sistema Micelar	110
5.4 Capítulo 4: Diversidade de Leveduras Associadas a Macroalgas e Líquens do Ambiente Antártico	119
5.4.1 <i>Diversidade de leveduras associadas a macroalgas</i>	119
5.4.2 <i>Diversidade de leveduras associadas a líquens</i>	128
5.4.1 <i>Diversidade de leveduras associadas a macroalgas e líquens da Antártica</i>	131
6 CONCLUSÃO	146
PERSPECTIVAS PARA PRÓXIMOS ESTUDOS	147
REFERÊNCIAS	148
APÊNDICE A	163
APÊNDICE B.....	164

1 INTRODUÇÃO

Os fungos derivados de nichos ecológicos pouco explorados como o ambiente Antártico têm sido foco de grande interesse devido à biodiversidade extremófila e aos recursos genéticos disponíveis nestes ambientes. A demanda por enzimas de origem microbiana com aplicação ambiental e/ou industrial está em contínua ascensão uma vez que tais enzimas podem ser utilizadas em uma ampla variedade de processos biotecnológicos. Entretanto, os trabalhos de pesquisa envolvendo o isolamento e avaliação do potencial biotecnológico de micro-organismos pertencentes ao ambiente antártico, tanto terrestre quanto marinho, são escassos e devem ser estimulados, pois podem resultar na descoberta de compostos naturais produzidos em condições de alta salinidade e/ou baixa temperatura. Enzimas produzidas a partir de micro-organismos psicrófilos/psicrofílicos podem estimular o desenvolvimento biotecnológico e movimentar a bioeconomia. Neste contexto, as lipases apresentam aplicabilidade biotecnológica em inúmeros setores de importância sócio-econômica, tais como, os setores químico, farmacêutico, alimentício, agrícola e ambiental.

O conhecimento da diversidade de leveduras no ambiente Antártico é recente (CARRASCO et al., 2012; CONNELL et al., 2008; FURBINO et al., 2014; GODINHO et al., 2013; ZHANG et al., 2014) e os estudos estão principalmente relacionados a amostras de solos, rochas, penas e fezes de pássaros e vegetação, sendo esta última, bastante limitada no continente antártico (CONNEL et al., 2008; RUISI et al., 2007). Além disso, a produção primária no ambiente Antártico está relacionada principalmente com as macroalgas (ambiente marinho) e aos musgos e líquens (ambiente terrestre), estando estes substratos pouco relacionados na literatura a estudos de diversidade de leveduras.

Neste contexto, o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP/Rio Claro e CPQBA/UNICAMP), vem desenvolvendo projetos relacionados ao isolamento, bioprospecção e aplicação de enzimas e estudo da biodiversidade de fungos derivados de ambiente marinho e mais recentemente, do ecossistema Antártico. Os resultados derivados desses projetos vêm demonstrando o potencial de fungos filamentosos marinhos para a aplicação ambiental e industrial, incluindo a seleção, produção e otimização de enzimas ligninolíticas (BONUGLI-SANTOS, 2010a; BONUGLI-SANTOS et al., 2010b; DA SILVA et al., 2008; PASSARINI, 2008; PASSARINI, 2011); caracterização molecular de genes codificadores de enzimas ligninolíticas (BONUGLI-SANTOS et al., 2010b) e aplicação ambiental dessas enzimas, tais como a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os HPAs (MAGRINI, 2012; PASSARINI et al., 2011) e descoloração de corantes têxteis (BONUGLI-SANTOS et al., 2012).

As lipases produzidas por micro-organismos psicrófilos possuem alta atividade específica em processos que ocorrem em baixas e moderadas temperaturas, propriedade extremamente útil em diversos setores da indústria biotecnológica (JOSEPH et al., 2007), com destaque na produção de

detergentes empregados em “lavagem a frio”, nas agroindústrias, e em processos fermentativos que requeiram baixas temperaturas (GERDAY et al., 2000; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

O presente trabalho está associado ao projeto INCT da Criosfera (CNPq), coordenado pelo Dr. Jefferson Simões (UFRGS), ao projeto FAPESP 2010/1033-0 intitulado Exploração biotecnológica de fungos derivados da Antártica sob a coordenação da Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP/RioClaro) e ao projeto fomentado pela Comunidade Européia “*Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin – BAMMMBO*” coordenado pelo Dr. Daniel Walsh (Instituto de Tecnologia de Limerick, Irlanda) e teve como objetivos principais: **i)** Identificar as leveduras recuperadas de diferentes amostras (marinhas e terrestres, coletadas durante a OPERANTAR XXVIII – março de 2010) do ambiente Antártico por meio de isolamento e cultivo; **ii)** Prospectar lipases produzidas a baixas e moderadas temperaturas pelas leveduras derivadas do ambiente Antártico; **iii)** Otimizar a produção de lipase produzida por *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scottii* L117 (por meio do delineamento experimental); **iv)** Caracterizar o sobrenadante “extrato bruto” de lipase de *L. scottii* L117; **v)** Extrair por Sistema de Duas Fases Aquosas a lipase produzida por *L. scottii* L117; **vi)** Avaliar a diversidade de leveduras recuperadas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico (coletadas durante a OPERANTAR XXXII – Dezembro de 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características de Ambientes Extremófilos

Nichos ecológicos de ambientes “extremos” como o ambiente Antártico despertam a curiosidade humana, uma vez que estes ambientes podem indicar qual o limite das diferentes formas de vida na Terra. Organismos que se desenvolvem em ambientes extremos são chamados de “extremófilos”, estando estes, muitas vezes, sujeitos a mais de uma pressão seletiva e, conseqüentemente, desenvolvendo estratégias simultâneas de sobrevivência a diferentes condições extremas.

O conceito de ambiente “extremo” as vezes se refere a uma visão antrópica acerca das condições ambientais limitantes a sobrevivência humana, entretanto, o conceito utilizado no presente trabalho é o proposto em 1974 por MacElroy quando o mesmo se refere a ambientes extremos como ambientes que apresentam diversidade biológica restrita, excluindo a maior parte dos organismos.

Ambientes extremos são caracterizados por diferentes pressões seletivas, e diferentes parâmetros físico-químicos, tais como: temperatura, radiação, pressão, vácuo, dessecação, salinidade, pH ou potencial redox. Alguns autores incluem ainda extremos biológicos como ambientes com restrição nutricional como os ambientes oligotróficos e extremos de densidade populacional. As terminologias são variadas para os diferentes micro-organismos que vivem em condições extremas, as mais comuns são: psicrófilos, termófilos, acidófilos, alcalófilos, piezófilos, xerófilos, halófilos, metalotolerantes, oligotróficos, osmofílicos e radioresistentes (Tabela 1) (RAMPELOTTO, 2010; RASPOR; ZUPAN, 2006; ROTHSCCHILD; MANCINELLI, 2001).

A Terra é um planeta frio, com cerca de 85 % da sua biosfera com temperaturas permanentes abaixo de 5 °C. Aproximadamente 71 % do planeta Terra é composto pelos oceanos e 90 % do volume destes estão abaixo de 5 °C. Além disto, 35 % da superfície da Terra é coberta por neve, 24 % por *permafrost* (solos permanentemente congelados), 13 % por gelo marinho e 10 % por geleiras. Os ambientes frios são ainda compreendidos pelas regiões polares Ártico e Antártica, somado a regiões montanhosas como os alpes, seguidos por subsolos, desertos, lagos e cavernas (MARGESIN; MITEVA, 2011).

Tabela 1. Principais terminologias associadas aos micro-organismos de ambientes extremos.

Micro-organismo	Pressão Seletiva
Psicrófilo	Baixas temperaturas (ótimo < 15 °C)
Termófilo	Altas temperaturas (ótimo > 40 °C)
Alcalófilo	Ambientes alcalinos (ótimo > pH 8,5)
Acidófilo	Ambientes ácidos (ótimo < pH 3)
Barófilo ou Piezófilo	Altas pressões hidrostáticas (acima de 130MPa)
Xerófilo	Ambientes com baixa atividade de água (< 80 Aw)
Halófilo	Ambientes salinos (> 2M de NaCl)
Metalotolerante	Ambientes com elevadas concentrações de metais pesados
Oligotrófico	Ambientes com limitação de nutrientes
Osmofílico	Altas concentrações de açúcares
Radio-resistente	Altos níveis de radiação ionizantes como UV

Os micro-organismos que sobrevivem nos ambientes frios desempenham papel chave em seus habitats e incluem representantes dos três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya (MARGESIN; MITEVA, 2011). Estes organismos são denominados psicrófilos e psicrotolerantes, sendo os psicrófilos aqueles organismos que possuem temperatura máxima de crescimento inferior a 20 °C e com temperatura ótima de crescimento inferior ou igual a 15 °C e psicrotolerantes aqueles organismos que possuem habilidade de crescer em baixas temperaturas, entretanto sua temperatura ótima de crescimento é acima de 20 °C (MOYER; MORITA, 2007). No entanto, o limite mínimo de temperatura para os micro-organismos psicrófilos não é bem estabelecido (MAAYER et al. 2014), havendo relato de reprodução microbiana a -12 °C e função metabólica a -20 °C (RIVKINA et al., 2000).

Em diferentes ambientes extremos há relatos da ocorrência de fungos, destacando-se as leveduras dos gêneros polifiléticos *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, constatemente isoladas a partir de amostras ambientais de ambientes extremos, tais como, ambientes aquáticos de alta acidez (pH de 1,8) como o rio Agrio de região vulcânica da Patagônia Argentina (RUSSO et al., 2008), ambientes hipersalinos (BUTINAR et al., 2005); regiões de alta altitude e elevado índice de radiação UVA e UVB (LIBKIND et al., 2009) e regiões frias como os Alpes (MARGESIN; FELL, 2008), Antártica (CARRASCO et al., 2012) e o Ártico (HATHA et al., 2013).

2.2 Características do Ambiente Antártico

A região Antártica é a região localizada abaixo do paralelo 60 °S (Figura 1), divisível em três sub-regiões ecologicamente circumpolares, cada região oferecendo oportunidades limitadas aos

organismos ali presentes. A região de alta latitude, mais interna, é a chamada Antártica continental, uma camada coberta de gelo chegando a mais de 4250 m, o que impõe as condições de vida mais rigorosas. A região marítima, mais ampla e mais claramente definida contendo a Península Antártica, possui verões mais longos e mais quentes que o continente. Por fim, a região subantártica, incluindo as ilhas (Geórgia do Sul, *Bouvet*, *Heard* e *Macdonald*) espalhadas em uma vasta extensão de oceano o suficiente para ser livre de blocos de gelo no inverno, e é consequentemente mais quente durante todo o ano (BOLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002).

Figura 1. Mapa da região Antártica abaixo do paralelo de 60° S indicando a localização do arquipélago *Shetlands* do Sul. A linha tracejada representa a transição entre a Antártica Continental e a Antártica Marítima. Fonte: Bölter; Beyer; Stonehouse (2002) com modificação.

A Antártica é o continente mais remoto e inóspito, possuindo o clima mais frio e seco conhecido do planeta Terra (D'ELIA, 2008; ROGERS et al., 2007). Dentre as características inóspitas que prevalecem neste continente destacam-se a baixa temperatura, variando nos vales secos de McMurdo entre -20 °C a -50 °C no inverno, temperatura média mensal inferior a 0 °C e freqüentes ciclos de congelamento e degelo. Este continente apresenta ainda ventos fortes, alta sublimação e evaporação, elevada incidência de radiação, especialmente UV, alternados com prolongados

períodos de escuro, os quais representam fatores limitantes para o desenvolvimento de qualquer forma de vida (ONOFRI et al., 2007; D'ELIA, 2008; YERGEAU; KOWALCHUK, 2008).

A região Antártica marítima (região de estudo do presente trabalho) possui características mais amenas que aquelas da região continental, com temperatura mensal nos meses mais quentes variando de -10 a +2 °C, e no inverno raramente fica abaixo de -15 °C, a precipitação anual de 20-100 mm, solos húmicos e vegetação composta principalmente por líquens, musgos, algas e duas angiospermas que não ocorrem na região continental: *Deschampsia antarctica* Desv., Poaceae e *Colobanthus quitensis* Kunth. Bartl., Caryophyllaceae (BOLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002).

No entanto, essas condições ambientais são pouco uniformes, havendo variações nos diferentes nichos do ambiente Antártico, incluindo os tipos de solos, sedimentos, rochas, assim como a neve e o gelo que podem variar em seu regime térmico, nutricional, atividade de água e salinidade (RUISI et al., 2007). Estas características ambientais bastante restritivas do continente Antártico têm despertado grande interesse biotecnológico, uma vez que os micro-organismos adaptados a este ambiente possuem uma enorme diversidade metabólica (D'ELIA, 2008; MARGESIN; MITEVA, 2011).

Os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares, em um ambiente de características tão restritivas como o continente Antártico, chegam a ser exclusivamente formados por micro-organismos, os quais possuem um papel fundamental no transporte de energia, matéria, reciclagem e mineralização de nutrientes, constituindo a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos neste continente (ONOFRI et al., 2007; ROGERS et al., 2007; RUISI et al., 2007; VINCENT, 2000; YERGEAU; KOWALCHUK, 2008).

2.3 Macroalgas do Ambiente Antártico

Macroalgas são organismos multicelulares clorofilados, os quais possuem ampla distribuição em diferentes regiões litorâneas de todo o planeta (MEDEIROS, 2013; WIENCKE, 1996; WIENCKE et al., 2007). São predominantemente de ambiente aquático, podem ser livres ou sésseis, geralmente aderidas a um substrato sólido, como costões rochosos (Figura 2), corais, dentre outros (KOLANJINATHAN; GANESH; SARANRAJ, 2014).

Figura 2. Macroalgas *Adenocystis utricularis* (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg 1907 associadas a costões rochosos na região entre marés na ilha *Half Moon* (Antártica marítima). Fonte: Alysson Duarte.

Embora as macroalgas desempenhem um papel essencial na vida marinha devido à ciclagem de nutriente e produção de O_2 , produção de metabólitos bioativos, dentre outras funções, o conhecimento acerca de diversidade de macroalgas na Antártica é subestimado (MEDEIROS, 2013). O conjunto de macroalgas que ocorre ao longo da Península Antártica frequentemente domina comunidades marinhas rasas, com biomassa variando de 5 a 10 Kg por metro quadrado. Estes níveis de cobertura são comparáveis aos níveis de biomassa de algas em ambiente de clima temperado (WIENCKE; AMSLER, 2012).

As macroalgas podem ser classificadas em a) macroalgas verdes, incluídas no Filo Chlorophyta, possuem pigmentos como clorofila a, b e carotenóides, principalmente β -caroteno, luteína e neoxantina; b) macroalgas vermelhas, pertencem ao Filo Rhodophyta e seus pigmentos fotossintéticos são a clorofila a e são os ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina) e carotenóides, principalmente β -caroteno e zeaxantina e luteína; c) macroalgas pardas incluídos no Filo Ochrophyta, Classe Phaeophyceae e os seus pigmentos incluem o clorofilas a e c, assim como os carotenóides, principalmente fucoxantina (CARDOSO et al., 2014). Além do pigmento, características como morfologia e estruturas reprodutivas são utilizadas na classificação de algas (KOLANJINATHAN; GANESH; SARANRAJ, 2014).

No ambiente Antártico ocorrem macroalgas dos três Filos e devido às características adversas e ao isolamento da flora bentônica daquele ambiente há um alto grau de endemismo, onde cerca de 35 % das macroalgas que ocorrem na Antártica são endêmicas (WIENCKE; AMSLER, 2012). Segundo Wiencke e Clayton (2002) na região Antártica foram catalogadas 96 espécies de macroalgas, destas 16 pertencentes a Chlorophyta, 19 a Phaeophyceae e 61 a Rhodophyta, das quais 3, 12 e 24 são

endêmicas, respectivamente. Mais recentemente, Wulff et al., (2011) reportou a ocorrência de cerca de 120 espécies de macroalgas na região Antártica.

Dentre as macroalgas endêmicas daquela região, estão as algas pardas da ordem Ascoseirales e representantes dos gêneros *Himantothallus*, *Cystosphaera*, *Phaeurus*. Entre as algas Rhodophyta são endêmicas representantes dos gêneros *Gainia*, *Notophycus* e *Antarcticothamnion*. Quanto às algas Chlorophyta, a endemidade é reportada para os gêneros *Lambia* e *Lola*. Dentre as espécies endêmicas mais conhecidas, estão *Himantothallus grandifolius*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Porphyra endiviifolium* e *Lambia antarctica* (WIENCKE; AMSLER, 2002).

Durante a OPERANTAR XXV (verão de 2006/ 2007) Oliveira et al., (2009) avaliaram a diversidade de macroalgas que ocorrem na região da Baía do Almirantado (Ilha Rei George), onde 42 espécies de macroalgas foram recuperadas, sendo 21 Rhodophyta, 14 de Phaeophyceae e 7 de Chlorophyta, aumentando em 31 % o conhecimento da diversidade de macroalgas naquela região.

Estudos que associam a diversidade fúngica a macroalgas do ambiente Antártico são recentes (FURBINO et al., 2014; GODINHO, et al., 2013; LOQUE et al., 2010). Alguns autores sugerem que a associação de fungos com macroalgas pode ser estabelecida por uma relação de endossimbiose, relação semelhante à das plantas terrestres com micro-organismos endofíticos (HARVEY; GOOFF, 2010; SURYANARAYANAN; JOHNSON, 2014).

As macroalgas são utilizadas desde os povos antigos como alimento, fertilizantes e como alimento com atividade medicinal (KOLANJINATHAN; GANESH; SARANRAJ, 2014). Dentre os principais produtos comercializados a partir de macroalgas estão os polissacarídeos como ágar, alginato, carragenana. Além disto, os polissacarídeos não gelificantes, além de pigmentos, proteínas, aminoácidos e compostos fenólicos são alguns dos compostos utilizados na indústria alimentícia de origem de macroalgas. Mais recentemente, além da indústria alimentícia, produtos derivados de algas têm sido utilizados nos setores de cosméticos e produtos farmacêuticos (CARDOSO et al., 2014). Nesse sentido, o entendimento da diversidade microbiana associada a estes substratos pode elucidar algumas propriedades importantes atribuídas as macroalgas tais como atividade antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e citotóxica, dentre outras atividades biológicas (SURYANARAYANAN; JOHNSON, 2014).

2.4 Líquens do Ambiente Antártico

Algumas características do ambiente Antártico afetam diretamente o desenvolvimento de qualquer forma de vida vegetal, dentre elas, a baixa temperatura média, as amplas variações de temperatura diária, os frequentes ciclos de congelamento e descongelamento, os ventos fortes, baixa precipitação, a prevalência de gelo e rochas nuas, tipos de solos pobres (ornitogênicos e solos

minerais), baixa disponibilidade de água, os ineficientes sistemas de drenagem do solo, a baixa disponibilidade de nutrientes, além das poucas fontes de propágulos e dos substratos inóspitos (BOLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002).

A habilidade de sobreviver as estas condições adversas requer dos organismos uma ampla variedade de adaptações. Neste sentido, os líquens são os organismos predominantes da vegetação antártica. Líquens são organismos pioneiros em ambientes de clima frio, estando bem adaptados às condições extremas como alta radiação UV, dessecação e as baixas temperaturas (BOLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002; HOVENDEN; SEPPELT, 1995; ØVERSUSTEDAL; SMITH, 2004).

Líquens (do grego *Leikhen* = planta rastejante) são estruturas bastante complexas e caracterizam-se por serem simbioses mutualísticas envolvendo um organismo fotobionte (alga e/ou cianobactéria) e um organismo micobionte (fungo filamentosos) (YAVUZ, 2012). Segundo a Associação Internacional de Lichenologia a definição a rigor é "(...) associação de caráter permanente entre um fungo e um simbiote fotossintético da qual resulta em um talo estável".

Os fungos filamentosos em geral, fornecem a estrutura e forma geral, cujas hifas podem absorver água e sais minerais para o organismo. Por outro lado, o componente fotobionte é capaz de realizar fotossíntese e por conseguinte fornecer os nutrientes ao líquen. O corpo principal do líquen é chamado o talo, em geral encontra-se fixado ao substrato por estruturas chamadas rizinas (parte dos fungos). O talo é geralmente composto de muitas camadas, com hifas aprisionando os fotobiontes, podendo esta associação ser de um organismo micobionte e um ou mais organismo fotobionte (CAMPBELL; REECE, 2005; PARK et al., 2014). Dos fungos liquenizados, menos de 5 % pertencem ao Filo Basidiomycota, sendo mais de 95 % pertencente ao Filo Ascomycota (PARK, et al., 2014).

Park et al., 2014 avaliaram a relação entre alga e fungos dos líquens *Cladonia borealis* S. Stenroos, *Cladonia gracilis* (L.) Willd e *Umbilicaria antarctica* Frey & I.M no ambiente Antártico (Ilha Rei George) e observaram que mesmo em um ambiente tão extremo, os líquens ali encontrados podem ser chamados de ecossistemas em miniatura em vez de indivíduos simbióticos simples. A maioria das amostras continha várias espécies de algas em um único talo, e até mesmo diferentes genótipos de uma mesma espécie de alga. Além disto, todas as amostras continham genótipos principais ou dominantes de algas e a seleção de genótipos de algas era dependente das espécies micobiontes relacionadas.

A estrutura geral dos líquens pode ocorrer em três formas de crescimento: i) os líquens crustáceos, os quais crescem em crosta fina sobre a superfície do substrato, devido a aderência ao substrato, para remove-los é necessário também remover parte do substrato; ii) líquens foliáceos sendo aqueles de dimensões e forma laminar, aderindo ao substrato por um ou mais pontos por suas rizinas; e iii) líquens fruticulosos os quais possuem talo de forma cilíndrica e de crescimento

semelhante a arbusto (CAMPBELL; REECE, 2005; PARK et al., 2014). No ambiente Antártico ocorre as três formas de líquens, sendo os líquens crustáceos aqueles com maior prevalência (Figura 3).

Figura 3. (A) Líquens crustáceos aderidos a rochas na ilha *Half Moon* (Antártica marítima); **(B)** Líquens fruticulosos *Usnea* sp. aderidos a rochas na ilha Nelson (Antártica marítima). Fonte: Alysso Duarte.

A maioria dos líquens da Antártica ocorre na forma crustácea, e a estrutura micobionte pode produzir esporos para reprodução (KAPPEN, 2000). Os líquens podem se reproduzir por reprodução sexuada quanto assexuada. O componente micobionte produz esporos, os quais são transportados a outro local e encontrando um organismo fotobionte adequado, haverá, então a formação de um novo líquen (KAPPEN, 2000). Além disto, pode ocorrer fragmentação do líquen original ou formação de pequenos aglomerados de hifas com algas que se partem e acabam aderindo a um outro substrato, chamado soledia (CAMPBELL; REECE, 2005).

Espécies classificadas como tolerantes ao estresse geralmente possuem baixas taxas de crescimento, alta plasticidade nutricional evidenciado pelas altas taxas de retenção de nutrientes e baixa plasticidade fenotípica para responder às pressões ambientais. Neste sentido, os líquens podem se desenvolver em condições variadas de estresse e são conhecidos pela considerável plasticidade (COLESIE et al., 2014). Domaschke et al. (2013) compararam líquens de regiões temperadas com aqueles das regiões polares e observaram que uma mesma espécie de líquen, a depender do local de coleta, pode sofrer alterações na taxa fotossintética máxima, temperatura ótima para a fotossíntese líquida (PN) e números de organismos fotobiontes.

A taxa de crescimento dos líquens, em geral é de 1cm por ano, entretanto, essa taxa de crescimento é de 1cm a cada 100 anos na região Antártica marítima e na região continental muitas vezes o crescimento é de 1 mm a cada 100 anos, como ocorre com a espécie endêmica da região

Antártica *Buellia frigida* encontrada na região do Vales secos de McMurdo 78 °S (SANCHO; GREEN; PINTADO, 2007). Devido ao crescimento lento e a sensibilidade a poluentes ambientais, os líquens muitas vezes são utilizados como indicadores de mudança climática ambientais (GREEN et al., 2012).

Segundo Øversustedal; Smith 2011, mais de 500 espécies de líquens ocorrem na Antártica, sendo esta a vegetação dominante naquele ambiente, reforçando assim a importância destes para a dinâmica do ecossistema polar. Por apresentar parte do ano completamente coberta de gelo e neve, os líquens dão uma coloração diferencial, principalmente durante os meses de verão na península Antártica, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4. Líquens crustáceos alaranjados aderidos a rochas na ilha Nelson (Antártica marítima).

Fonte: Alysson Duarte.

Regiões frias como as dos polos (Ártico e Antártico) são ricas em pedras e habitats rochosos. A rocha representa um substrato para líquens e consequentemente para os micro-organismos, conhecidos como endolíticos. As condições na superfície da rocha são mais severas que aquelas encontradas internamente (SELBMANN et al., 2005). Fungos não liquenizados que sobrevivem em rocha de regiões polares são os criptoendolíticos, os quais se estabelecem sob uma crosta abiótica sobre as sucessivas camadas de superfície da rocha. Leveduras pigmentadas não liquenizadas *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* são comumente isoladas de substratos rochosos de ambiente de clima frio (ZALAR; GUNDE-CIMERMAN, 2014). Entretanto, a diversidade de leveduras cultiváveis associada a líquens é praticamente desconhecida. Os micro-organismos associados a estes substratos podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de adaptação e/ou tolerância dos líquens aos diversos fatores ambientais extremos aos quais estão submetidos.

Em comparação as funções bem conhecidas dos fungos filamentosos e das algas, pouco se conhece acerca das funções de bactérias e leveduras associadas aos líquens (DEPRIEST et al., 2000; GRUBE et al., 2015). A diversidade bacteriana associada a líquens tem sido recentemente abordada com as técnicas de sequenciamento de nova geração. Neste sentido, comunidades bacterianas estáveis, específicas e estruturalmente integradas a líquens foram identificadas, ampliando assim a visão simplista de líquens como organismos simbioses entre micobiontes e fotobiontes (GRUBE et al., 2015). Compostos com atividade farmacológica, pigmentos com atividade fotoprotetora, principalmente contra a radiação UVB, além de produção de proteínas anticongelantes e potencial na degradação de bioplástico são algumas das aplicações biotecnológicas relacionadas aos líquens (OKSANEN, 2006). Entretanto, parte dessa atividade biológica relacionada aos líquens podem estar relacionada a metabolismo secundário de micro-organismos associados.

Selbmann et al., 2010 avaliaram a diversidade bacteriana associada a líquens do ambiente Antártico (*Lecanora fuscobrunnea*, *Umbilicaria decussata*, *Usnea antarctica*, *Xanthoria elegans*) e observaram uma diversidade composta por diferentes gêneros bacterianos, tais como *Arthrobacter*, *Knoellia*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azotobacter* e *Deinonoccus*, entretanto a diversidade fúngica não foi avaliada. Dados de diversidade fúngica associada a líquens são escassos, exceto quando se refere a fungos liquenizados, os quais compõe a estrutura micobionte dos líquens e são mais conhecidos.

2.5 Leveduras do ambiente Antártico

O conhecimento sobre a diversidade biológica no ambiente antártico durante muitos anos esteve relacionado apenas à animais superiores como os peixes, aves e mamíferos marinhos, sendo os micro-organismos raramente contemplados (VICENT, 2000). Nos últimos anos, após a introdução das técnicas moleculares, o conhecimento sobre evolução, endemismo, invasão e seleção microbiana no continente Antártico tem sido abordado. Porém, o conhecimento das relações e evolução de muitos grupos taxonômicos microbianos neste continente ainda é escasso, especialmente no que diz respeito às leveduras (FRATE; CARETTA, 1990; KLINGLER; VISHNIAC, 1998; RAY et al., 1989; RUISI et al., 2007; VAZ et al., 2011; CARRASCO et al., 2012).

Nas últimas décadas, estudos têm abordado a biodiversidade de bactérias e arqueias psicrófilas associadas a algas e outros substratos, sendo escassos os trabalhos relacionados ao conhecimento da diversidade fúngica nos ecossistemas Antárticos, embora estes micro-organismos representem um potencial de exploração biotecnológica de valor inestimável a ser conhecido e explorado (FENICE et al., 1997; BRADNER, 2003; BARBIER, 2009; JURGENS, 2010).

A maior parte dos fungos que ocorre na Antártica é cosmopolita, alguns foram transportados para a Antártica por correntes marítimas ou animais migratórios, enquanto outros, chamados indígenas, estão bem adaptados a este ambiente, sendo capazes de crescerem e se reproduzirem mesmo em baixas temperaturas (RUISI et al., 2007).

As leveduras são geralmente de fácil dispersão e capazes de colonizar uma grande variedade de substratos, além de suportarem condições ambientais extremas (KAVANAGH, 2005). Temperaturas baixas causam diferentes injúrias aos sistemas biológicos, dentre elas, aumento da viscosidade celular, formação de cristais de gelo, redução da fluidez de membrana, diminuição da difusão de solutos e redução da cinética enzimática e das interações moleculares (MAAYER et al., 2014). Assim, mecanismos de tolerância aos diferentes fatores ambientais “extremos” são necessários para sobrevivência no continente Antártico. Dentre os mecanismos que têm sido observados em micro-organismos recuperados neste continente estão: produção de proteínas anti-congelantes por isolados de lagos hipersalinos Vestfold Hills e Larsemann (GILBERT et al., 2004); resistência à dessecação em isolados recuperados a partir de amostras de solo dos Vales secos de McMurdo (DARTNELL et al., 2010); resistência a altas doses de radiação UV em isolados obtidos de rochas (ROMANOVSKAIA et al., 2010).

A capacidade de tolerar ao binômio (temperatura baixa e alta concentração salina) é condição necessária à adaptação e sobrevivência do fungo a ambientes extremos de gelo glacial (RAY et al., 1989; ROBINSON, 2001; RUISI et al., 2007). Fungos isolados do gelo ártico subglacial demonstraram características de micro-organismos halófilos e psicrófilos (BRADNER, 2003). Em adição, a produção de pigmentos como a melanina, pode atuar como um mecanismo protetor a alta incidência de radiação ultravioleta no continente Antártico (VAZ et al., 2011). Muitas vezes, as estratégias individuais de resistência às condições extremas não são específicas para um fator individual somente, mas sim para mais de uma condição adversa (RUISI et al., 2007).

A descrição de novos táxons de leveduras recuperadas de ambientes frios nos últimos anos indica que estes ambientes representam uma fonte de novos recursos genéticos a serem explorados: *Rhodotorula psychrophila* sp. nov. *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. e *Rhodotorula glacialis* sp. nov. (MARGESIN, et al., 2007); *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., (MARGESIN; FELL, 2008), *Rhodotorula himalayensis* sp. nov. (SHIVAJI et al., 2008) *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. e *Mrakiella niccombsii* sp. nov. (THOMAS-HALL et al., 2010); *Rhodotorula portillonensis* sp. nov. (LAICH; VACA; CHAVEZ, 2013) *Cryptococcus vaughanmartinae* sp. nov. e *Cryptococcus onofrii* sp. nov. (TURCHETTI et al., 2014); *Cryptococcus fildesensis* sp. nov. (ZHANG et al., 2014); *Rhodotorula svalbardensis* sp. nov. (SNGH et al., 2014).

Dentre as leveduras encontradas no ambiente Antártico predominam os gêneros *Cryptococcus* (ordens Filobasidiales e Tremellales) e *Rhodotorula* (ordem Cystobasidiales). Dentre as

espécies frequentemente reportadas no ambiente Antártico podemos destacar: *Leucosporidium antarcticum* (TURKIEWICZ et al., 2005), *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii* (ZLATANOV; PAVLOVA; GRIGOROVA, 2001), *Debaryomyces hansenii*, *Dipodascus australiensis*, *C. albidosimilis*, *Malassezia restricta*, *Sporidiobolus salmonicolor* (ANENZ et al., 2006), *Rhodotorula rubra*, *Bullera alba*, *Candida humicola*, *C. famata*, *C. ingeniosa*, *C. auriculariae* (RAY ET AL., 1989) e *C. antarctica* (MARÍA et al., 2005), estando esta última envolvida em processos de patentes (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008).

A maioria das espécies de fungos descrita a partir da região Antártica foi recuperada de amostras de sedimentos marinhos (RUISI et al., 2007), embora o ambiente terrestre (solos ornitogênicos, costeiros, turfas e permafrost) seja uma fonte rica de gêneros microbianos raros, como os micro-organismos criptoendolíticos, os quais sobrevivem e colonizam rochas expostas nestas regiões, chegando a formar biofilmes (BARBIER, 2009; KRISHNAN et al., 2014; VAZ et al., 2011). A exploração da biodiversidade microbiana Antártica é recente e extremamente promissora, pois a escassez de conhecimento sobre a micobiota Antártica poderá propiciar a descoberta de novas espécies fúngicas e de novos compostos naturais de interesse em diversos setores tecnológicos (FELLER; GERDAY, 2003; FENICE et al., 1997; JURGENS, 2010).

2.5.1 Caracterização taxonômica de leveduras

Estimativas recentes baseadas em métodos de sequenciamento de alto desempenho sugerem a existência de mais de 5,1 milhões de espécies de fungos (BLACKWELL, 2011). Entretanto, o Dicionário de Fungos (KIRK et al., 2008) reporta a existência de apenas 97.330 espécies cientificamente descritas. Esses dados revelam o baixo conhecimento da diversidade fúngica, que estaria em torno de 1,9%, se considerarmos os números acima reportados. Ambientes pouco explorados, como o continente Antártico, possuem uma diversidade microbiana praticamente desconhecida e potencialmente promissora (CLARK et al., 2004; BARBIER, 2009). Desta forma, a caracterização taxonômica e preservação apropriada dos micro-organismos são imprescindíveis para que a diversidade microbiana Antártica seja conhecida, devidamente mantida e posteriormente utilizada (JURGENS, 2010; KLINGLER; VISHNIAC, 1988).

A identificação clássica (convencional) das leveduras é baseada em características morfológicas e fisiológicas, como assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Entretanto, muitas vezes os resultados destes estudos são ambíguos, devido a variações (polimorfismos) que ocorrem dentro de uma espécie e às similaridades metabólicas entre espécies diferentes (FELL et al., 2000; KURTZMAN, 1998). Atualmente, as técnicas de biologia molecular têm sido largamente utilizadas na taxonomia fúngica, sendo o sequenciamento da região D1/D2 do gene DNAr 26S a metodologia indicada para a identificação molecular das leveduras. De acordo com

Kurtzman; Robnett (1998), o sequenciamento de genes do *operon* ribossomal é uma técnica extremamente valiosa e confiável e permite a elucidação da filogenia de leveduras. Entretanto, alguns grupos de leveduras possuem o domínio D1/D2 do gene DNAr 26S muito conservado, além da região ITS1-ITS2, não sendo possível a distinção entre espécies diferentes por estes genes ribossomais. Neste sentido, o sequenciamento de outros genes podem auxiliar na identificação destas leveduras, tais como, o sequenciamento dos genes da RNA polimerase II, gene da piruvato descarboxilase e gene da citocromo oxidase (BEH et al., 2006).

As leveduras constituem um grupo filogeneticamente diverso, encontradas nos filos Ascomycota e Basidiomycota e no grupo dos anamórficos. Os fungos são organismos que podem apresentar dois nomes válidos, a depender do estágio de reprodução, teleomófico quando sexual e anamorfo quando ocorre no estágio assexual (ANCHORENA-MATIENZO, 2002; KURTZMAN; FELL, 2006).

Organismos Ascomycota, em geral, possuem estruturas de reprodução chamadas ascos, além de conteúdo de G + C abaixo de 50 % (entre 27 a 50 %). Essas leveduras são agrupadas em quatro classes: Neoelectromycetes, Pneumocystidomycetes, Schizosaccharomycetes, e Taphrinomycetes. Por outro lado, as leveduras Basidiomycota possuem com um ciclo sexual distinto e com a produção de esporos dentro de basídeos. As leveduras basidiomicéticas apresentam conteúdo de G + C, em geral acima de 50 % (entre 50 a 70 %) e são divididas em três subfilos/classes: Pucciniomycotina, Agaricomycotina e Ustilaginomycotina (BOEKHOUT et al., 2011; CHOUDHARY; JOHRI, 2009).

Dentre as leveduras recuperadas com maior frequência em amostras da Antártica estão *Rhodotorula* e *Cryptococcus*, sendo este último o mais predominante no ambiente Antártico (CHOUDHARY, JOHRI, 2009). *Cryptococcus* é um grupo polifilético que apresenta células esferoidais, ovais, elípticas ou alongadas. Em geral, possuem cápsula de polissacarídeos e a reprodução ocorre por brotamento enteroblástico, sendo este multilateral ou polar. Esses micro-organismos produzem pseudo-hifas ou hifas verdadeiras (CHOUDHARY, JOHRI, 2009; KURTZMAN; FELL, 2006). *Rhodotorula* também é um gênero polifilético e apresenta crescimento em forma sub-globosa, ovóide, elipsóide, ou alongada. A reprodução ocorre por brotamento multilateral ou polar. Podem produzir pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. Algumas cepas podem sintetizar pigmentos, que podem ser de coloração vermelha a amarela. A maioria das espécies de *Rhodotorula* são do subfilo Pucciniomycotina (SAMPAIO, 2011).

2.6 Bioprospecção em ecossistemas Antárticos: Enzimas Adaptadas ao Frio

As enzimas de micro-organismos psicrófilos possuem alta atividade específica em baixas temperaturas, propriedade extremamente útil em diversos setores da indústria biotecnológica

(SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). Mais recentemente, o estudo destas enzimas tem sido estimulado visando diminuição do consumo de energia elétrica no setor industrial (GERDAY et al., 2000). Uma importante característica das enzimas psicrofílas é a correlação da alta atividade catalítica e a estabilidade térmica a temperaturas baixas, que pode ser parcialmente explicado pelo aumento da flexibilidade da molécula, em comparação com enzimas mesófilas e termófilas (GEORLETTE et al., 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

A compreensão das relações entre a estabilidade térmica, flexibilidade e eficiência catalítica das enzimas psicrofílas é de fundamental importância para uma posterior aplicação destas no setor biotecnológico e posteriores experimentos de mutagênese direcionada, complementada por evolução dirigida, buscando-se uma otimização da biocatálise por psicrofílos (GEORLETTE et al., 2004; D'AMICO et al., 2006). A maior flexibilidade das enzimas adaptadas ao frio é devido à menor quantidade de pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto nestas proteínas em comparação aos homólogos de micro-organismos mesófilos (GOMES; STEINER, 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). Entretanto, a taxonomia, ecologia, bioquímica e fisiologia dos organismos psicrofílos estão em fase inicial de investigação, o que torna os micro-organismos associados ao ambiente Antártico promissores para setor biotecnológico (GERDAY et al., 2000; GOMES; STEINER, 2004).

A levedura anamórfica *Pseudozyma antarctica*, subfilo Ustilaginomycotina e Classe Ustilagomycetes foi isolada inicialmente em 1980 a partir de sedimentos do Lago Vanda na Antártica (lago permanentemente coberto por gelo) e representa o grande potencial dos micro-organismos do ambiente Antártico (MARÍA et al., 2005). Esta levedura tem sido extensivamente estudada devido a produção de duas isoformas de lipases com características diferenciadas: Lipase A e Lipase B (MARÍA et al., 2005; QIAN et al., 2009). Além da produção de lipases, tem sido relatada a produção de lipídeos mannosylerythritol (MEL) por *P. antarctica*. Estes compostos possuem atividade biosurfactante e características únicas com excelente atividade de superfície, o que amplia as diferentes aplicações que vão desde a utilização dos surfactantes no setor ambiental para remoção de poluentes orgânicos a atividade antitumoral e de indução de diferenciação celular (MORITA et al., 2014). Assim, tem sido frequente os depósitos de patentes envolvendo processos com esta levedura inicialmente isolada no ambiente Antártico, ressaltando o potencial biotecnológico da prospecção neste ambiente.

Nesta perspectiva, o Brasil tem incentivado as atividades de pesquisas na Antártica objetivando geração de conhecimento e a utilização dos organismos que habitam o ambiente polar. O estabelecimento de um programa de prospecção biotecnológica de organismos marinhos e terrestres na região Antártica, visando identificação de recursos genéticos com potencial econômico é uma diretriz prioritária do Plano de Ação (2011-2014) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

2.6.1 Lipases microbianas: Características, produção e aplicações de lipase

As lipases compreendem um grupo de enzimas ubiquitárias (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) encontradas em vegetais, animais e micro-organismos. Sua função é catalisar a reação de hidrólise de triacilglicerol obtendo ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol. Essa reação é reversível e, portanto, essas enzimas catalisam a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo/água. 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 (VAKHL; KOUR, 2006; JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008).

A busca por micro-organismos que produzem lipases é especialmente interessante em função da especificidade e das diferentes possibilidades de aplicação destas enzimas. As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação e interesterificação, com extrema simplicidade de processo, qualidade superior do produto final e excelente rendimento. Ressaltando as lipases oriundas de micro-organismos psicrófilos, uma vez que além das características descritas apresentam alta atividade catalítica mesmo em baixas temperaturas (JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008; PFEFFER, 2008).

As lipases de origem microbiana possuem aplicação biotecnológica crescente devido, principalmente à: estabilidade em solventes orgânicos, estabilidade frente à temperatura e pH; não necessidade de co-fatores; especificidade com substratos e alta enantiosseletividade (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). 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. Dentre as leveduras capazes de sintetizar lipases destacam-se os gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* e *Yarrowia* (VAKHLU; KOUR, 2006). As lipases produzidas pelo gênero *Candida* apresentam excelente capacidade de esterificação (MARÍA et al., 2005).

A síntese de lipase pelos micro-organismos é influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio; presença de indutores e inibidores; presença de agentes que afetam a interface óleo/água; temperatura de incubação, pH do meio de cultura e inóculo (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006). Para obter a condição ótima de produção de lipase é necessário estudar a influência desses fatores na biossíntese da enzima (VAKHLU; KOUR, 2006). Dentre os substratos utilizados para produção de lipases estão os óleos vegetais, especialmente, o azeite de oliva e o óleo de soja, gorduras de origem animal, óleos de peixes e alguns triacilglicerídeos sintéticos como a trioleína. Entre as características desejáveis das lipases comerciais, principalmente daquelas envolvidas em processos de lavagens industriais, destacam-se a tolerância a pH alcalino e a termoestabilidade. A

maioria das lipases reportadas em literatura apresenta atividade em pH neutro (SAVITHA et al., 2007).

As lipases de micro-organismos psicrófilos possuem aplicação potencial em diferentes setores industriais, a saber:

a) Indústria alimentícia e de bebidas, utilizadas para reduzir o teor de gordura, produção de ácidos graxos e interestificação de gorduras, melhorando as propriedades organolépticas como sabor, aroma, *flavors* e aparência de alimentos, além de prolongar a conservação (JAEGER; EGGERT, 2002; JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008);

b) Indústria química e farmacêutica, atuando como catalisadores de reações de síntese de compostos opticamente ativos, de butil lactato por transesterificação e lipídeos específicos, produção de surfactantes, além da utilização como auxiliar em medicamentos para dietas (GERDAY et al., 2000; JOSEPH et al., 2007; JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008);

c) Indústrias papeleras 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 (SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006; VAKHLU; KOUR, 2006);

e) Indústria de biorremediação, onde são utilizadas em tratamento de efluentes, em especial em regiões de clima temperado e limpeza de sujidades a base de óleos e gorduras, em especial em equipamentos ou tubulações em fluxogramas de processos industriais (JOSEPH et al., 2007; MARGESIN; SCHINNER, 1999; MARGESIN, 2000).

O tratamento de efluentes industriais e poluentes ambientais a base de óleos em regiões de clima temperado tem recebido atenção especial, estimulando o estudo de enzimas microbianas que possuam atividade catalítica em baixas temperaturas (MARGESIN; SCHINNER, 1999; MARGESIN, 2000), podendo as lipases de fungos psicrófilos ou psicrotolerantes serem aplicadas na biorremediação destes ambientes. Além disto, os micro-organismos produtores de lipases estáveis a baixas temperaturas e isolados de ambiente marinho podem ser aplicados em regiões oceânicas acometidas por derramamento acidental de óleo, uma vez que estes micro-organismos já estão adaptados às condições de salinidade destes ambientes (JOSEPH et al., 2007; MARGESIN; SCHINNER, 1999; MARGESIN, 2000).

A grande diversidade de lipases fúngicas extracelulares ocorre devido a diferentes formas de expressões gênicas. Nas leveduras, as lipases são codificadas por uma família de genes (genes lip) ou família multigenes, os quais variam de acordo com a espécie de levedura em estudo (LEE et al., 1999; QIAN et al., 2009; VAKHLU; KOUR, 2006). Em *Candida rugosa* ocorre uma família composta por cinco genes que codificam a lipase, os quais apresentam 80-88 % de similaridade na sequência de nucleotídeos, estando estes genes em um mesmo cromossomo (OHAMA et al., 1993).

2.7 Purificação / Extração Enzimática por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

A definição das operações unitárias em um processo de purificação enzimática depende do uso da molécula alvo, além de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes. Produtos destinados a usos terapêuticos são aqueles que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Para a utilização das enzimas em biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser adequados (GOPINATH et al., 2013; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Os métodos de purificação de lipases são dependentes do micro-organismo, das condições de cultivo, das características da enzima em questão, bem como dos demais componentes da amostra. Ainda assim, micro-organismos da mesma espécie, mas de linhagens diferentes podem apresentar características distintas. Nesse sentido, não há processos de purificação de aplicação geral, estando este dependente da enzima em questão (LIMA, 2004; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2011).

A aplicação das enzimas depende do seu grau de pureza, portanto a purificação é uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, que permite a utilização de pequenas quantidades da enzima. Um problema significativo da purificação é decorrente da complexidade estrutural destas enzimas e da necessidade de manter as suas propriedades biológicas após a aplicação da técnica de purificação (PESSOA e KILIKIAN, 2005). A purificação de lipase tem sido realizada por métodos convencionais, tais como ultrafiltração, precipitação com sais, principalmente sulfato de amônio ou solvente orgânico (etanol e acetona gelada) seguido de etapas cromatográficas utilizando colunas de interação hidrofóbica, troca iônica ou interação por afinidade (SHARMA; SHARMA; SHUKLA, 2011). Estes métodos cromatográficos de purificação em geral demandam muito tempo, baixa perspectiva de escalonamento e custo elevado (OOI et al., 2011). Por outro lado, a depender da utilização da enzima purificada, as técnicas de extração/purificação por SDFA podem auxiliar as técnicas cromatográficas de purificação, sendo aplicada antes da cromatografia (PESSOA; KILIKIAN, 2005; SHARMA; SHARMA; SHUKLA, 2011).

Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) são técnicas de separação para recuperação e/ou purificação parcial de biomoléculas (enzimas e outras proteínas, organelas, vírus e partículas virais) e possuem algumas vantagens quando comparado aos métodos clássicos: simplicidade de escalonamento, volume reduzido de trabalho, rápida separação evitando a desnaturação enzimática (sem solventes orgânicos), rápida transferência de massas (baixa tensão superficial) e separação seletiva (BESEL, 2003; ZHOU et al., 2013).

A formação dos SDFA ocorre quando dois compostos hidrofílicos como polímeros (polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, dextrana, dentre outros) e sais (como fosfatos, sulfatos, citratos, etc.) ou outros polímeros são misturados acima da concentração crítica resultando em duas fases imiscíveis (GARZA-MADRIED et al., 2010). Sistemas de Duas Fases Aquosas também podem ser formados em soluções com surfactantes (HAGA et al., 2013). Neste SDFA, a separação de fases é induzida pelo aumento da temperatura (Figura 5) e influenciado também pela concentração do surfactante, pH do sistema e presença de sais (BESEL, 2003).

Figura 5. Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo não iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas (<20 °C); com o aumento da temperatura ocorre a separação das fases. Fase Top (FT) – fase pobre em micelas e fase Bottom (FB) – fase rica em micelas. Adaptado de Nikas et al. (1992).

Os sistemas SDFA poliméricos mais estudados são aqueles formados por polietileno glicol (PEG)/dextrana e mais recentemente PEG/Sais (Na_2HPO_4 , NaCl ou Na_2SO_4) devido ao baixo custo do PEG e dos sais quando comparado a dextrana (PADILHA; ALEGRE; TAMBOURGI, 2010). A mistura polímero-polímero ou polímero-sal necessária para a completa separação de fases é representada pelo diagrama de equilíbrio de fases, em que a coordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior fase de topo (como o PEG), e a abscissa representa a composição da

molécula de maior concentração na fase de fundo (como o sal ou a dextrana). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, ou curva binodal, levam à formação de duas fases, e abaixo da curva, uma só fase (PADILHA; ALEGRE; TAMBOURGI, 2010; PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Dentre os surfactantes utilizados em SDFA, o detergente não iônico Triton X-114 (polyethylene glycol tert-octylphenyl ether) tem sido muito empregado para separação de biomoléculas (HAGA et al., 2013). A estrutura anfifílica do surfactante TX-114 (com características polar e apolar) induz a formação de micelas, entretanto, formação do sistema micelar é influenciada pela concentração do TX-114 e induzida pelo aumento da temperatura do sistema. Em geral, SDFA são bastante estáveis, pois apresentam alto conteúdo de água, evitando assim a desnaturação de biomoléculas (BESEL, 2003).

Parâmetros físico-químicos como massa molecular e concentração do polímero utilizado, tipo de surfactante utilizado além do pH, da temperatura e da presença de sais inorgânicos influenciam no coeficiente de partição da molécula a ser purificada. Além disto, características da própria enzima como peso molecular, composição (estrutura primária), conformação (estrutura secundária, terciária e quaternária), além da presença de carga elétrica e hidrofobicidade da molécula podem influenciar na separação/extração enzimática por SDFA (SOUZA et al., 2010, BARBOSA et al., 2011). Assim, para cada enzima em questão é necessária uma avaliação da melhor condição de extração e do melhor sistema, não havendo um sistema de extração universal para um grupo ou classe de enzimas.

2.8 Otimização por Delineamento Experimental

A produção enzimática pode ser influenciada por diferentes fatores bióticos e abióticos, os quais incluem: temperatura, pH, aeração, nutrientes, tempo de incubação, entre outros. A triagem e a análise de variáveis que interferem significativamente em um sistema, seja na produção de lipase ou na recuperação desta enzima por SDFA podem ser avaliadas variando-se um fator por vez ou através de métodos estatísticos que combinam diferentes fatores. O procedimento mais comumente utilizado é o procedimento experimental “*one-at-a-time*”, o qual avalia uma variável por vez, fixando-se as demais variáveis envolvidas no processo. Este método não avalia as possíveis interações e os efeitos sinérgicos entre as variáveis estudadas, não explorando completamente o espaço experimental. A técnica do delineamento de experimentos permite identificar as variáveis que impactam significativamente no processo obtendo maior precisão estatística sobre a variável resposta com menor custo e num menor tempo de execução. Esta técnica é útil para se obter informações sobre produtos (produção enzimática, biomassa) e processos (melhor tempo de incubação) baseados em dados observados (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Inúmeras são as definições

para planejamento de experimentos. Spiegel (1982) o define como “o estudo dos métodos de amostragem e dos problemas correlatos que surgem”. Experimentos são utilizados com o intuito de se buscar saber algo sobre um determinado sistema, ou para comparar os efeitos causados por vários fatores num fenômeno (MONTGOMERY, 2001). Portanto, por meio de uma série de testes, são realizadas mudanças ou certos estímulos nas variáveis de entrada (inputs) do sistema, para que se possa observar e identificar os efeitos nas variáveis de resposta ou de saída (output), geradas pelo próprio sistema (MONTGOMERY, 2001; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Inúmeras estratégias podem ser adotadas para execução de um planejamento de experimentos, tais como: bom senso; um fator por vez; tratamentos em pares; tratamentos em blocos aleatorizados; blocos incompletos parcialmente balanceados; quadrado grego-latino; quadrados de Youden; hierárquico; *Plackett & Burman* e experimentos fatoriais completos como o Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR). Cada uma dessas estratégias possui suas particularidades, tornando-as mais adequadas do que outras, dependendo da situação problema que se pretende avaliar (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O delineamento *Plackett-Burman* é classificado como delineamento fatorial fracionado de dois níveis, seus arranjos são criados em tamanhos múltiplos de quatro, compostos de sinais positivos para os níveis superiores, e sinais negativos para os níveis inferiores (MONTGOMERY, 2009; PLACKETT; BURMAN, 1946)

Uma investigação experimental pode iniciar de uma situação de pouca informação quando sequer se conhece a variável mais importante para o sistema em estudo ou o conhecimento se limita a uma pequena experiência prática ou alguma informação bibliográfica. Nessas condições, deve-se fazer uma triagem e descartar as variáveis não significativas. O uso do método proposto por Plackett e Burman (1946) permite estimar todos os efeitos principais com variância mínima. Esta abordagem é muito utilizada em ensaio de *screening* das viáveis importantes no sistema, quando se conhece pouco a respeito dos principais fatores que interferem no processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Tais limitações podem ser eliminadas empregando-se planejamentos experimentais estatísticos que usam um número menor de medidas e explora todo o espaço experimental. A mais bem sucedida técnica usada para análise e otimização das variáveis de um processo é conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que possibilita a avaliação dos efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre uma dada resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é conhecer a diversidade de leveduras associada a diferentes amostras dos ecossistemas marinhos e terrestres da região Antártica e prospectar lipases dos isolados em diferentes condições de cultivo. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

3.1 Identificação das leveduras isoladas de diferentes amostras coletadas no ambiente Antártico no âmbito da OPERANTAR XXVIII (março de 2010);

3.2 Prospecção de lipases produzidas pelas leveduras representantes de grupos taxonômicos distintos isoladas das amostras coletadas na expedição OPERANTAR XXVIII (março de 2010);

3.3 Otimização da produção de lipase por *Leucosporidium scottii* L117 e *Cryptooccus laurentii* L59;

3.4 Caracterização parcial do sobrenadante (extrato bruto) de lipase de *L. scottii* L117;

3.5 Extração da lipase de *L. scottii* L117 por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) e otimização das condições de extração por sistema micelar utilizando TX-114;

3.6 Avaliação da diversidade de leveduras associadas a macroalgas e líquens coletadas no ambiente Antártico durante a OPERANTAR XXXII (Dezembro de 2013) por meio de sequenciamento de marcador taxonômico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

As coletas dos diferentes substratos para isolamento das leveduras associadas foram realizadas em duas expedições científicas a Antártica: XXVIII OPERANTAR (março de 2010) e XXXII OPERANTAR (Dezembro de 2013).

A primeira coleta ocorreu nas proximidades da Ilha Rei George durante a Operação Brasileira de Pesquisa na Antártica – OPERANTAR XXVIII (março de 2010). Esta coleta foi direcionada A diferentes amostras (invertebrados marinhos, líquens, sedimentos marinhos e solos ornitogênicos pedras com líquens e macroalgas). Esta coleta foi realizada no âmbito do projeto CNPq – PROANTAR, coordenado pela Profa. Dra. Vivian Pellizari (IO-USP).

A segunda coleta foi realizada na OPERANTAR XXXII (Dezembro de 2013), a qual foi realizada em diferentes ilhas da Antártica marítima, seguindo o trajeto previamente definido pelo navio Polar Almirante Maximiano H41 da Marinha do Brasil pelo arquipélago das *Shetlands* do Sul. Diferentes amostras foram coletadas, sendo as amostras de macroalgas e líquens utilizadas no presente estudo. Esta coleta foi realizada no âmbito do projeto CNPq - INCT Criosfera coordenado pelo Prof. Dr. Jefferson C. Simões (UFRG).

4.1.1 Coleta realizada em março de 2010

Diferentes substratos foram coletados por Fernando S. Nobre (CPQBA/UNICAMP), Prof. Dr. Eduardo Hadju (UFRJ) e pela equipe da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari (IO-USP) em diferentes pontos de coleta durante expedição a Antártica pelo Programa Antártico Brasileiro em março de 2010 (Figura 6, Tabela 2). Solos de duas diferentes pinguineiras (Demay e Arctowski) foram coletados pelo Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA de Jaguariúna) em expedição realizada em 2009. As amostras foram acondicionadas em sacos esterilizados e refrigeradas até o processamento. As amostras de sedimento marinho e solos de pinguineiras foram acondicionadas em tubos falcons esterilizados e refrigeradas até o processamento.

Figura 6. Mapa da Baía do Almirantado na Ilha Rei George (Península Antártica). O símbolo (▲) indica o local de coleta das amostras em março de 2010.

4.1.2 Coleta realizada em Dezembro de 2013

Amostras diversas foram coletadas por Alysson W. F. Duarte, em diferentes ilhas do arquipélago *Shetlands* do Sul, sendo as amostras de macroalgas coletadas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Franciane Maria Pellizzari (Universidade Estadual do Paraná) e cedidas para a realização do presente projeto. No total, foram coletadas 15 macroalgas de 11 espécies diferentes pertencentes aos filos: i) Phaeophyceae (macroalgas pardas): *Ascoseira mirabilis*, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia menziesii*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Himantothallus grandifolius*, ii) Rhodophyta (macroalgas vermelhas): *Gigartina skottsbergii*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Curdiea racovitzae* e, iii) Chlorophyta (macroalgas verdes): *Monostroma hariotii* (Tabela 2).

Foram coletadas 11 amostras de líquens nas ilhas *Deception*, *Livingston*, *Half Moon*, Rei George, Nelson e ilha Pinguim (Tabela 2, Figura 7) e previamente identificadas como pertencentes ao gênero *Usnea* pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Virginia Petry (Universidade do Rio dos Sinos – Rio Grande do Sul).

Tabela 2. Origem das amostras coletadas durante as expedições a Antártica realizadas em 2010 (OPERANTAR XXVIII) e em 2013 (OPERANTAR XXXII) e utilizadas para isolamento de leveduras.

EXPEDIÇÃO OPERANTAR XXVIII (2010)			
Amostra	Local da coleta	Dados de GPS	Coletor
Isópode	Punta Plaza	-	Fernando Nobre
<i>Nacella concinna</i>	EACF*	62°05,130''S 58°23,3560''W	Eduardo Hadju
Esponja	EACF	62°05,130''S 58°23,3560''W	Eduardo Hadju
Ascídia	EACF	62°05,130''S 58°23,3560''W	Eduardo Hadju
<i>Salpa</i> sp.	Punta Plaza	-	Fernando Nobre
Caramujo	EACF	62°05,130''S 58°23,3560''W	Eduardo Hadju
Estrela do Mar	EACF	62°05,130''S 58°23,3560''W	Eduardo Hadju
Sedimento marinho	Punta Ulmann	62°05,015''S 58°20,987''W, 21,6 m de profundidade	Priscila/Vivian H. Pellizari
Sedimento marinho	Refúgio 2	62°04,373''S 58°25,335''W, 21,0 m de profundidade	Priscila/Vivian H. Pellizari
Sedimento marinho	Botany Point	62°05,734''S 58°19,919''W, 26,0 m de profundidade	Priscila/Vivian H. Pellizari
Sedimento marinho	EACF	62°05,130''S 58°23,3560''W, 22,8 m de profundidade	Priscila/Vivian H. Pellizari
Macroalgas não identificadas	Punta Plaza	-	Fernando Nobre
Líquens não identificados	Punta Plaza	-	Fernando Nobre
Pedra com líquens	Punta Plaza	-	Fernando Nobre
Solos de pinguineiras	Demay e Arctowski	-	Itamar Soares

EXPEDIÇÃO OPERANTAR XXXII (2013) - Macroalgas**

Macroalga (espécie / código)	Ilha (ponto de coleta)	Coordenadas GPS	Temperatura (°C)	Salinidade (p.p.t.)
<i>Gigartina skottsbergii</i> – GSRO	Robert – Carlota	62°22,84S	- 0,8	37
<i>Ascoseira mirabilis</i> – AMRO	Cove	59°42,01W		
<i>Iridaea cordata</i> – ICRO				
<i>Adenocystis utricularis</i> – AURO	Robert –	62°22,96S	-1,0	36
<i>Desmarestia menziesii</i> – DMRO	Coppermine	59°42,09W		
<i>Monostroma hariatii</i> -MHDEC;	Deception –	62°57'097S	1,6 a 2,1	30
	Fumarole Bay	60°41'449W		
<i>Palmaria decipiens</i> – PDDEC	Deception - Whalers Bay	62°58'788S 60°33'464W	1,5	32
<i>Gigartina skottsbergii</i> GSHM	Half Moon	62°35'779S	-1,4	36
<i>Iridaea cordata</i> – ICHM		59°54'088W		
<i>Curdiea racovitzae</i> – CRHM				
<i>Cystosphaera jacquinotii</i> – CJPP	Rei George – Punta Plaza	62° 05 035 S 058° 22.86 W	- 0,9	36
<i>Desmarestia anceps</i> – DAPP				
<i>Gigartina skottsbergii</i> – GSRG	Rei George – Punta Thurret	62°05,189S 57°56,629W	- 1,3	33
<i>Himantothallus grandifolius</i> – HGRG				
<i>Desmarestia menziesii</i> – DMNE	Nelson – Crulls	62°14,587S 58°58,917W	-0,7	35

EXPEDIÇÃO OPERANTAR XXXII (2013) - Líquens

Líquens	Local de coleta (Ilha)	Coordenadas GPS
L2	<i>Deception</i>	62°58.753'S 060°33.295'W
L9	<i>Livingston</i> – Punta Hannah	62°39.231'S 060°36.645'W
L10		62°39.248'S 060°36.701'W
L11	<i>Half Moon</i>	62°35.732'S 059°54.286'W
L15		62°35.643'S 059°53.735'W
L20	Rei George - Ponta <i>Turret</i>	62°05.156'S 057°57.014'W
L22		62°05.110'S 057°56.540'W
L25		62°05.307'S 057°57.005'W
L27	Pinguim	62°06.018'S 057°55.233'W
L31		62°06.018'S 057°55.736'W
L33	Nelson	62°14.172'S 058°56.819'W

* EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz.

**A abreviatura das leveduras recuperadas de macroalgas foi realizada de maneira a indicar a espécie de macroalga de origem e o local de coleta (ilha). Prefixo – Iniciais do nome científico da macroalga; Sufixo – Iniciais da ilha onde as amostra foi coletada.

Figura 7. Locais de coleta das amostras de macroalgas e líquens no Arquipélago *Shetlands* do Sul (Antártica marítima) na expedição OPERANTAR XXXII (Dezembro de 2013).

As amostras de macroalgas e líquens foram acondicionadas em sacos de coleta esterilizados e armazenadas sob refrigeração até o processamento. Para realização das coletas foram previamente

aprovadas as devidas licenças pelos grupos de pesquisa que realizaram as coletas (Profa. Dra. Maria Virginia Petri a licença para coleta de líquens e Profa. Dra. Franciane Pellizzari para coleta de macroalgas) junto aos Ministério do Meio Ambiente e a Marinha do Brasil.

4.2 Isolamento das Leveduras

O isolamento de leveduras associadas com líquens, pedra com líquens, *Salpa* sp., ouriço do mar, estrela do mar, ophiuroidea, ascídea, *Nacella concinna*, esponja, isópode marinho, alga e molusco do mar (Figura 8, Tabela 2) foi iniciado ainda na estação Antártica e concluído na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP.

Figura 8. Material coletado no continente Antártico na OPERANTAR XXVIII (março de 2010) e utilizado para o isolamento de leveduras. A) – Ouriço, B) – Molusco marinho; C) – Ascídea; D) – Kril; E) – Estrela do mar, F) Ophiuroidea; G) – *Salpa* sp.; H) – Esponja; I, J, K, L) – Algas. Fonte: Fernando Suzigan Nobre.

As leveduras obtidas a partir de amostras de invertebrados marinhos, algas, líquens e pedras com líquens foram isoladas no âmbito da Dissertação de Mestrado de Fernando S. Nobre (NOBRE, 2012).

Para isto, foram utilizados os meios de cultura: Extrato de Malte (MA: 20 g.L⁻¹ de extrato de malte e 15 g.L⁻¹ de Ágar bacteriológico) e Ágar Dextrose Batata (PDA: 200 g.L⁻¹ de batata, 20 g.L⁻¹ de glicose, 15 g.L⁻¹ de Ágar) suplementados com rifampicina (300 µg. mL⁻¹) contendo água do mar artificial (ASW). A ASW foi preparada segundo Kester et al., (1967) e continha (em g.L⁻¹ de água destilada): NaCl (23,93), Na₂SO₄ (4), KCl (0,68), NaHCO₃ (0,19), KBr (0,098), H₃BO₃ (0,026), NaF (0,003), MgCl₂·6H₂O (10,83), CaCl₂·2H₂O (1,51) e SrCl₂·6H₂O (0,02). As placas foram então mantidas a

15 °C e o crescimento das leveduras foi acompanhado a cada 24 h, durante 30 dias, para que as primeiras colônias que surgissem fossem transferidas para novas placas contendo meio PDA.

Quanto ao isolamento de leveduras a partir das amostras de sedimentos marinhos e solos de pinguineiras foi realizado um pré-enriquecimento. Para isto, 1g de cada amostra de solo ou sedimento foi inicialmente homogeneizada em 50 mL de meios líquidos: YMB (3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5.0 g.L⁻¹ de peptona e 20.0 g.L⁻¹ de glicose) (marca Difco) e Caldo Dextrose Batata (PDB: 200 g.L⁻¹ de batata, 20,0 g.L⁻¹ de glicose) (marca Difco) suplementados com 300 µg. mL⁻¹ de rifampicina e para isolamento a partir de sedimento foi utilizada ASW. Os meios foram então incubados a 15 °C a 150 rpm por 3 dias e após este período, 100 µL deste foi inoculado no mesmo meio contendo 15 g.L⁻¹ de ágar (YMA ou PDA). As placas foram mantidas a 15 °C por 30 dias. Todos os isolados purificados foram preservados por ultracongelamento a -80 °C (glicerol 10 %).

Para o isolamento de leveduras a partir do material coletado em Dezembro de 2013, as macroalgas foram lavadas com ASW esterilizada, cortadas em pequenos fragmentos e trituradas em ASW com auxílio de um bastão de vidro esterilizado. Em seguida foram realizadas diferentes diluições e alíquotas foram semeadas em meio YMA (marca Difco) e meio Caldo Dextrose Batata (PDB) (marca Difco) diluído 10X (para isolamento de oligotróficos) e acrescidos de Ágar (15 g.L⁻¹), ambos com ASW e suplementados com cloranfenicol (100 µg. mL⁻¹). Para o isolamento das leveduras de líquens, as amostras foram colocadas em solução salina 0,85 % por 3 h em shaker a 5 °C a 200 rpm de agitação. Em seguida, as amostras foram maceradas e diluições seriadas foram semeadas em meios YMA e PDB diluído 10X acrescido de Ágar (15 g.L⁻¹) e suplementados com 100 µg. mL⁻¹ de cloranfenicol. As placas de Petri foram incubadas a 15 e 5 °C e o crescimento das leveduras foi acompanhado durante 60 dias para que as primeiras colônias que surgissem fossem transferidas para novas placas contendo meio de cultura. Por fim, os isolados purificados foram preservados por ultracongelamento a -80 °C (glicerol 20 %).

4.3 Agrupamento das linhagens representantes de grupos taxonômicos distintos e Identificação molecular

4.3.1 Caracterização morfológica

Após 3 dias de crescimento em YMA, as leveduras foram caracterizadas e agrupadas por caracteres macro-morfológicos como coloração, aspecto, textura, margem e caracteres micro-morfológicos como formato celular, formação de broto, formação de pseudo-hifas, segundo descrito por Kurtzman et al., (2011).

4.3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o método descrito por Sampaio et al., (2001) e Almeida (2005), com modificações. Este método é baseado na lise química (tampão de lise composto por Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,3 %, pH 8,0 e esterilizado por filtração) e mecânica com auxílio de esferas de vidro “*glass beads*” (Sigma- Aldrich). Os tubos foram agitados em vórtex durante 4 minutos e em seguida incubados a 65 °C por 1 h. Esta etapa foi 1 vez repetida. Em seguida o material foi centrifugado a 13,000 g por 15 min e o sobrenadante precipitado em isopropanol gelado e centrifugado 13,000 g por 15 min. Por fim, o precipitado foi lavado com etanol gelado 70%, seco e ressuspendido em água livre de DNase.

4.3.3 Fingerprinting Genético – Micro/minisatellite-primed PCR (MSP-PCR)

Foi utilizado o método de Meyer et al., (1993). Para tanto, o DNA foi diluído na concentração necessária, seguido da reação de PCR. Em tubos *ependorfs* de 200 µL foram adicionados 20 µL de uma solução MIX previamente preparada: 4,0 µL dNTPs (1,25mM); 2,5 µL de tampão da Taq (10X); 1,0 µL de MgCl₂ (50mM); 2,0 µL primer GTG₅ (10 µM); 10,3 µL de água miliQ e 0,2 µL de Taq (5U) (Promega) e 5 µL do DNA previamente diluído. O primer GTG₅ foi descrito por Gadanho e Sampaio (2002). Para a reação de PCR utilizou-se o programa “MSP-PCR” (95 °C/3min; seguido de 40 ciclos a 93 °C/45s, 50 °C/1min, 72° /1min e extensão final de 72 °C/min, 10 °C/∞. Para confirmação dos produtos formados na reação de PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,4 % em TBE 0,5 %, nas condições: 90 V por 3,5 horas. Utilizou-se o marcador “DNA Ladder 1kb” (5 µL) como padrão.

4.3.4 Caracterização taxonômica

A identificação das linhagens foi realizada pela análise das sequências de DNA do *operon* ribossomal, região D1/D2 do DNAr 26S e a região ITS (*internal transcribed spacer*). Para amplificação do domínio D1/D2 foram utilizados os primers NL1 (5’GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG3’) e NL4 (5’GGT CCG TGT TTC AAG ACG G3’) (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Para amplificação da região ITS utilizou-se os primers ITS1 (5’TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3’) and ITS4 (5’TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3’) (WHITE et al., 1990). As reações de PCR foram realizadas segundo o método descrito por Pagnocca et al., (2008). Os produtos de amplificação foram purificados em mini-colunas (GFX PCR DNA e gel band purification kit, GE Healthcare) e sequenciados em sequenciador automático ABI

Sequenciador ABI Applied Biosystems Life Technologies. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências D1/D2 de leveduras conhecidas pelo BLAST_N, no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)-*GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As sequências foram alinhadas usando o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1994) e analisadas no MEGA, versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). A relação filogenética foi estimada no MEGA 4.1, usando análise Neighbor-joining DNA pelo modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 repetições.

4.4 Avaliação da Diversidade de Leveduras Associadas a Macroalgas e Líquens

As sequências da região ribossomal LSU D1-D2 foram alinhadas e os clusters foram montados utilizando o software RDPipeline (Ribossomal Database Project) disponível em: <https://pyro.cme.msu.edu>, com as ferramentas “*Aligner*” e “*Complete Linkage Clustering*”, respectivamente. Além disto, as curvas de rarefação foram construídas utilizando o RDPipeline. Para avaliar as características das comunidades de leveduras associadas a macroalgas e líquens foram utilizados os índices de diversidade (Fisher- α), de riqueza (Margalef) e dominância (Simpson), gerados a partir dos clusters gerados pelo RDPipeline utilizando o software PAST versão 1.9 (HAMMER et al., 2001).

Em geral, utiliza-se o índice Fisher- α quando as espécies de uma comunidade ocorrem de forma aleatória e em diferentes frequências, e em comunidades em que algumas espécies são muito raras e sua chance de inclusão é pequena (FISHER; CORBET; WILLIAMS; 1943). Por outro lado, o índice de riqueza de espécies Margalef correlaciona o número de táxons encontrados com o número de indivíduos, levando em conta o efeito de amostras de tamanhos diferentes. Já, o índice de Simpson estima a dominância de uma espécie sobre as demais presentes em uma amostra, levando em consideração o número de indivíduos. Assim, o índice de Simpson indica a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente em uma amostra pertencerem a mesma espécie. Este índice varia de 0 a 1, com 0 representando o máximo de diversidade e 1 nenhuma diversidade (SOARES, 2013).

Para a comunidade de leveduras isoladas de macroalgas foi realizada a Análise dos Componentes Principais (PCA) utilizando os parâmetros: temperatura e salinidade da água do mar no mometo da coleta e os índices de diversidade (Fisher- α , Margalef e Simpson) pelo software PAST versão 1.9 (HAMMER et al., 2001). O agrupamento dos isolados de macroalgas e líquens foi realizado utilizando o *Bray-Curtis* com 95% de confiança e *boststrap* com 1000 repetições.

O diagrama de Venn foi gerado utilizando o software disponível no site <http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/example.html> (BARDOU et al., 2014).

4.5 Prospecção de lipase por leveduras isoladas da Antártica

4.5.1 Seleção de leveduras produtoras de lipases por Triagem de Alto Desempenho (High-Throughput Screening – HTS)

As leveduras obtidas das amostras coletadas na expedição OPERANTAR XXVIII foram submetidas a um ensaio de *High Throughput Screening* (HTS) para seleção dos isolados produtores de lipase, método descrito por Bigey et al., 2003. Este método consiste na medida de fluorescência em luz UV causada pela interação da Rodamina B com os ácidos graxos liberados pela hidrólise enzimática do azeite de oliva e permite utilizar 96 amostras em apenas um experimento.

As leveduras foram cultivadas em meio líquido PDB (Potato Dextrose Broth, marca Difco) e 1,0 mL foi transferido para uma placa Elisa de 96 poços. Com auxílio de um replicador metálico as leveduras foram inoculadas na superfície de uma placa de Petri (150 mm de diâmetro) contendo meio contendo 10 g.L⁻¹ de peptona (marca Oxoid), 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura (marca Oxoid) e azeite de oliva (31,25 mL.L⁻¹) e solução de rodamina B 0,01 % v/v (10 mL.L⁻¹) (NOBRE et al., 2012). A leitura das placas foi realizada a cada 24 h até 120 h. As leveduras com atividade lipolítica positiva apresentaram halo fluorescente na cor laranja ao redor das colônias quando irradiadas com luz UV (BIGEY et al., 2003).

4.5.2 Quantificação da atividade lipolítica extracelular

Os isolados com atividade lipolítica positiva (seção 4.5.1) foram selecionados para os experimentos de quantificação. Um inóculo de 1×10^7 por mL foi padronizado e utilizado em frascos Erlenmeyer de 150 mL contendo 50 mL do meio de cultura: 5 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1 g.L⁻¹ de sulfato de amônio, 1 g.L⁻¹ de nitrato de sódio e 20 g.L⁻¹ de azeite de oliva. As culturas foram incubadas a 180 rpm e 20 °C e as leituras de atividade de lipase realizadas a cada 24h (24-144 h). Após incubação, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a 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 25 °C, acompanhando a liberação do íon p-nitrofenol. Foi realizada uma curva padrão para o p-nitrofenol na concentração de 0.4 a 16.0 µmoles, $R^2=0,9996$ (Apêndice A). 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 consistiu na adição de 100 µL do sobrenadante (extrato enzimático), diluído convenientemente, a 900 µL de meio reacional e mantido a 25 °C. A reação foi interrompida por choque térmico a 90 °C por 1 minuto em banho Maria, seguido pela adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. O p-

nitrofenol liberado foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 405 nm de absorvância. Utilizou-se o mesmo substrato sem extrato enzimático como branco, além do extrato enzimático fervido por 5 min como controle negativo, uma vez que a coloração do meio de cultura é amarelada e pode interferir no comprimento de onda utilizado. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições descritas. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas.

4.6 Otimização da produção de lipases através do delineamento experimental

Diversos fatores são relevantes na produção de lipase, com destaque a composição do meio de cultivo, aeração, agitação, pH do meio de cultura, temperatura. A otimização do meio de cultivo para os isolados *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scottii* L117 foi realizada pela metodologia do delineamento experimental, através do planejamento fatorial de *Plackett-Burman* (PB) e pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) permitindo a análise através da superfície de resposta por meio do software STATISTICA 7.0. Esta abordagem é interessante uma vez que avalia as variáveis independentemente além do efeito sinérgico entre elas.

Inicialmente, para os dois isolados de leveduras da Antártica *C. laurentii* L59 e *L. scottii* L117, foi realizado um planejamento *Plackett-Burman* para avaliação de 9 variáveis independentes, a saber: pH e concentração inicial de fonte de carbono (glicose, azeite de oliva, óleos do soja e girassol) e concentração inicial de fonte de nitrogênio (ureia, milhocina [gentilmente cedida pela empresa *Corn products*, Mogi Guaçu – Brasil], peptona e extrato de levedura). Todas as diferentes variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior (Tabela 3). O ponto central foi composto por 3 ensaios acrescidos à matriz para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados. Com um total de 19 ensaios, o delineamento permitiu a avaliação inicial do efeito das 9 variáveis sobre a atividade de lipase. O cálculo para verificação dos efeitos das variáveis sobre a atividade lipolítica foi realizado com o auxílio do programa computacional STATISTICA versão 7.0.

Tabela 3. Níveis de variáveis estudadas no delineamento de *Plackett-Burman* para produção de lipase por *C. laurentii* L59 e *L. scottii* L117.

Variável	Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)
Peptona (g.L ⁻¹)	0	10	20
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0	10	20
Milhocina (mL.L ⁻¹)	0	10	20
Ureia (g.L ⁻¹)	0	5	10
Óleo de girassol (mL.L ⁻¹)	0	10	20
Azeite de oliva (mL.L ⁻¹)	0	10	20
Óleo de soja (mL.L ⁻¹)	0	10	20
Glicose (g.L ⁻¹)	0	5	10
pH	6	7	8

Em seguida, com base nos efeitos do planejamento PB para *C. laurentii* L59, foi realizado um planejamento fatorial completo de 2³ (DCCR) com 6 pontos axiais e com 3 repetições no ponto central capaz de avaliar o efeito das 3 variáveis estatisticamente significativas para a produção de lipase (Tabela 4). Neste experimento foi estudada a influência das variáveis: concentração de extrato de levedura, milhocina e óleo de soja após 120h de cultivo a 20 °C, 180 rpm. Foram fixadas as variáveis com efeito positivo: glicose e óleo de girassol. O pH do meio de cultura foi fixado em 8. As 3 variáveis restantes (peptona, ureia, azeite de oliva) foram excluídas, uma vez que a maior atividade de lipase foi no limite inferior para estas variáveis (0 g.L⁻¹).

Tabela 4. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2³ para produção de lipase por *C. laurentii* L59.

Variável	Valores codificados e reais				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Milhocina (mL.L ⁻¹)	0	4,8	12	19,2	24
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0	6	15	24	30
Óleo de soja (mL.L ⁻¹)	0	16	40	64	80

Para *L. scottii* L117, com base nos efeitos observados no delineamento PB (Tabela 3) foi realizado um planejamento fatorial completo de 2³ (DCCR) com 6 pontos axiais e com 3 repetições no ponto central capaz de avaliar o efeito das variáveis: milhocina, azeite de oliva e óleo de soja. O pH do meio de cultura foi fixado em 8 e foram excluídas as 5 variáveis restantes por não serem significativas na produção de lipase por esta levedura. Os valores codificados e reais estão na tabela 5.

Tabela 5. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2³ para produção de lipase por *L. scottii* L117.

Variável	Valores codificados e reais				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Milhocina (mL.L ⁻¹)	0	2,6	6	9,4	12
Azeite de oliva (mL.L ⁻¹)	0	16	40	64	80
Óleo de soja (mL.L ⁻¹)	0	16	40	64	80

Após o DCCR 2³ observou-se que as fontes de carbono azeite de oliva e óleo de soja apresentaram efeitos diferenciados na produção de lipase por *L. scottii* L117, não sendo necessária a presença dos dois óleos e assim foram realizados dois DCCR 2², o primeiro com milhocina e azeite de oliva (Tabela 6) e o segundo DCCR com milhocina e óleo de soja (Tabela 7) para avaliar o efeito dos óleos separadamente na produção de lipase.

Tabela 6. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2² (milhocina versus azeite de oliva) para produção de lipase por *L. scottii* L117.

Variável	Valores codificados e reais				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Milhocina (mL.L ⁻¹)	0	1,76	6	10,24	12
Azeite de oliva (mL.L ⁻¹)	0	11,16	40	68,4	80

Tabela 7. Valores codificados e reais das variáveis usadas no DCCR 2² (milhocina versus óleo de soja) para produção de lipase por *L. scottii* L117.

Variável	Valores codificados e reais				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Milhocina (mL.L ⁻¹)	0	1,76	6	10,24	12
Óleo de soja (mL.L ⁻¹)	0	11,16	40	68,4	80

4.7 Purificação parcial da lipase de *L. scottii* L117

4.7.1 Purificação clássica com solventes orgânicos ou sais

Para purificação da lipase de *L. scottii* L117 inicialmente foi realizada a estratégia de purificação clássica por concentração da enzima por precipitação e clarificação das amostras com solventes orgânicos (álcool etílico e acetona) ou sais (sulfato de amônio) e ultrafiltração. Esta etapa

foi realizada em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Eleni Gomes (UNESP campus de São José do Rio Preto - SP).

4.7.1.1 Precipitação com álcool etílico

Foram utilizadas diferentes proporções de álcool etílico gelado 95 % e extrato enzimático para definir a melhor proporção extrato: etanol (1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e 1:5). Para isto, em um volume fixo de enzima adicionou-se lentamente etanol 95 % gelado, misturando levemente com auxílio de um bastão de vidro. A mistura foi deixada em repouso em ambiente refrigerado por diferentes tempos (2 h, 4 h, 6 h e 12 h) (FERRAREZI, 2011). Após o repouso, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 2 °C por 20 min. O precipitado foi suspenso em tampão fosfato de sódio 50 mM (1 mL de tampão para 2,5 mL de volume inicial de extrato) e os volumes finais foram registrados. A atividade enzimática e proteína total foi avaliada para o precipitado suspenso em tampão fosfato de sódio (fosfato de sódio pH=7,0, 50 mM) e o sobrenadante e para o extrato bruto de partida.

4.7.1.2 Precipitação com acetona

Foi realizado de acordo com o método utilizado para álcool etílico, substituindo o álcool etílico por acetona gelada.

4.7.1.3 Precipitação com sulfato de amônio

Foi realizada utilizando uma solução fracionada de sulfato de amônio em uma faixa de 25 a 90 % de saturação. O material foi centrifugado a 10.000 g por 20 min a 4 °C. As fases precipitadas e sobrenadantes foram avaliadas.

4.7.2 Extração de lipase de *L. scottii* L117 por Sistemas de Duas Fases Aquosas

Esta estratégia foi adicionada ao plano de trabalho inicial tendo em vista a característica do extrato enzimático de *L. scottii* L117, o qual se apresentou bastante viscoso após as etapas de precipitação e dificultaram a continuidade das etapas cromatográficas. Esta etapa foi desenvolvida em colaboração ao grupo de Pesquisa do Prof. Dr. Adalberto Pessoa (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

Foram avaliados três sistemas de extração SDFA: (1) Politetileno Glicol (PEG) / Fosfato, (2) PEG/ ácido poliacrílico (NaPA) e (3) sistema micelar empregando o surfactante não iônico Triton X-114 a fim de definir a viabilidade de um sistema para extração de lipase de *L. scottii* L117.

4.7.2.1 Sistemas Poliméricos politetileno glicol (PEG) / Fosfato e (PEG)/ácido poliacrílico (NaPA)

Os sistemas de extração PEG/Fosfato foram preparados a partir de uma solução estoque de PEG (50 %, v.v⁻¹), em tampão fosfato de sódio (pH 7,0), preparado com uma mistura de fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico, proporção de 1,087 (v.v⁻¹) (SOUZA et al., 2010). Todas as soluções estoque foram mantidas a 4 °C. Foram realizados ensaios em três condições, com PEG de diferentes massas molares, a saber: PEG 1500 20 %/Fosfato 20 %, PEG 4000 20 %/Fosfato 20 % e PEG 8000 20 %/Fosfato 20 %.

A quantidade de extrato enzimático adicionado ao sistema foi sempre 20 % (2,0 mL) do volume total do sistema (10 mL), sendo o extrato enzimático o último componente adicionado. Os sistemas foram preparados em tubos graduados de 15 mL e vedados com *parafilm*, mantidos em agitação orbital a 8 rpm (25 °C) durante 1 hora. Os tubos foram então mantidos em banho Maria a 25 °C até que o sistema entrasse em equilíbrio com completa separação das fases. O volume das fases *Top* e *Bottom* foram anotados e em seguida recuperados com seringas esterilizadas descartáveis.

O sistema PEG/NaPA foi realizado de acordo com o descrito para o sistema PEG/Fosfato, empregando-se o ácido poliacrílico na concentração previamente definida de 20 % e em três condições: PEG 1500 20 %/NaPA 20 %, PEG 4000 20 %/NaPA 20 % e PEG 8000 20 %/NaPA 20 %. Foi utilizado também o tampão fosfato de sódio, pH 7,0 e extrato enzimático a 20 %.

4.7.2.2 Sistema Micelar (Triton X-114 / tampão McIlvaine, pH 7,0)

Foram utilizadas duas condições para o sistema micelar empregando o detergente não iônico Triton X-114 (TX-114): **a)** 2,0 % de TX-114 a 25 °C; **b)** 2,0 % de TX-114 a 28 °C. A pesagem dos componentes do sistema foi realizada com a balança tarada uma só vez, evitando-se assim o acúmulo de erros por pesagem. Os reagentes foram pesados na seguinte ordem 0,2 g de TX-114, seguido de tampão McIlvaine, pH7,0, até obter 8 g de massa. Por fim, o extrato enzimático bruto foi adicionado até atingir 10 g do sistema. Os tubos foram vedados com *parafilm*, homogeneizados por 1 hora em agitador orbital (8 rpm) e, em seguida, foram colocados em repouso em banho termo-regulado a 25 °C e 28 °C até a ocorrência da separação de fases (2 h).

Inicialmente foi avaliada a atividade enzimática do extrato bruto imediatamente antes da aplicação no sistema para o cálculo do U_i , o qual é definido como $U \cdot mL^{-1}$ do extrato enzimático X

volume do extrato utilizado no sistema. Um esquema ilustrando os sistemas de extração líquido/líquido da lipase de *L. scottii* L117 é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Esquema ilustrativo dos sistemas de Extração de Duas Fases Aquosas utilizados na extração da lipase de *L. scottii* L117.

4.7.2.3 Ensaio de Estabilidade frente ao Triton X-114

Após a definição do melhor sistema SDFA (sistema micelar) foi realizado um ensaio de estabilidade da lipase frente ao tensoativo não iônico TX-114. Os ensaios foram realizados em duplicata em duas temperaturas (25 e 30 °C) e em diferentes concentrações de TX-114 (2 a 12 %). A atividade enzimática residual da lipase foi acompanhada a cada duas h, por um período de 24h e expressa em (%) de lipase recuperada nas diferentes fases do sistema após determinado período de extração. As fases do sistema foram caracterizadas e definidas como: **a) Fase Top** = fase superior do sistema e pobre em micelas, **b) Fase Bottom** = fase inferior do sistema e rica em micelas.

4.8 Otimização do sistema de extração micelar

Após a definição do melhor tempo de extração e da estabilidade da enzima frente ao TX-114 foi realizado um ensaio de otimização das condições de extração por meio de um delineamento estatístico completo, o DCCR 2³. Para tanto, três variáveis foram utilizadas (TX-114, pH e

temperatura) e os valores codificados e reais são expressos na tabela 8. Os limites de temperatura e pH utilizados no ensaio de otimização foram definidos a partir da temperatura ótima de atividade de lipase (40 °C) e do pH ótimo de atividade da lipase (5,0), parâmetros previamente definidos, e foram então utilizados os limites máximos de 33 °C e 7,5, evitando-se assim a desnaturação enzimática por esses fatores. Os limites de TX-114 foram definidos a partir do ensaio de estabilidade.

Tabela 8. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2³ para extração micelar de lipase de *L. scottii* L117.

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	23	25,03	28	30,97	33
pH	4,5	5,1	6	6,9	7,5
Triton X-114 (%)	4	5,62	8	10,38	12

A atividade enzimática do extrato bruto foi avaliada imediatamente antes da aplicação no sistema para o cálculo do U_i . Nos diferentes ensaios de otimização da extração líquido/líquido foram avaliadas diferentes respostas, a saber:

- U_{top} : U. mL⁻¹ na fase *top* x volume da fase *top* (mL);

$$U_{top} = U_{top} \times V_{top} \quad (\text{equação 1})$$

- U_{bot} : U. mL⁻¹ da fase *bottom* x volume da fase *bottom* (mL);

$$U_{bot} = U_{bot} \times V_{bot} \quad (\text{equação 2})$$

- (%) de enzima recuperada na fase *bottom* (% RecBot): (U_{bot} / U_i) * 100

$$\%RECBot = \frac{U_{bot}}{U_i} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

- (%) de enzima recuperada na fase *top* (% RecTop): (U_{top} / U_i) * 100

$$\%RECTop = \frac{U_{top}}{U_i} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

- Balanço de atividades (% ABlip): $((U_{top} + U_{bot})/U_i) \times 100$

$$\%AB_{Lip} = \frac{U_{top} + U_{bot}}{U_i} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

- Coeficiente de partição (K): (relação U_{bot}/U_{top});

$$K_{Lip} = \frac{U_{BOT}}{U_{TOP}} \quad (\text{equação 6})$$

- Atividade Específica: Atividade enzimática de cada ensaio ($U \cdot mL^{-1}$) / Proteínas de cada ensaio;

$$U = \frac{U \cdot mL^{-1} \text{ de lipase}}{mg \cdot mL^{-1} \text{ de proteína total}} \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

- Fator de purificação (FP) foi determinado pela equação: Atividade específica do ensaio / Atividade específica do extrato bruto

$$PF = \frac{U_{ensaio \text{ purificado}}}{U_{extrato \text{ enzimático bruto}}} \quad (\text{equação 8})$$

4.9. Caracterização do extrato enzimático bruto de *L. scottii* L177

4.9.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

Para avaliação da atividade ótima do extrato bruto frente ao pH utilizou-se diferentes tampões na concentração de 50 mM, a saber: tampão glicina/HCl (pH 2,0 e 3,0), tampão citrato de sódio (pH 4,0 e 5,0), tampão MES (ácido 4-Morpholineethanesulfonic, pH 6,0), tampão MOPSO (3-Morpholino-2-hydroxypropanesulfonic, pH 7,0), tampão TAPS (N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]-3-aminopropanesulfonic, pH 8,0 e 9,0) e tampão CAPS (Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid, pH 10,0 e 11,0). A atividade ótima para o pH foi realizada a 25 °C.

Após definido o pH ótimo da enzima foi avaliado a influência da temperatura na atividade da lipase estudada. Para temperatura ótima foi avaliado um intervalo de temperatura variando de 5 a 65 °C na condição ótima de pH definida anteriormente. Foram avaliadas as estabilidades frente ao pH e a temperatura por 30 minutos de incubação.

Foi realizado um planejamento estatístico DCCR 2² para avaliar o efeito sinérgico do pH e da temperatura ótimos na atividade enzimática.

4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Zimograma baseado na atividade de esterificação

Amostras foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 5 %, SDS 2,3 %, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8), fervidas por cinco minutos e aplicadas em géis de diferentes concentrações fixas de poliacrilamida (8-13 %). Os géis com 1 mm de espessura foram submetidos a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante em um sistema de mini gel, Biorad miniVE-Vertical electrophoresis System. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata conforme Oakley et al. (1980) e posteriormente fotografados.

Para realização dos géis nativos para zimograma foram utilizadas as mesmas condições acima descritas, entretanto a amostra não foi submetida a condições desnaturantes de fervura e adição de β -mercaptoetanol. Foi utilizada metodologia de Know et al., (2011). As amostras foram misturadas com tampão de corrida (tampão Tris/HCl a 100mM, pH 8,0, glicerol a 20 %, azul de bromofenol e água ultra pura). Alíquotas de 20 μ L dessa mistura foram aplicadas no gel. Após a corrida, o gel foi lavado com tampão Tris/HCl pH 8,0 contendo 2,5 % de Triton X-100 por 30 min para remoção do SDS.

Posteriormente, o gel foi submetido a lavagem com 2-propanol a 20 % por 20 min e equilibrado com tampão Tris-HCl 25 mM por 10 minutos. Para detecção das lipases com atividade de esterificação, o gel foi incubado por 24 h a 30 °C em uma solução contendo ácido oleico (1,5 %, v.v⁻¹) e dodecanol (1,5 %, v.v⁻¹), emulsificados em tampão Tris/HCl a 25 mM, pH 8,0. A atividade enzimática foi verificada pela formação de uma banda com precipitado de coloração branca que corresponde à precipitação do éster formado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados em quatro capítulos:

Capítulo 1. Avaliação taxonômica de leveduras recuperadas de diferentes amostras do ambiente Antártico coletadas durante a OPERANTAR XXVIII (março de 2010) e *screening* destes isolados para produção de lipase. Os resultados apresentados nesta etapa foram publicados no periódico *Extremophiles*, artigo intitulado “*Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples*” (DUARTE et al., 2013 – APÊNDICE B).

Capítulo 2. Otimização da produção de lipase por *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scottii* L117 utilizando o delineamento experimental.

Capítulo 3. Purificação parcial da lipase de *L. scottii* L117 por Sistemas de Duas Fases Aquosas e foram otimizados os principais parâmetros que influenciam na extração da lipase por sistema micelar utilizando o TX-114;

Capítulo 4. Diversidade de leveduras associadas a macroalgas e líquens coletados no ambiente Antártico durante a OPERANTAR XXXII (Dezembro de 2013).

CAPÍTULO 1

5.1 Avaliação Taxonômica de Leveduras do Ambiente Antártico e Prospecção de Lipase

5.1.1 Isolamento de leveduras, seleção e identificação molecular dos isolados representantes de grupos taxonômicos distintos (amostras provenientes da OPERANTAR XXVIII).

Um total de 97 cepas de leveduras foi recuperado a partir de diferentes amostras marinhas e terrestres do continente Antártico, utilizando os meios de cultura PDA e YMA. Um maior número de isolados foi recuperado de sedimento marinho (n = 14), seguido de líquens (n = 12), solos ornitogênicos (n = 11), estrela do mar e *Salpa* sp. (n = 9), alga e ouriço (n = 8), ascídia e pedra com líquens (n = 6), *Nacella concinna* (n = 5), esponja (n = 4), isópode marinho (n = 3) e molusco marinho (n = 2) (Tabela 9).

De acordo com análises preliminares de taxonomia convencional (caracteres macro e micromorfológicos) as leveduras foram agrupadas em 35 tipos morfológicos distintos, sendo um representante de cada grupo morfológico submetido ao *fingerprint* genético por MSP-PCR (Figura 10). Foram obtidos 24 grupos com padrão de bandas microssatélites distintas, os quais foram identificados por sequenciamento das regiões D1/D2 do DNA ribossomal 26S.

Tabela 9. Origem das leveduras isoladas a partir de diferentes amostras coletadas no ambiente Antártico em março de 2010 (OPERANTAR XXVIII).

Espécies														Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
Ascomycota														
<i>Candida davisiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
<i>Candida glabrosa</i>	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
<i>Candida sake</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	3
<i>Debaryomyces macquariensis</i>	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Metschnikowia australis</i>	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	-	-	-	1	-	6	-	-	-	-	3	2	13
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	3
Basidiomycota														
<i>Bullera pseudoalba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	-	-	4	-	-	-	1	1	-	-	6
<i>Cryptococcus victoriae</i>	4	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>	-	1	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Guehomyces pullulans</i>	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Leucosporidium scottii</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Rhodotorula glacialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Rhodotorula laryngis</i>	-	4	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	7
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	2	-	1	-	3	1	2	-	2	1	-	-	12
<i>Tremella indecorata</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Total de isolados	14	12	11	9	9	8	8	6	6	5	4	3	2	97
Número de espécies	6	6	2	5	5	3	3	3	3	3	4	1	1	-

A – Sedimento Marinho, **B** – Líquens, **C** – Solos Ornitogênicos (solos de pinguins), **D** – *Salpa* sp., **E** – Estrela do mar, **F** – Ouriço, **G** – Alga, **H** – Ascídea, **I** – Pedra com líquens, **J** – *Nacella concinna*, **K** – Esponja, **L** – Isópode, **M** – Molusco marinho.

Figura 10. Gel de agarose do *fingerprint* genético para as regiões microssatélites (MSP-PCR) utilizando como marcador molecular o primer (GTG)₅.

Um total de 12 gêneros e 21 espécies de leveduras foram identificadas, sendo 8 espécies de ascomicetos e 13 de basidiomicetos (Tabela 10, Figura 11). As 39 leveduras do Filo Ascomycota foram classificadas em cinco gêneros: *Candida* (n=13), *Debaryomyces* (n=7), *Metschnikowia* (n=3), *Meyerozyma* (n=13) e *Wickerhamomyces* (n=3). Para as 58 leveduras do Filo Basidiomycota, as análises moleculares revelaram a presença de sete gêneros: *Bullera* (n=1), *Cryptococcus* (n=20), *Cystofilobasidium* (n=8), *Guehomyces* (n=3), *Leucosporidium* (n=5), *Rhodotorula* (n=20), e *Tremella* (n=1). Os gêneros mais abundantes foram *Cryptococcus* (18,2 %), seguido por *Rhodotorula* e *Candida* (13,63 %). Dentre os gêneros de leveduras encontrados nas amostras marinhas e terrestres da Antártica, 22 espécies foram identificadas, sendo as espécies listadas a seguir as encontradas com maior frequência (Tabelas 9 e 10): *Meyerozyma guilliermondii* (n= 13), *Rhodotorula mucilaginosa* (n=12), *Cryptococcus victoriae* (n=8), *Candida glabrata* (n=7) e *Rhodotorula laryngis* (n=7).

Estudos em diferentes ambientes frios apresentaram resultados semelhantes, onde as leveduras pertencentes ao grupo dos fungos basidiomicetos são predominantes (CONNEL et al., 2008; CARRASCO et al., 2012; UETAKE, et al., 2012; VAZ et al., 2011). A predominância de isolados de leveduras basidiomicéticas em geleiras do Rio Manso (noroeste da Patagônia) foi acima de 99 % (GARCÍA, et al., 2007). De acordo com Vishniac (2006), leveduras do Filo Basidiomycota, tais como as representantes dos gêneros *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Mrakia* e *Rhodotorula*, estão mais adaptados a ambientes frios.

Tabela 10. Lista de táxon de leveduras isoladas de amostras marinhas e terrestres do continente Antártico por similaridade do domínio D1/D2, da região 26S do DNA ribossomal. Os isolados em negritos representam os depositados na coleção de culturas do CPQBA/UNICAMP (CBMAI).

Grupos	Número de cepas	Isolados	Acesso e similaridade	Espécie
Ascomycota				
CBMAI 1509	3	L101 , L107, L114	AF536563, (99 %)	<i>Candida davisiana</i>
CBMAI 1510	7	L75 , L76, L77, L78, L79, L83, L84,	EU327105, (99 %)	<i>Candida glabrosa</i>
CBMAI 1511	3	L51 , L53, L58	DQ377640, (100 %)	<i>Candida sake</i>
CBMAI 1512	3	L3 , L6, 72	U45808 (99 %)	<i>Debaryomyces hansenii</i>
CBMAI 1513	4	L74 , L80, L81, L82	FR799729 (99 %)	<i>D. macquariensis</i>
CBMAI 1514	3	L02, L33 , L48b	U76526, (99 %)	<i>Metschnikowia australis</i>
CBMAI 1515	13	L4, L5, L9, L10, L11, L13, L15, L17, L18, L19, L20, L21 , L119	EU177574, (100 %)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
CBMAI 1516	3	L36 , L37a, L55	EU285512, (100 %)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Basidiomycota				
CBMAI 1517	1	L71	AF075504, (99 %)	<i>Bullera pseudoalba</i>
CBMAI 1518	4	L95 , L108, L110, L121	AM748527, (100 %)	<i>Cryptococcus adeliensis</i>
CBMAI 1519	2	L94 , L112	DQ377659, (100 %)	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>
CBMAI 1520	6	L35 , L59, L63, L62, L64, L70	GQ352524, (98 %)	<i>Cryptococcus laurentii</i>
CBMAI 1521	8	L42 , L43, L92, L124, L32, 97, 122, 123.	AF363647, (100 %)	<i>Cryptococcus victoriae</i>
CBMAI 1522	4	L45b , L47b, L47a, L46	AJ508233, (99 %)	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
CBMAI 1523	4	L44 , L96, L98, L111	DQ645523, (100 %)	<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>
CBMAI 1525	3	L86 , L88, L109a	AF105394 (99 %)	<i>Guehomyces pullulans</i>
CBMAI 1526	5	L115 , L116, L117, L118, 120,	AF070419 (100 %)	<i>Leucosporidium scottii</i>
CBMAI 1527	7	L27 , L25, L29, L60, L87, L103, L104	AF189942 (99 %)	<i>Rhodotorula laryngis</i>
CBMAI 1528	12	L7 , L26, L28, L34, L38, L49a, L52, L56, L65, L67a, L67b, L69, L73	EU285499 (100 %)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
CBMAI 1529	1	L106	EF151258, (99 %)	<i>Rhodotorula glacialis</i>
CBMAI 1530	1	L99	AF042250 (97 %)	<i>Tremella indecorata</i>

Figura 11. Árvores filogenéticas das sequências de DNA ribossomal 26S para as 21 espécies leveduras isoladas de amostras do ambiente Antártico utilizando o método de *Neighbour-joining*, o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) e *bootstraps* com 1000 repetições. **(A)** Leveduras do Filo Basidiomycota, sendo a sequência de *Schizosaccharomyces pombe* NRRL-Y-12796 utilizada como *outgroup*; **(B)** Leveduras do Filo Ascomycota e a sequência de *Udeniomyces megalosporus* CBS 7236 utilizada como *outgroup*.

Dentre os mecanismos de adaptação ao frio dos micro-organismos podemos destacar: **a)** a produção de substâncias crioprotetoras, tais como trealose e glicerol e, **b)** as modificações na membrana plasmática como aumento de insaturações nos lipídios de membrana, reduzindo assim o ponto de fusão dos mesmos (MARGESIN; MITEVA, 2011). Espécies do gênero *Mrakia* apresentam alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados quando comparado aos saturados e uma prevalência dos ácidos graxos linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}), possivelmente influenciando a fluidez da membrana destes organismos (THOMAS-HALL et al., 2010).

Quanto aos substratos de origem, as leveduras recuperadas das amostras terrestres da Antártica foram provenientes de líquens e solos ornitogênicos (Tabela 9). A partir das amostras de líquens e pedras com líquens foram isoladas 18 leveduras de oito espécies distintas. Seis espécies pertencentes ao Filo Basidiomycota foram isoladas das amostras de líquens, sendo a espécie *Tremella indecorata* isolada apenas a partir deste substrato e *Rhodotorula glacialis* e *Candida davisiana* recuperadas apenas de pedra com líquens. Os líquens são organismos pioneiros de ambientes extremos (RUISI et al., 2007), comuns em ecossistemas frios e no ambiente Antártico ocorrem principalmente em rochas e solos (FRISVAD, 2008).

Uma exceção aos solos da Antártica, caracterizados por seus habitats oligotróficos, são os solos ornitogênicos ou solos de pinguineiras os quais são caracterizados por alta concentração de carbono orgânico e nitrogênio na forma de aminoácidos e uréia (RUSSELL; COWAN, 2006). Neste substrato foram recuperadas 11 isolados de apenas 2 espécies: *Candida glabrosa* e *Debaryomyces macquariensis*. *C. glabrosa* também foi recuperada de solos ornitogênicos da Antártica por Vaz et al., (2011).

Isolados de levedura foram recuperados também a partir das amostras de invertebrados marinhos: *Salpa* sp. e estrela do mar (n=5), esponja (n=4), ouriço-do-mar, ascídia e *Nacella concinna* (n=3) e isópode e molusco (n=1) (Tabela 9). Embora as leveduras possam desempenhar um papel vital nos ecossistemas marinhos (BURGAUD et al., 2010; KUTTY; PHILLIP, 2008; RICHARDS et al., 2012), principalmente devido à sua associação com macro-organismos e ciclagem de nutrientes, poucos estudos têm avaliado a diversidade de leveduras associada a este ambiente.

No presente estudo foi observada a presença de alguns gêneros importantes de leveduras nas amostras de ambiente marinho, tais como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* e *Rhodotorula*. Leveduras marinhas obrigatórias são leveduras que não foram isoladas fora do ambiente marinho, enquanto, leveduras marinhas facultativas também são encontradas em ambientes terrestres (BURGAUD et al., 2010). *Debaryomyces hansenii* é uma levedura marinha facultativa frequentemente isolada de fluidos internos de invertebrados marinhos, havendo indícios que esta levedura pode servir como fonte de vitamina riboflavina para invertebrados marinhos

(KUTTY; PHILLIP, 2008). No presente trabalho, esta levedura foi recuperada a partir de esponjas e algas marinhas (Tabela 9).

Dentre as leveduras do Filo Ascomycota encontradas no presente estudo, o gênero *Candida* é especialmente comum na Antártica (VISHNIAC, 2006), sendo os representantes do mesmo isolados no presente trabalho afiliados a três espécies: *C. davisiana*, *C. glabrosa* e *C. sake*. Para o gênero *Debaryomyces*, duas espécies foram identificadas, *D. macquariensis* e *D. hansenii*. A espécie *Meyerozyma guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) de levedura ascomiceta foi a mais abundante (n=13) e recuperada a partir de 5 diferentes substratos (Tabela 9).

Rhodotorula e *Cryptococcus* foram os principais gêneros do Filo Basidiomycota encontrados no presente estudo. *Rhodotorula mucilaginosa* (n = 20) foi isolada a partir de 7 substratos: líquens, *Salpa* sp., ouriço do mar, alga, ascídia, *Nacella concinna* e esponja (Tabela 9). Representantes do gênero *Rhodotorula* são considerados como leveduras ubiqüitárias (BURGAUD et al., 2010) e são bem adaptadas a ambientes frios, devido a tolerância a uma ampla faixa de temperatura e da capacidade de produção de pigmentos de proteção (e.g. carotenoides). A produção de pigmentos de proteção pelos micro-organismos que habitam o continente Antártico é comum devido à alta incidência de irradiação UV (CONNELL et al., 2008; D'ELIA, 2008; MARGESIN; MITEVA, 2011).

No presente trabalho, representantes (n=20) de quatro espécies do gênero *Cryptococcus* (*C. victoriae*, *C. laurentii*, *C. adeliensis* e *C. albidosimilis*) foram identificados e isolados a partir de sete substratos: sedimentos marinhos, líquens, *Salpa* sp., ouriço do mar, estrela do mar, *Nacella concinna* e esponja. A predominância de espécies do gênero *Cryptococcus* no ambiente Antártico pode estar associada ao fato de serem encapsulados, oligotróficos (necessitam de requisitos mínimos nutricionais) e por possuírem um aumento da proporção de ácidos graxos insaturados em comparação aos ácidos graxos saturados na membrana plasmática, o que os torna bem adaptados às condições de baixa temperatura (CONNELL et al., 2008; MARGESIN; MITEVA, 2011).

A maioria das leveduras presentes no ambiente antártico é psicrotolerante, poucas são as leveduras psicrófilas obrigatórias. Isso se deve, possivelmente, às flutuações de temperatura na Antártica, principalmente em micro-habitats sem gelo (RUISI et al., 2007). Além disso, a Antártica parece ter poucas espécies endêmicas de fungos, o que pode estar associado à dificuldade de reprodução nas condições restritas deste ambiente. De acordo com Frisvad (2008) a introdução de fungos exógenos no ambiente Antártico pode se dar através de expedições humanas, de animais migratórios (principalmente aves) e pela dispersão causada pelo vento e correntes oceânicas. As leveduras são facilmente dispersas e capazes de colonizar grande variedade de substratos, além da capacidade de suportar condições ambientais extremas (SHIVAJI; PRASAD, 2009). Apesar dos poucos estudos associados com a diversidade de fungos no continente antártico, um número significativo de

novos taxons de leveduras associadas a este ambiente têm sido descritos (CONNELL et al., 2008; DUNCAN et al., 2006; RUISE et al., 2007; VAZ et al., 2011; VISHNIAC, 1996; ZHANG et al., 2014).

Leveduras consideradas psicrófilas e que ocorrem na Antártica foram isoladas no presente estudo a partir de diferentes substratos (Tabela 9): *Candida davisiana*, *Candida sake*, *Cryptococcus victoriae*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii* e *Metschnikowia australis*. A espécie *Metschnikowia australis* isolada a partir de sedimentos marinhos e *Salpa* sp. é considerada indígena de ambientes Antárticos (VAZ et al., 2011).

5.1.2 Seleção de leveduras da Antártica produtoras de lipase

5.1.2.1. Triagem em meio sólido: Triagem de Alto Desempenho

Dentre as 97 leveduras submetidas ao experimento de triagem de alto desempenho (Figura 11A), 47 (48,45 %) apresentaram resultado positivo para lipase a 15 °C. Estes isolados foram submetidos a experimento confirmativo da produção da enzima, utilizando as mesmas condições de cultivo da metodologia de HTS, porém na forma individualizada (Figura 12B). Das 47 leveduras selecionadas no HTS, 45 (46,4 %) leveduras foram confirmadas como produtoras de lipase no teste individual.

Figura 12. (A) HTS utilizado para seleção de leveduras lipolíticas derivadas de amostras marinhas e terrestres do ambiente Antártico após 72 h de incubação a 15 °C em meio TM modificado com Rodamina B; **(B)** Teste confirmativo (individual) para produção de lipase (nas mesmas condições de cultivo).

As leveduras lipase positivo foram recuperadas a partir de líquens (n=10, 22,22 %), sedimentos marinhos (n=7, 15,6 %), estrela do mar (n=6, 13,33 %); *Nacella corcinna* (molusco do ambiente Antártico), ouriço (n=5, 11,11 %); *Salpa* sp. (n=4, 8,89 %), ascidia (n=3, 6,67 %), esponja (n=2, 4,44 %), isópode, solo de pinguineira e alga (n=1, 2,22 %) (Figura 13).

Figura 13. Incidência percentual de isolados com atividade lipolítica nas diferentes amostras da Antártica.

Dentre as 45 leveduras lipase positivas, 15,5 % (n=7) são representantes do Filo Ascomycota: *Wickerhamomyces* (n=3), *Metschnikowia* (n=1), *Meyerozyma* (n=1), *Debaryomyces* (n=1) e *Candida* (n=1), sendo 84,5 % (n=38) representantes do Filo Basidiomycota: *Rhodotorula* (n=15), *Cryptococcus* (n=13), *Leucosporidium* (n=5), *Guehomyces* (=3) e *Cystofilobasidium* (n=2) (Figura 14).

Figura 14. Identificação e número de leveduras com atividade lipase positivo na triagem em meio sólido.

5.1.2.2 Quantificação da produção de lipase pelas leveduras da Antártica

Inicialmente os extratos enzimáticos foram incubados a 15 °C e 150 rpm, entretanto as réplicas dos ensaios apresentavam variação considerável devido a aderência de resíduos de ácidos

graxos na parede do Erlenmeyer e a formação de estruturas agregadas como “coágulos” o que dificultou a padronização dos ensaios e a reprodutibilidade da quantificação enzimática de lipase. Sendo assim, uma alternativa foi avaliar a quantificação de lipase em meios de cultivos incubados a 20 °C e 180 rpm, uma vez que todas as cepas de leveduras cresciam bem a 20 °C e uma maior agitação reduziu a formação de agregados e os meios de cultura apresentaram-se mais homogêneo. Das 45 leveduras lipase positivo, 38 apresentaram atividade enzimática quando cultivadas em meio líquido a 20 °C e 180 rpm. Destas, sete apresentaram valores de lipase acima de 0,1 U.mL⁻¹, a saber: *Cryptococcus laurentii* (L35, L59, L63, L70), *Leucosporidium scottii* (L116, L117) e *Cryptococcus adeliensis* (L121). Os maiores valores encontrados foram para *C. laurentii* L59 (0,143 U.mL⁻¹) e *L. scottii* L117 (0,23 U.mL⁻¹) após 120h de incubação e para *C. adeliensis* L121 (0,113 U.mL⁻¹) após 144 h de incubação (Figuras 15 e 16). Para as três leveduras as maiores atividades de lipase foram obtidas a partir de 96h de incubação. As 30 leveduras restantes apresentaram valores de lipase abaixo de 0,05 U.mL⁻¹, mesmo após 120 h de incubação (Figura 15).

A maioria das leveduras lipolíticas conhecidas pertence ao Filo Ascomycota, com destaque aos gêneros *Candida*, *Yarrowia* e *Saccharomyces* (VAKHLU; KOUR, 2006). Entretanto, a maioria das leveduras isoladas da Antártica produtoras de lipases foram do Filo Basidiomycota, podendo assim, serem lipases com características diferenciadas das mais comumente conhecidas.

Figura 15. Quantificação das lipases produzidas por leveduras do ambiente Antártico. A leitura enzimática foi realizada a cada 24 h de incubação a 20 °C e 180 rpm de agitação. Atividade enzimática realizada a 25 °C.

Figura 16. Produção de lipase pelas leveduras *C. laurentii* L59, *L. scottii* L117 e *C. adeliensis* L121 durante 144 h de incubação a 20 °C e 180 rpm.

Tendo como base os resultados da produção de lipase em meio líquido as leveduras *C. laurentii* L59 (isolada de ouriço do mar) e *L. scottii* L117 (isolada de sedimento marinho *Punta Ulman*) foram selecionadas para estudos subsequentes de otimização das condições de cultivo pelo planejamento experimental.

Os resultados derivados do isolamento, caracterização das leveduras e prospecção de lipases por estes micro-organismos isolados a partir de amostras marinhas e terrestres da Antártica, permitiram a ampliação do conhecimento sobre a diversidade de leveduras que habitam esses ambientes e foram publicados no artigo intitulado “*Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples*” (DUARTE et al., 2013, APÊNDICE B).

CAPÍTULO 2

5.2 Otimização das condições de cultivo de *Cryptococcus laurentii* L59 e *Leucosporidium scottii* L117 por meio de delineamento experimental

5.2.1 Otimização da produção de lipase por *C. laurentii* L59

Os resultados do primeiro planejamento experimental (*Plackett-Burman* - PB) com 9 variáveis independentes revelaram que as variáveis estatisticamente significativas para produção de lipase por *C. laurentii* L59 foram: extrato de levedura, milhocina e óleo de soja, todas com efeito positivo ($p < 0,1$) (Tabela 11, Figura 16). A maior atividade de lipase foi de $0,571 \text{ U.mL}^{-1}$ (Tabela 11, ensaio 10), onde foi obtido um aumento de 3,99 vezes quando comparado ao meio de cultura basal dos experimentos anteriores ($0,143 \text{ U.mL}^{-1}$).

No ensaio com maior atividade enzimática (ensaio 10) as variáveis: glicose e óleo de girassol foram utilizadas nas concentrações de 10 g.L^{-1} e 20 mL.L^{-1} , respectivamente. Além disto, o pH deste ensaio foi corrigido para pH 8.0.

As análises da influência das variáveis na produção da lipase por *C. laurentii* L59 do PB (Figura 17) foram utilizadas para a estruturação de um novo delineamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2^3), no qual as variáveis glicose (10 g.L^{-1}), óleo de girassol (20 mL.L^{-1}) e pH (8.0) foram fixadas e as demais variáveis (não estatisticamente significativas) foram excluídas.

Alguns estudos também avaliaram a utilização simultânea de diferentes fontes de carbono e diferentes fontes de nitrogênio para a otimização da produção de lipase (DALMAU et al., 2000; MONTESINOS et al., 1996). Dalmau et al., 2000 avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* em biorreator e observaram que quando foi utilizada uma mistura de glicose (2 g.L^{-1}) e ácido oleico (1 g.L^{-1}) a glicose foi preferencialmente utilizada ainda na fase log do crescimento do micro-organismo e a atividade de lipase somente foi detectada após o consumo do ácido oléico.

Tabela 11. Matriz do planejamento *Plackett-Burman* com 16 ensaios e 3 pontos centrais utilizada para avaliar o efeito de 9 variáveis na produção de lipase por *Cryptococcus laurentii* L59 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

ENSAIO	Peptona	Extrato de levedura	Milhocina	Uréia	Óleo de Girassol	Azeite de oliva	Óleo de Soja	Glicose	pH	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)
1	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,0549
2	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,2576
3	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,3005
4	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,1813
5	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,2740
6	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,1276
7	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,1299
8	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,192
9	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,1774
10	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,5717
11	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,0960
12	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,1169
13	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,1169
14	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,2107
15	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,2192
16	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0
17	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (7)	0,1248
18	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (7)	0,1316
19	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (7)	0,1316

Figura 17. Gráfico de Pareto para o ensaio de *Plackett-Burman* com 9 variáveis para produção de lipase por *C. laurentii* L59 ($p < 0,1$) (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

No DCCR 2³ além das variáveis fixadas, três variáveis independentes tiveram as suas concentrações estudadas: extrato de levedura, milhocina e óleo de soja. Os resultados do DCCR demonstraram que a maior atividade de lipase foi obtida no ensaio sem milhocina e com 15 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 40.mL⁻¹ de óleo de soja (Tabela 12, ensaio 9).

Tabela 12. Matriz do planejamento DCCR 2³ com 8 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para avaliar 3 variáveis na produção de lipase por *C. laurentii* L59 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

Ensaio	Milhocina	Extrato de levedura	Óleo de soja	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)
1	-1 (4,8 mL.L ⁻¹)	-1 (6 g.L ⁻¹)	-1 (16 mL.L ⁻¹)	0,292
2	1 (19,2 mL.L ⁻¹)	-1 (6 g.L ⁻¹)	-1 (16 mL.L ⁻¹)	0,508
3	-1 (4,8 mL.L ⁻¹)	1 (24 g.L ⁻¹)	-1 (16 mL.L ⁻¹)	0,751
4	1 (19,2 mL.L ⁻¹)	1 (24 g.L ⁻¹)	-1 (16 mL.L ⁻¹)	0,491
5	-1 (4,8 mL.L ⁻¹)	-1 (6 g.L ⁻¹)	1 (64 mL.L ⁻¹)	0,734
6	1 (19,2 mL.L ⁻¹)	-1 (6 g.L ⁻¹)	1 (64 mL.L ⁻¹)	0,265
7	-1 (4,8 mL.L ⁻¹)	1 (24 g.L ⁻¹)	1 (64 mL.L ⁻¹)	0,700
8	1 (19,2 mL.L ⁻¹)	1 (24 g.L ⁻¹)	1 (64 mL.L ⁻¹)	0,338
9	-1,68 (0 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,887
10	1,68 (24 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,342
11	0 (12 mL.L ⁻¹)	-1,68 (0 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,189
12	0 (12 mL.L ⁻¹)	1,68 (30 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,590
13	0 (12 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	-1,68 (0 mL.L ⁻¹)	0,336
14	0 (12 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	1,68(80 mL.L ⁻¹)	0,604
15	0 (12 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,452
16	0 (12 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,438
17	0 (12 mL.L ⁻¹)	0 (15 g.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,441

Baseado nos resultados de coeficiente de regressão (Tabela 13), o modelo estatístico de segunda ordem para atividade de lipase por *C. laurentii* L59 foi gerado, onde: Atividade de lipase por *C. laurentii* L59 = $0,442631 - 0,131229 (\text{Milhocina}) + 0,063995 (\text{Milhocina})^2 + 0,084624 (\text{Extrato de levedura}) - 0,098375 (\text{interação Milhocina versus Óleo de soja})$.

A significância estatística das análises (Tabela 14) foi confirmada pelo teste F (ANOVA), como o valor do teste F (9,677) para a regressão foi altamente significativo [*F calculado* maior do que o *F tabelado* (2,48)] e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 76,33\%$), o modelo foi considerado previsível e, portanto, usado para gerar os gráficos de contorno e superfícies de resposta apresentados na Figura 18.

Tabela 13. Coeficiente de Regressão DCCR 2³ para atividade de lipase de *C. laurentii* L59.

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t-value	p-value p<0,1
Média	0,442631	0,063708	6,94780	0,000222
Milhocina (L)	-0,131229	0,029935	-4,38376	0,003220
Milhocina (Q)	0,063995	0,032979	1,94049	0,093468
Extrato de levedura (L)	0,084624	0,029935	2,82690	0,025519
Interação Milhocina x Óleo de soja	-0,098375	0,063708	6,94780	0,000222

$r^2 = 76,33\%$.

Tabela 14. Anova do modelo quadrático para atividade de lipase (U.mL⁻¹) de *C. laurentii* L59.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados - SQ	Graus de Liberdade - GL	Quadrado Médio - QM	F calculado – Fcal
Regressão	0,46438400	4	0,116096	9.677354821
Residuo	0,14396000	12	0,011996667	
Total	0,60834400	16		

$r^2 = 76,33\%$. F 0,1; Ftab = 2,48

Figura 18. Superfícies de resposta e de contorno para produção de lipase por *C. laurentii* L59, DCCR 2³. **(A)** Óleo de soja versus milhocina ($p < 0,1$); **(B)** extrato de levedura versus milhocina ($p < 0,1$); **(C)** Óleo de soja versus extrato de levedura ($p < 0,1$).

A milhocina linear e a interação milhocina versus óleo de soja linear apresentaram efeito negativo na produção da enzima. Por outro lado, um efeito positivo estatisticamente significativo foi

observado para extrato de levedura linear e milhocina quadrática. Assim, o extrato de levedura deve ser uma fonte de N preferida pela levedura *C. laurentii* L59 para produção de lipase, quando comparado a milhocina. A produção de lipase por *C. laurentii* L59 aumentou 6,2 vezes, indo de 0,143 U.mL⁻¹ (meio de cultura basal) para 0,887 U.mL⁻¹ após a condução do DCCR 2³.

De acordo com os resultados do DCCR 2³, é necessário apenas extrato de levedura como fonte de nitrogênio para o aumento da atividade de lipase por *C. laurentii* L59. Assim, a composição do meio de cultura no experimento de validação do planejamento experimental foi composta por: 10 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de óleo de girassol e 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura. A produção máxima de lipase no ensaio de validação foi de 0,756 U.mL⁻¹ após 120h de incubação e biomassa de 14,9 mg.mL⁻¹. Segundo os dados de biomassa, a lipase de *C. laurentii* L59 é produzida na fase estacionária, a qual é iniciada após 96 h de incubação a 20 °C e 180 rpm (Figura 19). O pH do meio de cultivo se manteve estável (com pouca variação) durante as 144 h de cultivo, sendo o seu valor de 7,2 após 120h de incubação (onde foi observada a maior atividade de lipase).

Figura 19. Ensaio de validação da otimização do meio de cultura para produção de lipase por *C. laurentii* L59 (20 °C e 180 rpm).

Considerando o fato de que a levedura *C. laurentii* L59 foi isolada de ambiente marinho da Antártica (ouriço do mar) e que as enzimas de micro-organismos de origem marinha podem apresentar atividade diferenciada em condições de salinidade, a produção de lipase por esta levedura foi avaliada em meio de cultura com elevada salinidade (diferentes concentrações de NaCl) e na presença de ASW (Figura 20). Os resultados demonstraram que, apesar de *C. laurentii* L59 ser proveniente de ambiente marinho, a salinidade inibiu a produção de lipase. Em concentrações de 2,5

% e 5 % de NaCl e nos meios de cultivo preparados com 50 e 100 % de ASW, a atividade de lipase foi bem menor do que a obtida no experimento sem salinidade (meio preparado com água destilada).

Figura 20. Influência da concentração de sal (NaCl 2.5 e 5.0 %) e da água do mar artificial (ASW 50 % e 100 %) na produção de lipase por *C. laurentii* L59 após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm.

5.2.2. Otimização da produção de lipase por *L. scottii* L117

Os resultados do primeiro planejamento experimental (*Plackett-Burman* - PB) com 9 variáveis independentes aplicadas para o estudo da produção de lipase por *L. scottii* L117 revelaram que as variáveis com efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) foram: óleo de soja, milhocina e azeite de oliva (efeito positivo) e ureia (efeito negativo) (Tabela 15, Figura 21). A maior produção de lipase foi de $0,409 \text{ U.mL}^{-1}$ nas condições do ensaio 14 da Tabela 15.

As análises da influência das variáveis na produção da lipase por *L. scottii* L117 do PB (Figura 21) serviram de base para a estruturação de um novo delineamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2^3), no qual as variáveis milhocina e azeite de oliva foram propostas como únicas fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. A variável ureia foi eliminada devido à influência negativa, bem como as demais variáveis (não significativas) uma vez que as mesmas não estavam presentes no ensaio com maior atividade de lipase (Tabela 15, ensaio 14). O pH do meio de cultura foi fixado em 8, por ser o pH do meio que apresentou maior atividade enzimática.

Tabela 15. Matriz do planejamento *Plackett-Burman* com 16 ensaios e 3 pontos centrais utilizada para avaliar o efeito de 9 variáveis na produção de lipase por *Leucosporidium scottii* L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

Ensaio	Peptona	Extrato de levedura	Milhocina	Uréia	Óleo de Girassol	Azeite de Oliva	Óleo de Soja	Glicose	pH	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)
1	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,0174
2	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,0353
3	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,0489
4	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,0614
5	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,0406
6	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,0230
7	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,0494
8	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,4060
9	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,0555
10	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,0901
11	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1(8)	0,0129
12	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,0174
13	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,0905
14	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	1(8)	0,4090
15	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	1 (20mL.L ⁻¹)	1 (10g.L ⁻¹)	-1 (6)	0,0440
16	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0mL.L ⁻¹)	-1 (0g.L ⁻¹)	-1 (6)	0
17	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (7)	0,0317
18	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (7)	0,0291
19	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (10mL.L ⁻¹)	0 (5g.L ⁻¹)	0 (7)	0,0323

Figura 21. Gráfico de Pareto para o ensaio de *Plackett-Burman* com 9 variáveis para produção de lipase por *L. scottii* L117 ($p < 0,1$) (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

Com base nos resultados estatísticos do primeiro planejamento PB para *L. scottii* L117, a variável milhocina influenciou positivamente na produção de lipase. Um novo planejamento DCCR 2^3 com uma maior concentração (30 mL.L^{-1}) deste composto foi utilizado. Entretanto, a produção enzimática caiu acentuadamente e o resultado estatístico indicou a influência negativa da milhocina. Assim, um segundo DCCR 2^3 foi realizado, diminuindo a concentração de milhocina (concentração máxima de 20 mL.L^{-1}). Entretanto, o mesmo comportamento foi observado, sendo a milhocina uma variável estatisticamente significativa, mas com efeito negativo na produção da enzima. Então, um terceiro planejamento estatístico foi realizado com limite máximo de 12 mL.L^{-1} para milhocina (Tabela 16). Neste terceiro DCCR a maior produção de lipase foi de $1,627 \text{ U.mL}^{-1}$ (Tabela 16, ensaio 12).

Tabela 16. Matriz do planejamento DCCR 2³ com 17 ensaios, 6 pontos axiais + 3 pontos centrais para avaliação de 3 variáveis na produção de lipase por *L. scottii* L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

Ensaio	Milhocina	Azeite de oliva	Óleo de soja	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)
1	-1 (2,6 mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	0,188
2	1(9,4 mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	0,932
3	-1 (2,6 mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	0,655
4	1(9,4 mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	0,957
5	-1 (2,6 mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	0,382
6	1(9,4 mL.L ⁻¹)	-1 (16mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	0,969
7	-1 (2,6 mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	0,802
8	1(9,4 mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	1 (64mL.L ⁻¹)	0,957
9	-1,68 (0 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,064
10	1,68 (12 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,638
11	0(6 mL.L ⁻¹)	-1,68 (0mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,709
12	0(6 mL.L ⁻¹)	1,68(80mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,627
13	0(6 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	-1,68 (0mL.L ⁻¹)	1,12
14	0(6 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,68(80mL.L ⁻¹)	0,772
15	0(6 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,31
16	0(6 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,25
17	0(6 mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,31

A influência das diferentes variáveis na produção de lipase por *L. scottii* L117 está apresentada na tabela 17, onde pode ser observado as variáveis significativas. Baseado nos resultados de coeficiente de regressão (Tabela 17), o modelo estatístico de segunda ordem para atividade de lipase por *L. scottii* L117 foi gerado, onde: Atividade de lipase por *L. scottii* L117 = 1,294130 + 0,201712 (Milhocina) – 0,346517 (Milhocina)² + 0,178987 (Azeite) – 0,057047 (Azeite)² – 0,135704 (Óleo de soja)² – 0,109250 (Milhocina x Azeite) – 0,038 (Milhocina x Óleo de soja).

Tabela 17. Coeficiente de Regressão DCCR 2³ para atividade de lipase por *L. scottii* L117. R²=0,9298.

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t-value	p-value p<0,1
Média	1,294130	0,019958	64,8426	0,000238
Milhocina (L)	0,201712	0,009378	21,5092	0,002154
Milhocina (Q)	-0,346517	0,010331	-33,5400	0,000888
Azeite (L)	0,178987	0,009378	19,0860	0,002734
Azeite (Q)	-0,057047	0,010331	-5,5217	0,031268
Óleo Soja (Q)	-0,135704	0,010331	-13,1350	0,005746
Interação Milhocina x Azeite	-0,109250	0,012247	-8,9202	0,012335
Interação Milhocina x Óleo de soja	-0,038000	0,012247	-3,1027	0,090065

A significância estatística das análises (Tabela 18) foi confirmada pelo teste F (ANOVA), como o valor do teste F (226,7161) para a regressão foi altamente significativo [$F_{calculado}$ maior do que o $F_{tabelado}$ (2,45)] e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2=92,98\%$), o modelo foi considerado previsível e, portanto, usado para gerar os gráficos de contorno e superfícies de resposta apresentados na Figura 22.

Tabela 18. Tabela Anova do DCCR 2³ para produção de lipase por *L. scottii* L117.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados - SQ	Graus de Liberdade – GL	Quadrado Médio – QM	F calculado – Fcal
Regressão	2,6619154	5	0,53238308	226,7161
Resíduo	0,0258306	11	0,002348236	
F ajuste	0,0234306000	9	0,0026034	2,1695
Erro puro	0,0024000	2	0,0012	
Total	2,68775	16	0,167984125	

$r^2 = 92,98\%$. $F_{0,1}$; $F_{tab} = 2,45$

Figura 22. Superfícies de resposta e de contorno para produção de lipase por *L. scottii* L117, DCCR 2³. **(A)** Azeite de oliva versus milhocina ($p < 0,1$); **(B)** Óleo de soja versus milhocina ($p < 0,1$).

O azeite de oliva e a milhocina linear apresentaram efeito positivo estatisticamente significativo. Por outro lado, o óleo de soja linear não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) e seu efeito quadrático foi negativo. De acordo com as superfícies de resposta e de contorno (Figuras 24 e 25) é possível observar que a concentração ótima de milhocina foi próxima ao ponto central (6 mL.L⁻¹).

De acordo com os resultados do DCCR 2³, apenas o azeite de oliva foi estatisticamente significativo como fonte de carbono, sendo considerada indutora para produção de lipase por *L. scottii* L117 e a maior produção de lipase foi de 1,627 U.mL⁻¹ (ensaio 12, Tabela 17) quando foi

utilizada concentração de 8 % de azeite e 4 % de óleo de soja. A produção de lipase por *L. scottii* L117 aumentou 7 vezes, indo de 0,23 U.mL⁻¹ (meio de cultura basal) para 1,627 U.mL⁻¹ (após aplicação do planejamento experimental).

Tabela 19. Matriz do planejamento DCCR 2² com 12 ensaios. 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para avaliação de 2 variáveis na produção de lipase por *L. scottii* L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

Ensaio	Milhocina	Óleo de soja	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)
1	-1 (1,76mL.L ⁻¹)	-1 (11,16mL.L ⁻¹)	0,692
2	1 (10,24mL.L ⁻¹)	-1 (11,16mL.L ⁻¹)	0,664
3	-1 (1,76mL.L ⁻¹)	1 (68,4mL.L ⁻¹)	0,409
4	1 (10,24mL.L ⁻¹)	1 (68,4mL.L ⁻¹)	1,128
5	-1,41 (0mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,121
6	1,41 (12mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,926
7	0 (6mL.L ⁻¹)	-1,41 (0g.L ⁻¹)	0,375
8	0 (6mL.L ⁻¹)	1,41 (80mL.L ⁻¹)	0,743
9	0 (6mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,025
10	0 (6mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	1,011
11	0 (6mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,980
12	0 (6mL.L ⁻¹)	0 (40mL.L ⁻¹)	0,983

A influência das fontes de carbono foi avaliada separadamente em dois novos DCCR 2². Além disto, embora o azeite de oliva tenha sido um melhor indutor para produção de lipase, o óleo de soja também foi avaliado separadamente por ser uma fonte de carbono mais barata quando comparada ao azeite de oliva.

De acordo com os resultados do DCCR 2² com óleo de soja e milhocina, a maior atividade de lipase foi obtida no ensaio 4 da Tabela 19. Entretanto, estes valores estão próximos ao ponto central, com uma proporção de 6,66 de C:N. Todos os parâmetros foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), exceto o óleo de soja linear, comportamento semelhante ao DCCR 2³. Foi possível retirar o modelo estatístico do DCCR 2² (Tabela 20), onde Atividade de lipase por *L. scottii* L117 = $0,999200 + 0,228937 \text{ (Milhocina)} - 0,192813 \text{ (Milhocina)}^2 - 0,174957 \text{ (Óleo de soja)}^2 + 0,186750 \text{ (Milhocina} \times \text{Óleo de soja)}$ e utilizado para gerar as superfícies de resposta e de contorno (Figura 23).

Tabela 20. Coeficiente de regressão para o DCCR 2² da atividade de lipase por *L. scottii* L117, função óleo de soja versus milhocina. $R^2=0,827$.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados - SQ	Graus de Liberdade - GL	Quadrado Médio - QM	F calculado - Fcal
Regressão	0,9	4	0,229339777	9,414541835
Resíduo	0,170521	7	0,024360163	
F ajuste	0,169086	4	0,042271598	88,38807801
Erro puro	0,001435	3	0,00047825	
Total	1,087880	11	0,098898205	

A significância estatística das análises (Tabela 21) foi confirmada pelo teste F (ANOVA). Como o valor do teste F (9,4145) para a regressão foi altamente significativo [*F calculado* maior do que o *F tabelado* (4,12)] e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2= 82,7\%$), o modelo foi considerado previsível e, portanto, usado para gerar os gráficos de contorno e superfícies de resposta apresentados na Figura 26.

Tabela 21. Tabela Anova do DCCR 2² (milhocina versus óleo de soja) para produção de lipase por *L. scottii* L117.

Fator	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t-value	p<0,05
Média	0,999200	0,078038	12,80402	0,000004
Milhocina (L)	0,228937	0,055264	4,14261	0,004335
Milhocina (Q)	-0,192813	0,061953	-3,11226	0,017027
Óleo de Soja (Q)	-0,174957	0,061953	-2,82403	0,025624
Interação Milhocina x Óleo de Soja	0,186750	0,078039	2,39304	0,047954

$r^2 = 82,7\%$. F 0,05; Ftab = 4,12

Figura 23. Superfície de resposta e superfície de contorno para produção de lipase por *L. scottii* L117, DCCR 2² com a função óleo de soja versus milhoccina ($p < 0,05$).

A produção máxima de lipase utilizando apenas azeite de oliva como fonte de carbono foi de 2,077 U.mL⁻¹ (Tabela 22, ensaio 8). Apenas a variável milhoccina quadrática foi estatisticamente significativa ($p < 0,1$), entretanto, a milhoccina linear teve um comportamento semelhante ao do DCCR 2³ e DCCR 2² com óleo de soja com atividade ótima próximo ao ponto central contendo 0,6 % de milhoccina (Figura 24). O coeficiente de regressão foi baixo ($r^2 = 0,38$), não sendo possível prever o modelo estatístico para produção de lipase, entretanto, as superfícies de respostas e de contorno foram retiradas e os resultados corroboram com os resultados obtidos no DCCR 2³ onde o azeite de oliva foi a fonte de carbono com maior efeito positivo.

Tabela 22. Matriz do planejamento DCCR 2² com 12 ensaios, 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para avaliar 2 variáveis na produção de lipase por *L. scottii* L117 (após 120 h de incubação a 20 °C e 180 rpm).

Ensaio	Milhoccina	Azeite de oliva	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)
1	-1 (1,76 mL.L ⁻¹)	-1 (11,16 mL.L ⁻¹)	0,783
2	1 (10,24 mL.L ⁻¹)	-1 (11,16 mL.L ⁻¹)	1,615
3	-1 (1,76 mL.L ⁻¹)	1 (68,4 mL.L ⁻¹)	0,996
4	1 (10,24 mL.L ⁻¹)	1 (68,4 mL.L ⁻¹)	1,192
5	-1,41 (0 mL.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,218
6	1,41 (12 mL.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	0,713
7	0 (6 mL.L ⁻¹)	-1,41 (0 mL.L ⁻¹)	0,225
8	0 (6 mL.L ⁻¹)	1,41 (80 mL.L ⁻¹)	2,077
9	0 (6 mL.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	1,770
10	0 (6 mL.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	1,724
11	0 (6 mL.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	1,728
12	0 (6 mL.L ⁻¹)	0 (40 mL.L ⁻¹)	1,725

Figura 24. Superfície de resposta e superfície de contorno para produção de lipase por *L. scottii* L117, DCCR 2² com a função azeite de oliva versus milhocina ($p < 0,1$).

O uso do rejeito industrial milhocina propiciou o aumento da produção de lipase por *L. scottii* L117, podendo este ser utilizado como única fonte de nitrogênio. Tais resultados mostram o potencial de utilização deste subproduto na redução dos custos de obtenção de lipase por *L. scottii* L117. A milhocina é um subproduto da indústria de beneficiamento de milho e é obtido da água de maceração de grãos de milho, contendo em sua composição nutrientes necessários para o desenvolvimento e metabolismo de vários micro-organismos, tais como: aminoácidos, carboidratos solúveis, sais minerais e vitaminas (Tabela 23). A milhocina apresentou-se como excelente fonte de N do meio de cultura para a produção de lipase por *L. scottii* L117. Além disto, este trabalho é o primeiro relato da produção e otimização das condições de cultivo para produção de lipase pela levedura psicrotolerante *Leucosporidium scottii* L117.

Tabela 23. Composição química da água de maceração de milho (milhocina) utilizada nos experimentos de otimização experimental para produção de lipase pela levedura *L. scottii* L117.

Aminoácidos	(%)	Minerais	(mg.Kg⁻¹)	Vitaminas	(mg.Kg⁻¹)
Alanina	9,83	Cálcio	0,14	Ácido Pantotênico	15,0
Arginina	3,68	Cobre	15,0	Biotina	0,3
Ácido Glutâmico	18,07	Enxofre	0,6	Cholina	3.500,0
Cisteína	2,2	Ferro	100,0	Inositol	6.000
Fenilalanina	2,85	Fósforo	1,8	Niacina	80,0
Glicina	5,27	Magnésio	20,0	Piridoxina	9,0
Histidina	3,72	Manganês	0,6	Riboflavin	6,0
Isoleucina	3,07	Potássio	2,8	Tiamina	3,0
Leucina	8,28	Selênio	0,3		
Lisina	4,75	Sódio	0,1		
Metionina	1,98	Zinco	60,0		
Prolina	9,64				
Serina	5,18				
Tirosina	3,09				
Treonina	4,08				
Valina	5,16				

Matéria seca: 45-50 %; Proteína bruta (base seca): 35-40 %; pH3,7-4,4.

Fonte: Corns Products Brasil.

Os substratos lipídicos e seus metabólitos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipases atuando como excelentes indutores (DALMAU et al., 2000). Alguns micro-organismos requerem glicose como fonte de carbono constitutiva, mas este composto, em geral, atua como repressor da síntese de lipase (CASTIGLIONI, 2009).

Quando os óleos vegetais são a única fonte de carbono, os micro-organismos utilizam estes substratos de modo sequencial. Inicialmente o óleo é hidrolisado pelas lipases presente ainda no inóculo do micro-organismo em glicerol e ácidos graxos livres. Em seguida o micro-organismo consome o glicerol liberado e posteriormente os ácidos graxos são consumidos com a consequente produção de uma quantidade significativa de lipase (MONTESINOS et al., 1996; CASTIGLIONI, 2009). O óleo de soja e o azeite de oliva apresentam composição química semelhante, entretanto a proporção dos ácidos graxos insaturados C_{18:1} é diferenciada como observado na Tabela 24.

Tabela 24. Composição dos óleos vegetais em ácidos graxos (g.100g⁻¹). Adaptado de Zambiasi et al., 2007.

Óleo vegetal	Ácidos Graxos Saturados				Ácidos Graxos Insaturados			
	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Azeite de oliva	-	-	8,70	3,47	0,51	76,34	8,64	0,75
Óleo de soja	-	0,06	9,90	3,94	0,08	21,35	56,02	6,15
Óleo de girassol	-	0,06	5,70	4,79	-	15,26	71,17	0,45
Óleo de algodão	-	0,77	21,87	2,27	0,47	16,61	56,35	0,33
Óleo de linhaça	-	0,05	4,81	3,03	-	21,42	15,18	54,24
Óleo de amendoim	-	0,03	9,40	2,65	0,06	48,71	31,06	0,23
Óleo de canola	-	0,06	3,75	1,87	0,21	62,41	20,12	8,37
Óleo de milho	-	-	10,47	2,02	-	24,23	60,38	0,99
Óleo de palma	-	1,12	42,7	4,55	-	39,37	10,62	0,21
Óleo de côco	45,46	18,82	10,08	4,31	-	7,45	1,8	-

(–) Não detectado.

De acordo com os resultados obtidos, podemos sugerir que possivelmente a indução de lipase em *L. scottii* L117 foi influenciada pelo ácido graxo insaturado C_{18:1}. Neste sentido, um novo experimento foi conduzido onde a produção de lipase foi avaliada em condições de cultivo com diferentes substratos indutores: tributirina (C4), tricaprilina glicerol (C8) e ácido oleico (C18:1) em diferentes concentrações (1, 2 e 4 %). Os resultados revelaram que o ácido oléico foi a melhor fonte de carbono para a produção de lipase por *L. scottii* L117, apresentando 101,2 % de atividade relativa quando comparado ao meio de cultura com azeite de oliva (Figura 28). Além disto, a tributirina tem sido um indutor preferencial de enzimas esterases (HEATH et al., 2009), uma vez que estas hidrolisam triglicerídeos de cadeia curta (< 10 carbonos), enquanto que as lipases verdadeiras possuem maior atividade em triglicerídeos de cadeias longas, embora possam hidrolisar triglicerídeos de cadeias curtas. Os resultados obtidos, demonstram a preferência da lipase de *L. scottii* 117 por triglicerídeos de cadeias longas (Figura 25).

Figura 25. Porcentagem de atividade relativa de lipase de *L. scottii* L117 quando comparado ao meio de cultivo contendo apenas azeite de oliva como fonte indutora. Tributirina (C4:0), Tricaprilato glicerol (C8:0) e Ácido oléico (C18:1).

A produção de lipases pode ser estimulada pela presença de emulsificantes no meio de cultura, devido ao aumento da superfície de contato do óleo indutor facilitando assim a ação enzimática, além do aumento da permeabilidade celular, aumentando a difusão da enzima no meio extracelular e liberando enzimas aderidas à parede celular do micro-organismo (BISHT; YADAV; DARMWAL, 2013). Desta forma, foi avaliada a influência de dodecil sulfato sódico (SDS) (0,125 %), Tween 80, Tween 20, Triton X-110, Triton X-114 e goma arábica (0,25 % cada) na produção de lipase por *L. scottii* L117.

Os resultados obtidos (Figura 26) mostraram que apenas o Tween 20 apresentou atividade ligeiramente positiva na produção de lipase (106,8 % de atividade relativa de lipase quando comparado com o meio de cultura sem emulsificante). A biomassa do meio de cultivo com os emulsificantes SDS (0,125 %) e TX-100 (0,25 %) foi zero, sugerindo que estes detergentes inibiram o desenvolvimento de *L. scottii* L117 e consequentemente a produção de lipase.

Figura 26. Porcentagem de atividade relativa de lipase de *L. scottii* L117 com diferentes agentes emulsificantes (SDS, Tween 80, Tween 20, TX-100, TX-114 e Goma Arábica) quando comparado ao meio de cultivo basal sem emulsificante.

A influência da concentração de NaCl na produção de lipase por *L. scottii* L117 também foi avaliada (Figura 27). Os resultados demonstraram que os meios de cultura contendo concentrações de 1, 2 e 3 % de NaCl apresentaram 87, 61 e 3 % de atividade relativa de lipase, respectivamente, quando comparado ao meio de cultura sem adição de sal. Com 4 e 5 % de NaCl a atividade relativa decaiu consideravelmente (Figura 27). Os dados de biomassa não estão apresentados.

Figura 27. Porcentagem de atividade relativa de lipase L117 quando comparado com o meio de cultivo sem NaCl.

Além das fontes de carbono, nitrogênio, sais e indutores, as condições de cultivo como pH, temperatura, agitação, aeração influenciam a produção de lipase. Assim, após otimização do meio de cultura, foi avaliada a influência da agitação a 20 °C. Os resultados demonstraram que a maior atividade de lipase foi obtida a 180 rpm (Figura 28). A agitação dos sistemas de cultivo está relacionada principalmente com a difusão do oxigênio no meio de cultivo. Quando foi utilizada agitação de 150 rpm houve formação de resíduos da hidrólise do óleo em agregado “coágulos”. No ensaio onde foi aplicado 210 rpm de agitação a atividade relativa foi de 73 % em comparação ao ensaio a 180 rpm. O aumento da agitação altera a aderência do micro-organismo à superfície das gotas de óleo, fator este que pode estar relacionado com a diminuição da liberação de lipase extracelular por *L. scottii* L117 a 210 rpm.

Figura 28. Atividade de lipase (U.mL⁻¹) em função da agitação após 120 h de incubação a 20 °C.

A temperatura de incubação é uma variável importante na produção enzimática, uma vez que afeta o crescimento microbiano e consequentemente a produção da enzima. Para as duas leveduras avaliadas a melhor temperatura de incubação para produção de lipase foi a de 20 °C (Figura 29).

Figura 29. Atividade residual de lipase produzida por *C. laurentii* L59 e *L. scottii* L117 em diferentes temperaturas de incubação.

Tendo em vista que a levedura *L. scottii* L117 isolada de sedimento marinho da Antártica apresentou atividades de lipase superiores às produzidas pela levedura *C. laurentii* L59, esta foi selecionada para os experimentos subsequentes de caracterização do extrato bruto (seção 5.2.3) e de purificação da enzima (seção 5.3).

5.2.3 Caracterização do extrato bruto de *L. scottii* L117

O extrato bruto da produção de lipase (condições otimizadas) por *L. scottii* L117 foi submetido à avaliação da influência do pH e da temperatura na atividade da enzima. Em relação ao pH, a lipase de *L. scottii* L117, apresentou características de lipases ácidas, tendo atividade ótima em pH 5.0 (Figura 30A). Quanto à temperatura, embora *L. scottii* L117, seja uma levedura psicrotolerante e a lipase deste micro-organismo seja produzida a 20 °C, a atividade ótima desta enzima foi a 40 °C (Figura 30B). Esses resultados são relevantes, uma vez que inúmeros processos biotecnológicos requerem enzimas ativas em temperaturas acima de 40 °C. A atividade ótima em 40 °C pode estar relacionada a algum componente do extrato bruto que aumenta a resistência térmica do extrato enzimático.

Figura 30. Atividade e Estabilidade de lipase de *L. scottii* L117 em diferentes **(A)** pH e **(B)** Temperaturas. Os ensaios de pH foram realizados a 25 °C e com os tampões a 50 mM: tampão glicina/HCl (pH 2.0 and 3.0), citrate de sódio (pH 4.0 and 5.0), tampão MES (pH 6.0), tampão MOPSO (pH 7.0), tampão TAPS (pH 8.0 and 9.0) e tampão CAPS (pH 10.0 and 11.0). Os ensaios de temperatura foram realizados em tampão citrato de sódio.

Lipases produzidas por leveduras, em geral, apresentam atividade ótima em pH alcalino (BATAICHE et al., 2014; VAKLU; KOUR, 2006). Por outro lado, assim como no presente estudo, *Candida viswanathii* apresentou atividade ótima em pH ácido, pH ótimo em 3,5 e estabilidade em condições ácidas após 24 horas de incubação (ALMEIDA; TAUKE-TORNISIELO; CARMONA, 2013). Outras lipases produzidas por microrganismos do ambiente Antártico também possuem atividade ótima em temperaturas altas, assim com a lipase B (CALB) produzida por *Pseudozyma antarctica*

(POOJARI; CLARSON, 2012) e a lipase produzida por *Bacillus pumillus* isolado a partir de amostras de solo do Antártico e com atividade ótima a 40 ° C (ARIFIN et al., 2013).

A partir da definição dos valores de atividade ótima para pH e temperatura, foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR visando verificação do efeito sinérgico dessas variáveis, utilizando os valores apresentados na Tabela 26. De acordo com os resultados do DCCR 2² com temperatura e pH, a maior atividade de lipase (2,88 U.mL⁻¹) foi obtida no ensaio 4 da Tabela 26 (47,1 °C e pH 5,71). Tanto o pH quanto a temperatura foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) (Tabela 27). O ponto ótimo foi próximo à região central, valor este definido anteriormente no ensaio univariável. A significância estatística das análises de pH e temperatura ótimas foi confirmada pelo teste F (ANOVA), como o valor do teste *F calculado* (11,71) foi maior do que o *F tabelado* (4,12) e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 87 \%$), o modelo foi considerado previsível e, portanto, usado para gerar os gráficos de contorno e superfícies de resposta apresentados na Figura 31.

Tabela 25. Valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura usados no DCCR 2² para atividade de lipase de *L. scottii* L117.

Variável	Valores codificados				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura °C	30	32,9	40	47,1	50
pH	4	4,29	5	5,71	6

Tabela 26. Matriz do planejamento DCCR 2² com 12 ensaios, 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para avaliar a influência do pH e da temperatura na atividade de lipase de *L. scottii* L117.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade Enzimática (U. mL ⁻¹)
1	-1 (32,9)	-1 (4,29)	1,858
2	1 (47,1)	-1 (4,29)	2,003
3	-1 (32,9)	1 (5,71)	1,694
4	1 (47,1)	1 (5,71)	2,887
5	-1,41 (30)	0 (5)	1,054
6	1,41 (50)	0 (5)	2,067
7	0 (40)	-1,41 (4)	2,039
8	0 (40)	1,41 (6)	1,994
9	0 (40)	0 (5)	2,468
10	0 (40)	0 (5)	2,564
11	0 (40)	0 (5)	2,531
12	0 (40)	0 (5)	2,564

Tabela 27. Coeficiente de regressão para o DCCR 2² da atividade ótima de lipase de *L. scottii* L117, função pH versus temperatura. R²=0,87.

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t-value	p <0,05
Mean/Interc.	2,531514	0,022643	111,8024	0,000002
Temperatura(L)	0,693618	0,032070	21,6284	0,000216
Temperatura(Q)	-0,812046	0,035951	-22,5874	0,000190
pH (Q)	-0,353384	0,035951	-9,8295	0,002238
1L by 2L	0,523540	0,045286	11,5608	0,001390

Figura 31. Superfícies de resposta e de contorno para atividade de lipase de *L. scottii* L117, DCCR 2² com a função pH versus temperatura ($p < 0,1$).

CAPÍTULO 3

5.3 Purificação parcial da lipase de *L. scottii* L117

5.3.1 Precipitação do extrato enzimático

Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Eleni Gomes (UNESP, São José do Rio Preto).

A precipitação das proteínas com álcool etílico 95 % foi realizada em cinco condições (1:1 para 1:5 de extrato enzimático: álcool etílico, v.v⁻¹) e o melhor resultado para a fração precipitada (1:2 - extrato enzimático: álcool etílico (v.v⁻¹) apresentou 78,52 % de recuperação enzimática e 1,5 vezes de fator de purificação quando comparado o precipitado ao extrato bruto. Entretanto, a fração precipitada apresentou viscosidade intensa, possivelmente devido à precipitação de resíduos de triglicerídeos do meio de cultura, inviabilizando a aplicação da amostra precipitada em coluna cromatográfica. Após filtração em membrana de 0,45 µm a vácuo (70 mL de extrato precipitado diluído 1:8 em tampão fosfato de sódio, pH 7,0, filtrado em 8 h), os precipitados apresentavam perda de 98 % da atividade enzimática, ficando a maior parte da enzima retida com as sujidades na membrana e inviabilizando a aplicação do precipitado em colunas cromatográficas. Assim, foi realizada uma nova precipitação com acetona gelada. Os resultados demonstraram uma maior atividade específica (45,5 U.mg⁻¹), rendimento de 90,5 % e fator de purificação de 5,05 FP (Tabela 28) quando comparada com a precipitação com álcool etílico.

Tabela 28. Planilha de purificação para precipitação com acetona gelada.

	Atividade Total	Proteína Total	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de Purificação (FP)
Amostra Bruta	0,448	0,050096	8,942829767	100	1
Precipitado Acetona 1:3	0,4056	0,0089124	45,50962704	90,535	5,088

Entretanto, a viscosidade do precipitado também foi muito alta, além da turbidez, com perda de 95 % de atividade enzimática quando filtrado em membrana 0,45 µm. Por outro lado, quando o sulfato de amônio foi utilizado, houve precipitação de 25 a 40 % de saturação de (NH₄)₂SO₄. Esse precipitado não apresentou atividade enzimática de lipase. A enzima ficou na fase sobrenadante, formando uma “nata” caracterizada por um aumento da viscosidade, o que também inviabilizou a aplicação deste precipitado por sal em colunas cromatográficas.

O problema de viscosidade e formação de agregados de alto peso molecular que dificultam a purificação de lipase foi relatado por Baron (2008) que optou por tratar o extrato enzimático com isopropanol para desagregação da lipase e redução da viscosidade. Para remoção da fração lipídica interferente caracterizada pela alta viscosidade do extrato de *L. scottii* L117, o precipitado de acetona foi submetido a ensaios com isopropanol, entretanto, este solvente apresentou efeito desnaturante para a enzima. Baron (2008) utilizou também uma mistura de solventes como clorofórmio, metanol, butanol e heptano para deslipidação do extrato e purificação de lipase de *Burkholderia cepacia* LTBE11. Entretanto, para tal avaliação, a enzima em questão deve apresentar estabilidade frente aos solventes utilizados.

Os extratos precipitados apresentaram bandas intensas próximo a região de 60 kDa (Figura 32). Em adição, no gel SDS-PAGE em condição não desnaturante (amostras não foram submetidas ao aquecimento e ao tratamento com β -mercaptoetanol) as amostras apresentaram atividade de esterificação, com duas bandas, evidenciando possivelmente a presença de duas enzimas lipase no extrato enzimático de *L. scottii* L117. As bandas apresentavam tamanho próximo a 96 kDa (Figura 33).

A versatilidade das lipases em realizar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação têm sido explorada para substituir processos existentes ou ainda para produzir uma série de compostos considerados praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional. A habilidade de esterificação de gordura e outros lipídeos por lipase têm sido aplicada em diferentes setores industriais como indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e mais recentemente na indústria de biocombustíveis (BARON, 2008; ZHONG et al., 2013).

Figura 32. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida 8 % para lipase de *L. scottii* L117. EB e EB2 – Extrato bruto; E – Precipitado com etanol, 1:3 – Precipitado com Acetona, FS – Precipitado com acetona Filtrado contendo sal, FB – Filtrado bruto, BL – extrato bruto liofilizado ressuspendido 1:5 do volume inicial, FL – Precipitado com acetona Filtrado Liofilizado ressuspendido em 1:5 do volume inicial.

Figura 33. Gel de zimograma de esterificação de lipase *L. scottii* 117. Amostra BL – Extrato bruto liofilizado e ressuspendido em 1:5 do volume inicial; PA – Precipitada com Acetona; PE – Precipitada com álcool etílico.

A falta de sucesso após diversas tentativas de precipitação da lipase de *L. scottii* L117 utilizando solventes orgânicos, culminou na escolha de uma outra metodologia de purificação, a extração em sistemas de líquido/líquido, os quais não utilizam solventes e são caracterizados por formarem duas fases aquosas imiscíveis (seção 5.3.2). A extração por sistemas de suas fases aquosas foi desenvolvida em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Adalberto Pessoa (FCF/USP).

5.3.2 Extração por Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Para os ensaios de seleção do melhor sistema de extração líquido-líquido, foi utilizado um extrato enzimático bruto de lipase de *L. scottii* L117 com atividade de $2,7 \text{ U.mL}^{-1}$, contendo 2 g de extrato, o que corresponde a quantidade inicial de enzima adicionada ao sistema, o $U_i=5,4$.

A partição da lipase foi avaliada nas fases *top* e *bottom* dos diferentes sistemas utilizados. Nos sistemas poliméricos PEG/Fosfato e PEG NaPA a atividade enzimática de lipase foi detectada apenas na fase *top* do sistema (fase pobre em PEG), não sendo quantificada na fase *bottom* do sistema (Tabela 29). A recuperação máxima de lipase na fase top (% RECTop) foi de 52,9 % e 40,5 % para os sistemas PEG/Fosfato e PEG/NaPA, respectivamente. Por outro lado, o balanço de massas dos sistemas foi baixo, PEG/Fosfato (38,5 a 52,9 %) e PEG/NaPA (36,1 a 40,5 %) indicando uma alta perda da atividade enzimática. Os resultados indicam que tais métodos de extração não foram satisfatórios para extração de lipase de *L. scottii* L117.

A partição de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 em sistema polimérico PEG/Fosfato foi avaliada e a lipase apresentou partição para fase rica em sal com PEG de 20.000 g.mol⁻¹. No entanto, o ensaio de otimização das condições de extração foi realizado com PEG 8.000 g.mol⁻¹, devido a alta viscosidade do PEG de maior massa molecular, além disto o pH e a temperatura ótimos foram de 6,0 e 4 °C, respectivamente (BARBOSA et al., 2011).

O terceiro método de SDFA, utilizando o detergente não iônico TX-114, apresentou menor perda de atividade enzimática, expressa pelo balanço de massas que variou de 84,7 a 113 % a 25 e 28 °C, respectivamente. A maior parte da lipase migrou para fase superior ou fase *Top* (fase pobre em micelas) com 48,34 ± 1,13 % e 67,35 ± 0,42 % de recuperação da enzima nas temperaturas de 25 e 28 °C, respectivamente. Entretanto, 36,37 ± 1,23 e 45,73 ± 0,5 da lipase migrou para fase *Bottom* (fase rica em micelas) a 25 e 28 °C, respectivamente (Tabela 29). Uma vez que as lipases são enzimas caracterizadas por apresentarem muitos resíduos hidrofóbicos, possivelmente houve influência na partição e migração para fase *bottom*. Esta fase do sistema se apresentou límpida e possivelmente sem os interferentes presentes nas precipitações com acetona e etanol que dificultaram a aplicação da amostra em sistemas cromatográficos clássicos.

Tabela 29. Atividade enzimática nas fases *Top* e *Bottom* dos três sistemas de extração SDFA (PEG/Fosfato, PEG/NaPA e Micelar com TX-114).

PEG/Fosfato								
Fase Top			Fase Bottom					
Peso molecular PEG	Volume (mL)	Atividade Lipase (U.mL ⁻¹)	U _{Top}	Volume (mL)	Atividade Lipase (U.mL ⁻¹)	U _{Bot}	Balanço de Atividades (% BA _{Lip})	K
1500	4,7	0,44	2,08	5,3	0	0	38,5	0
3000	4,4	0,65	2,86	5,6	0	0	52,9	0
8000	4,2	0,57	2,39	5,8	0	0	44,2	0
PEG/NaPA								
Fase Top			Fase Bottom					
Peso molecular PEG	Volume (mL)	Atividade Lipase (U.mL ⁻¹)	U _{Top}	Volume (mL)	Atividade Lipase (U.mL ⁻¹)	U _{Bot}	Balanço de Atividades (%BA _{Lip})	K
1500	3,9	0,5	1,95	6,1	0	0	36,1	0
3000	7,3	0,29	2,11	2,7	0	0	39,0	0
8000	7,3	0,3	2,19	2,7	0	0	40,5	0
Triton X-114								
Fase Top			Fase Bottom					
Temperatura (°C)	Volume (mL)	Atividade Lipase (U.mL ⁻¹)	U _{Top}	Volume (mL)	Atividade Lipase (U.mL ⁻¹)	U _{Bot}	Balanço de Atividades (%BA _{Lip})	K _{Lip}
25 °C	7,9	0,33	2,611	2,1	0,93	1,96	84,7 ± 2.3	0,75
28 °C	8,1	0,45	3,637	1,9	1,30	2,47	11,0 ± 0.9	0,68

Estudos anteriores reportam a extração de lipase por SDFA, tais como PEG/ Fosfato (BARBOSA et al., 2011; KHAYATI; ALIZADEH, 2013; ZHOU et al., 2013), copolímeros poli (óxido de etileno) – poli (óxido de propileno) (EOPO) e fosfato de potássio (SHOW et al., 2012), líquidos iônicos e sais inorgânicos (VENTURA et al., 2011) e surfactante não iônico (OOI et al., 2011). Entretanto, para cada enzima em particular uma avaliação do melhor método de extração por SDFA é necessária, não havendo um método de extração geral, aplicável a uma classe ou grupo de enzimas.

Neste sentido, as análises de extração de lipase foram continuadas com o sistema micelar, afim de avaliar a estabilidade da lipase frente ao TX-114 e otimizar por delineamento experimental a extração de lipase de *L. scottii* L117.

Os ensaios de estabilidade da lipase frente as altas concentrações de TX-114 foram realizados nas temperaturas 25° e 30 °C de extração. Para isto, o sistema de extração foi incubado por 16 h e a atividade enzimática avaliada a cada 2 horas. Foi definido como estabilidade a (%) de lipase recuperada nas diferentes fases do sistema pelo tempo de extração. Neste experimento, foram avaliados os balanços de atividade, coeficiente de partição e (%) de lipase recuperada na fase *bottom* do sistema micelar. Observou-se que o sistema de extração apresentou uma estabilidade na (%) de lipase recuperada do sistema a partir de 6 h de extração nas duas temperaturas utilizadas conforme o balanço de atividades (Figura 34) e a (%) de lipase recuperada na fase *bottom*. Além disto, as fases *bottom* apresentaram melhores resultados (recuperação de lipase) em altas concentrações de TX-114 (10 % de TX-114 em 6 h de extração a 25 °C). Assim, foi definido o tempo de extração (6 h) para o ensaio de otimização DCCR 2³ e a concentração de TX-114 (4-12 %, m.m⁻¹) a ser utilizada nos ensaios de otimização.

Os balanços de atividades apresentaram 99,6 % (10 % de TX-114 em 4 h de extração) e 38,3 % (4 % de TX-114 em 2 h de extração), ambos a 25 °C. No entanto, esses valores variaram ao longo do período de incubação. Por outro lado, o balanço de massas a 30 °C foi de 94,6 % (8 % de TX-114 em 4 h de incubação) e 51,1 % com 4 % de TX-114 e 16 h de incubação. O balanço de atividade a 25 °C e a 30 °C foi alto em altas concentrações de TX-114 (6, 8, 10 %) e maiores tempos de incubação (8, 12 e 16 h), indicando a não desnaturação da lipase nas condições avaliadas (Figura 34).

O coeficiente de partição foi avaliado nas mesmas condições do balanço de atividades. A partição da lipase a 25 °C apresentou altos valores de em altas concentrações de TX-114 (8 e 10 %), com $K = 2,2$ com 8 % de TX-114 e 4 h de incubação e $K = 10,6$ para 10 % de TX-114 e 2 h de incubação. Por outro lado, a partição da lipase a 30 °C foi menor quando comparado a 25 °C, com $K = 1,53$ com 8 h de incubação e 8% de TX-114. A enzima particionou preferencialmente para fase *top* (fase pobre em micelas) do sistema no ensaio a 30 °C, com valores de $K < 1,0$. Por outro lado, a partição da lipase a 25 °C foi maior para fase *bottom* (fase rica em micelas).

A)

B)

Figura 34. Balanço de atividades (%BA) de lipase de *L. scotti* L117 em sistema micelar utilizando TX-114 (4-12 %, m.m⁻¹) e 16 h de incubação. **A)** 25 °C, **B)** 30 °C. O eixo X representa o tempo após a separação de fases. Os ensaios a 12% de TX-114 a 25°C e 2% de TX-114 a 30°C não apresentaram separação de fases. No tempo 0 o balanço de atividades foi de 100%.

Os valores de lipase recuperados na fase *bottom* apresentaram variação de 19,5 % (4 % de TX-114 e 2 h de incubação) a 58,1 % (8 % de TX-114 e 4 h de incubação) a 25 °C. Por outro lado, utilizando altas concentrações de surfactante (10 %) a lipase recuperada na fase *bottom* variou de

43,8 % (12 h) para 83,6 % (4 h). A variação de lipase recuperada na fase bottom a 30 °C foi de 23,4 % (6 % de TX-114 e 12 h) a 58,8 % (8 % de TX-114 e 8 h).

5.3.3 Otimização das Condições de Extração de Lipase de *L. scottii* L117 por Sistema Micelar

Após definida a estabilidade da lipase em TX-114 e melhor tempo de extração (6 h), foram avaliadas a concentração de % TX-114 (4-12 %), o pH (4,5-7,5) e a temperatura (23-33 °C) em um DCCR 2³. De acordo com os resultados de otimização, o ensaio 5 apresentou melhor (%) de recuperação na fase *bottom* (93,85 %) e coeficiente de partição ($K = 7,76$), entretanto baixo fator de purificação ($FP = 1,2$) (Tabela 30). No ensaio 11, a recuperação na fase *bottom* foi de 73,53 %, $K = 4,77$ e fator de purificação de 1,97 (Tabela 30, Figura 35). A fase bottom apresentou aspecto límpido e transparente, no entanto a fase top apresentava-se com aspecto turvo e amarelado (Figura 35).

Tabela 30. Matriz do planejamento DCCR 2³ com 8 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais utilizada para avaliar o efeito das variáveis TX-114, pH e temperatura na partição da lipase de *L. scottii* L117 em sistema micelar (após 6 de incubação).

Ensaio	T (°C)	pH	TX-114	U _{TOP}	U _{BOT}	Lipase recuperada fase <i>Top</i> (%)	Lipase recuperada fase <i>Bottom</i> (%)	Balço de Atividades (BA)	Coefficiente de Partição (K)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação (FP)
1	-1	-1	-1	1,27	2,63	23,62	48,73	72,3	2,06	1,22	1,17
2	1	-1	-1	1,69	2,10	31,42	38,98	70,4	1,24	1,30	1,26
3	-1	1	-1	2,32	0,72	43,01	13,49	56,5	0,31	0,82	0,79
4	1	1	-1	2,17	0,55	40,25	10,3	50,5	0,25	0,39	0,37
5	-1	-1	1	0,65	5,06	12,08	93,85	105,9	7,76	1,24	1,20
6	1	-1	1	0,52	3,40	9,64	63,01	72,6	6,53	1,25	1,21
7	-1	1	1	2,06	3,56	38,29	66,05	104,3	1,72	0,79	0,76
8	1	1	1	1,93	2,04	35,78	37,83	73,6	1,05	1,49	1,44
9	-1,68	0	0	1,06	3,97	19,63	73,63	93,2	3,75	1,67	1,61
10	1,68	0	0	1,30	1,79	24,21	33,18	57,3	1,37	0,69	0,66
11	0	-1,68	0	0,83	3,97	15,41	73,53	88,9	4,77	2,04	1,97
12	0	1,68	0	1,18	1,85	21,97	34,4	56,3	1,56	2,06	1,99
13	0	0	-1,68	2,24	1,50	41,52	27,95	69,4	0,67	1,15	1,10
14	0	0	1,68	0,36	2,79	6,73	51,82	58,5	7,69	0,92	0,88
15	0	0	0	1,16	2,76	21,6	51,22	72,8	2,37	1,56	1,50
16	0	0	0	1,23	2,77	22,84	51,39	74,2	2,25	1,55	1,50
17	0	0	0	1,19	2,71	22,16	50,19	72,3	2,26	1,60	1,55

Figura 35. Visualização do sistema micelar TX-114 (ensaio 11) após a completa separação de fases. Fase *Top* (FT) – fase pobre em micelas e fase *Bottom* (FB) – fase rica em micelas.

As 3 variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando a variável resposta foi (%) de Recuperação na fase *Bottom* ($r^2=0,93$), com o Triton X-114 apresentando efeito positivo e temperatura e o pH apresentando efeito negativo (Tabelas 31 e 32). A significância estatística das análises (Tabela 32) foi confirmada pelo teste F (ANOVA). Como o valor do teste F (25,65) para a regressão foi altamente significativo [maior do que o F tabelado (3,41), $p < 0,05$] e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2= 85,55 \%$), o modelo foi considerado previsível e, portanto, usado para gerar os gráficos de contorno e superfícies de resposta apresentados na Figura 36.

Tabela 31. Coeficiente de regressão DCCR 2³ para extração de lipase de *L. scottii* L117 por sistema micelar com Triton X114. Variável Resposta – (%) de recuperação de lipase na fase *Bottom*. $R^2 = 0,855$.

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t-value	p-value <0,05
Mean/Interc.	48,2088	0,157486	306,1142	0,000011
(1) Temperatura (°C)(L)	-10,2571	0,175786	-58,3499	0,000294
(2) pH (L)	-13,3852	0,175786	-76,1449	0,000172
(3) Triton TX114 (%) (L)	13,8765	0,175786	78,9396	0,000160

Tabela 32. Tabela Anova do DCCR 2³ para extração de lipase de *L. scottii* L117 por sistema micelar utilizando como variável resposta a (%) de recuperação na fase *Bottom*. $p < 0,05$

Fonte de Variação	Soma dos quadrados - SQ	Graus de liberdade - GL	Quadrado médio - QM	F calculado Fcal
Regressão	6507,6	3	2169,195312	25,657594
Resíduo	1099,07184	13	84,54398772	
F ajuste	1098,229	11	99,83896124	236,7909588
Erro puro	0,843	2	0,421633333	
Total	7606,658	16	475,416111

Figura 36. Superfícies de respostas e de contorno para (%) de recuperação de lipase na fase bottom do sistema micelar. **(A)** Temperatura versus pH; **(B)** TX114 versus pH; **(C)** TX114 versus Temperatura.

Baseado nos resultados estatísticos quando a variável resposta foi coeficiente de partição (K), além das três variáveis que foram significativas na forma linear, o TX-114 na forma quadrática e a interação pH e TX-114 foram estatisticamente significativos ($p < 0,1$) (Tabela 33). O pH e a temperatura influenciaram negativamente e a concentração de TX-114 positivamente. A significância estatística das análises (Tabela 34) foi confirmada pelo teste F (ANOVA). Como o valor do teste F (33,78) para a regressão foi significativo [maior do que o F tabelado (2,45)] e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 93,89 \%$), o modelo foi considerado previsível e usado para gerar as superfícies de contorno e de resposta apresentados na Figura 37.

Tabela 33. Coeficiente de regressão DCCR 2³ para extração de lipase por sistema micelar utilizando Triton 114. Variável Resposta – Coeficiente de partição (K). $R^2 = 0,938$ ($p < 0,1$)

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t-value	p-value <0,1
Mean/Interc.	2,41091	0,021928	109,9489	0,000083
(1) Temperatura (C)(L)	-0,49678	0,018025	-27,5599	0,001314
(2) pH (L)	-1,44031	0,018025	-79,9053	0,000157
(3) Triton TX114 (%) (L)	1,83173	0,018025	101,6202	0,000097
Triton TX114 (%) (Q)	0,48550	0,018481	26,2700	0,001446
2L by 3L	-1,09750	0,023541	-46,6213	0,000460

Tabela 34. Tabela Anova do DCCR 2³ para extração de lipase de *L. scottii* L117 por sistema micelar. Variável Resposta Coeficiente de Partição (K). ($p < 0,1$)

Fonte de Variação	Soma dos quadrados - SQ	Graus de liberdade - GL	Quadrado médio - QM	F calculado Fcal
Regressão	90,2	5	18,03013049	33,78475523
Resíduo	5,870441684	11	0,533676517	
F ajuste	5,86158	9	0,651286113	146,906642
Erro puro	0,00887	2	0,004433333	
Total	96,02109	16	6,001318382

Figura 37. Superfícies de contorno e de respostas para avaliação da partição da lipase (K) em sistema micelar. **A)** TX-114 versus Temperatura; **B)** TX-114 versus pH.

Por outro lado, quando foi utilizado o fator de purificação (FP) como variável resposta, apenas a variável Triton X-114 na forma quadrática foi estatisticamente significativa ($p < 0,1$), entretanto o coeficiente de regressão foi baixo $R^2 = 0,64$.

Neste planejamento não foi possível à visualização do ponto de inflexão para as variáveis avaliadas, por isto foi realizado um novo planejamento DCCR 2³, com novo intervalo para as variáveis pH (3,0 a 7,0), temperatura (19,0 a 31,0 °C) e TX -114 (2,0 a 14,0 %), valores sugeridos pelo planejamento anterior (Tabela 35).

Tabela 35. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no segundo DCCR 2³ para extração de lipase de *L. scottii* L117 por sistema micelar utilizando TX-114.

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura °C	19	21,42	25	28,58	31
pH	3,0	3,81	5	6,19	7,0
Triton TX114 (%)	2	4,43	8	11,57	14

Utilizando como variável resposta a recuperação de lipase na fase *bottom*, o coeficiente de regressão foi baixo ($R^2=59,8\%$) não sendo possível prever modelo estatístico. A recuperação de lipase na fase *bottom* variou de 0 a 73,22 %. Além disso, três ensaios não apresentaram formação de sistema, o qual não houve separação de fases (ensaio 5 - pH de 3,81, 21,42 °C e 11,57 % de TX - 114, ensaio 11 - pH 3,0, 25 °C e 8 % de TX - 114, ensaio 14 - pH de 5,25 °C e 14 % de TX-114). Embora não fosse previsível prever modelo estatístico este segundo DCCR, permitiu avaliar que se reduzir o pH e a temperatura abaixo do limite inferior da primeira DCCR ou se aumentar o teor de TX - 114, não há formação de sistema micelar.

Tabela 36. Matriz do planejamento DCCR 2³ com 17 ensaios, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para avaliar 3 variáveis no sistema de extração de lipase de *L. scottii* L117.

Ensaio	Temperatura	pH	Triton X-114 (%)	Volume Top (mL)	Volume Bottom (mL)	(%) Recuperado fase Bottom
1	-1	-1	-1	6,8	3,2	48,45
2	1	-1	-1	7,7	2,3	38,76
3	-1	1	-1	7,2	2,8	13,41
4	1	1	-1	8,0	2,0	10,24
5	-1	-1	1	Não formou sistema		0
6	1	-1	1	2,3	7,7	62,65
7	-1	1	1	1,3	8,7	65,68
8	1	1	1	3,7	6,3	37,62
9	-1,68	0	0	3,8	6,2	73,22
10	1,68	0	0	5,9	4,1	32,99
11	0	-1,68	0	Não formou sistema		0
12	0	1,68	0	5,0	5,0	34,21
13	0	0	-1,68	9,0	1,0	27,79
14	0	0	1,68	Não formou sistema		0
15	0	0	0	4,1	5,9	50,93
16	0	0	0	4,1	5,9	51,10
17	0	0	0	4,1	5,9	49,91

Lipases são enzimas com muitos resíduos hidrofóbicos (MINUTH, 2008; OOI et al., 2011), o que possivelmente influenciou na partição da enzima para fase rica em micelas (fase *bottom*) do sistema com TX-114. Resultado similar foi observado para lipase de *Burkholderia* sp. ST8, a qual partiu preferencialmente para fase rica em micelas devido à afinidade hidrofóbica. De acordo com Ooi et al., (2011) esta interação possivelmente ocorre entre o núcleo da micela e a superfície hidrofóbica da lipase.

Por outro lado, proteínas hidrofílicas (protease, lisozima, piruvato descarboxilase e albumina de soro bovino) apresentaram maior partição para fase pobre em micelas em SDFA com valores de *K* próximo a 1 (TERSTAPPEN; RAMELMEIER; KULA, 1993). Surfactantes não iônicos têm sido utilizados para solubilizar proteínas associadas a membranas com baixa perda de sua atividade biológica. Durante a solubilização, o agente tensioativo não iônico substitui moléculas lipídicas em contato com o domínio hidrofóbico da proteína anfílica formando uma micela mista de proteína e surfactante (BESEL, 2003).

Em sistemas micelares a formação das micelas ocorre como estruturas de organização geométrica definida, tais como estrutura lamelar, cilíndrica, esférica e ou planar e tal formação ocorre quando a concentração do surfactante utilizado atinge uma concentração mínima, a concentração micelar crítica (CMC). Em geral, tais sistemas de extração, tanto poliméricos quanto micelares são sistemas que apresentam alto conteúdo de água (60 to 90 %), evitando assim a desnaturação enzimática (BESEL, 2003; JIANG et al., 2014).

De acordo com os ensaios de otimização da extração de lipase de *L. scotti* L117, o pH influenciou negativamente na partição da enzima, quanto menor pH melhor a partição, o balanço de atividades e a recuperação de lipase na fase *bottom*. A melhor condição foi a pH 4,5 do primeiro DCCR, ensaio 11, com balanço de atividades 88,9, *K* = 4,77, atividade específica 2,04 e 1,97 de fator de purificação.

Nandini e Rastogi (2011) avaliaram a extração de lipase produzida por *Aspergillus niger* por sistema polimérico PEG / fosfato em uma faixa de pH variando de 6,0 a 9,0. O decréscimo do pH de 9,0 para 6,0 reduziu o rendimento de recuperação da lipase de 92,16 para 36,22 % e o fator de purificação variou de 1,85 para 0,86. Tal resultado pode estar associado a baixa estabilidade da lipase em questão em pH baixos, além disto, esta foi caracterizada como uma lipase alcalina, apresentando melhor atividade enzimática em pH variando de 7,0 a 9,0.

O pH pode alterar a carga de grupos químicos presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos, modificando a carga líquida global da proteína. O número de grupos carregados sobre a superfície da molécula de proteína varia, o que implica em modificações na estrutura conformacional secundária, terciária e quaternária da proteína (BESEL, 2003; OOI et al., 2011; LI et al., 2014). Esta variável também pode alterar as interações entre micelas e proteína e consequentemente o

comportamento do sistema de duas fases aquosas, assim como recuperação da enzima na fase *bottom* e o coeficiente de partição.

Por outro lado, a concentração de TX-114 influenciou positivamente na partição da lipase, entretanto quando utilizadas concentrações acima de 14 % de TX-114 não houve formação de sistemas. A afinidade de proteínas ao surfactante é baseada principalmente na sua hidrofobicidade de superfície, tamanho ou carga (OOI et al., 2011).

Cabe ressaltar que os resultados referentes à etapa de extração da lipase de *L. scottii* L117 aqui apresentados estão reportados no artigo intitulado "*Liquid-Liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems" (em fase de submissão para a revista *Separation and Purification Technology*).

CAPÍTULO 4

5.4 Diversidade de Leveduras Associadas a Macroalgas e Líquens do Ambiente Antártico

5.4.1 Diversidade de leveduras associadas a macroalgas

Um total de 15 macroalgas de 11 espécies diferentes (Tabela 2, Figura 38) foi coletada em 8 pontos distribuídos em 5 ilhas das *Shetlands* do Sul. As macroalgas foram identificadas por Profa. Dra Franciane Pellizzari (Universidade Estadual do Paraná) como pertencentes aos filos: i) Phaeophyceae (algas pardas): *Ascoseira mirabilis*, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia menziesii*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Himantothallus grandifolius*, ii) Rhodophyta (algas vermelhas): *Gigartina skottsbergii*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Curdiea racovitzae* e, iii) Chlorophyta (algas verdes): *Monostroma hariotii*.

Figura 38. Macroalgas coletadas no arquipélago das *Shetlands* do Sul (Antártica Marítima) e utilizadas no isolamento de leveduras a 5 e 15 °C. **1.** *Adenocystis utricularis* (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg (Austrália, Nova Zelândia e Antártica); **2.** *Ascoseira mirabilis* Skottsberg (Antártica e Ilhas subantárticas); **3.** *Curdiea racovitzae* Hariot (Antártica e Ilhas subantárticas); **4.** *Desmarestia anceps* Montagne (Cosmopolita); **5.** *Desmarestia menziesii* J Agardh (Antártica e Ilhas subantárticas); **6.** *Cystosphaera jacquinotii* Montagne (Skottsberg) (Antártica e Ilhas subantárticas); **7.** *Gigartina skottsbergii* Setchell & NL Gardner (América do Sul e Antártica), **8.** *Himantothallus grandifolius* (A Gepp and Gepp) Zinova (Antártica e Ilhas subantárticas); **9.** *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent (Cosmopolita). Barra corresponde a 1cm.

No momento da coleta foram registrados os parâmetros: temperatura e a salinidade da água do mar. A temperatura da água variou nos diferentes pontos de coleta de -1,4 °C na ilha *Half Moon* a 2,1 °C na ilha de origem vulcânica *Deception* – Fumarole Bay e a salinidade variou de 30 na ilha *Deception* – Fumarole Bay a 37 ppt na ilha Robert – Carlota Cove (Tabela 2).

Resultados semelhantes foram observados por Furbino et al., (2014). Os autores avaliaram a diversidade de fungos filamentosos e leveduras associadas a *Porphyra endiviifolia* e *Monostroma hariatii* coletadas no ambiente Antártico (ilhas Rei George, *Deception* e Elefante) e observaram uma variação de 0,5 a 3,7 °C de temperatura da água nas ilhas Rei George e *Deception*, respectivamente. Por outro lado, a salinidade variou de 32,1 a 35,2 ppt nas ilhas *Deception* e Elefante, respectivamente.

Foram isoladas 205 leveduras a partir das amostras de macroalgas, sendo 59 leveduras isoladas por cultivo a 5 °C e 146 a 15 °C. Em relação ao meio de cultivo utilizado 196 leveduras foram recuperadas a partir do meio de cultura YMA e apenas 9 do meio utilizado para isolamento de leveduras oligotróficas, meio PDB diluído 10X e acrescido de Ágar, ambos com ASW. A maior parte das leveduras foi isolada a partir de macroalgas do Filo Rhodophyta *Gigartina skottsbergii* (n=54, 26,3 %). Esta macroalga foi coletada em três ilhas Antárticas: Ilha *Half Moon*, Rei George e Ilha Robert (Tabela 2). Em seguida, as leveduras foram recuperadas a partir de *Himantothallus grandifolius* (n = 38, 18,5 %), *Desmarestia menziesii* (n = 33, 16 %), *Adenocystis utriculares* (n = 21, 10 %), *Monostroma hariatii* (n = 13, 6 %), *Curdiea racovitzae* (n=12, 6 %), *Cystosphaera jacquinotti* (n = 9, 6 %), *Desmarestia anceps* e *Palmaria decipiens* (n = 8, 4 %), *Ascoseira mirabilis* (n = 6, 3%), *Iridaea cordata* (n = 3, 2 %) (Figura 39).

Quanto ao local de coleta das macroalgas utilizadas no isolamento, o maior número de leveduras foi recuperado a partir de macroalgas coletadas na ilha Rei George (n=81, 39,5 %), seguido pelas ilhas Robert (n=70, 34 %), *Half Moon* (n = 26, 12,7 %), *Deception* (n = 21, 10 %) e Nelson (n = 7, 4 %).

Figura 39. Ocorrência de leveduras isoladas de seus respectivos substratos de origem (macroalgas da Antártica). Todas as macroalgas foram amostras de apenas 1 ilha, exceto *Gigartina skottsbergii* (3 ilhas); *Iridaea cordata* e *Desmarestia menziesii* (2 ilhas).

As leveduras foram identificadas por taxonomia molecular (sequenciamento da região D1/D2 do DNAr 26S e região ITS1-ITS2). Os resultados da identificação revelaram a presença de 14 gêneros de leveduras (Tabela 37), sendo dois pertencentes ao Filo Ascomycota: *Metschnikowia* (n= 84, 40,9 %) e *Candida* (n = 9, 4,4 %) e o restante pertencente ao Filo Basidiomycota: *Mrakia* (n = 42, 20,5 %), *Rhodotorula* (n = 20, 9,75 %), *Glaciozyma*, *Leucosporidiella* (n = 8, 3,9 %), *Dioszegia* (n = 6, 2,9 %), *Cryptococcus* (n = 6, 2,9 %), *Pseudozyma* (n = 6, 2,9 %), *Holtermanniella*, *Sporidiobolus* (n = 4, 1,9 %), *Tilletiopsis* (n = 3, 1,5 %) e *Sporisorium penniseti* (n = 1, 0,5 %). Isolados de PDDEC e AURO não apresentaram definição de gênero e foram identificadas a nível de família: *Ustilaginaceae* sp.1 (n = 2, 1%) e *Ustilaginaceae* sp.2 (n = 1, 0,5%).

Tabela 37. Continuação...		AMRO	AURO	CJPP	CRHM	DAPP	DMNE	DMRO	GSHM	GSRG	GSRO	HGRG	ICHM	ICRO	MHDEC	PDDEC	
<i>Ustilaginaceae</i> sp.2	Ustilaginomycotina	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Rhodotorula glacialis</i>	Pucciniomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	5	-	-	-	-	19
<i>Rhodotorula marina</i>	Pucciniomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Pucciniomycotina	-	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Sporisorium penniseti</i>	Ustilaginomycotina	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	Ustilaginomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
Número de number (n)		3	21	9	12	8	7	26	12	26	16	38	2	4	13	8	205
Taxa (n)		1	6	2	2	2	2	4	2	5	3	11	1	2	1	5	

As siglas das asmostras correspondem a espécie de macroalga e ao local de coleta (Ilha Antártica):

Ilha Robert: *Ascoseira mirabilis* – AMRO, *Adenocystis utricularis* – AURO, *Gigartina skottsbergii* – GSRO, *Iridaea cordata* – ICRO, *Desmarestia menziesii* – DMRO;

Ilha Deception: *Palmaria decipiens* – PDDEC, *Monostroma hariatii* – MHDEC;

Ilha Half Moon: *Gigartina skottsbergii* GSHM, *Iridaea cordata* – ICHM, *Curdiea racovitzae* – CRHM;

Ilha Rei George – Punta Plaza: *Cystosphaera jacquiniotii* – CJPP, *Desmarestia anceps* – DAPP;

Ilha Rei George: *Gigartina skottsbergii* – GSRG, *Himantothallus grandifolius* HGRG;

Ilha Nelson: *Desmarestia menziesii* DMNE.

Foram identificados 24 táxons de leveduras, o mais abundante foi *Metschnikowia australis* (classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales) (n = 84, 40,9 %), recuperado a partir de todas as amostras de macroalgas, exceto em *Monostroma hariatii* (MHDEC) e *Palmaria decipiens* (PDDEC), ambas coletadas na ilha *Deception* (Tabela 37).

Resultados similares foram reportados por Furbino et al., (2014), estudando a diversidade fúngica associada às macroalgas *Porphyra endiviifolia* (Rhodophyta) e *Monostroma hariatii* (Chlorophyta) revelaram que a espécie mais abundante foi *Metschnikowia australis* (17,2 %), e que a mesma não foi recuperada a partir de macroalgas coletadas na ilha *Deception*. Loque et al., (2010) avaliaram a diversidade fúngica associada as macroalgas *Desmarestia anceps* (Phaeophyceae), *Adenocystis utricularis* (Phaeophyceae) e *Palmaria decipiens* (Rhodophyta) e observaram que *Metschnikowia australis* também foi a levedura com maior abundância nas macroalgas estudadas.

Por outro lado, em um estudo sobre a avaliação da diversidade de fungos endofíticos associados a 25 espécies de macroalgas coletadas na costa do Estado de Tamilnadu no sudeste da Índia (11 Phaeophyceae, 8 Rhodophyta e 6 Chlorophyta) foi reportado que o gênero *Aspergillus* foi o mais abundante e que 5 taxóons de leveduras foram recuperados, porém não identificados (SURYANARAYANAN et al., 2010). A ocorrência de táxons de levedura, ambos com pigmento vermelho e também não identificados, foi reportada também em estudo de avaliação taxômica de fungos endofíticos isolados a partir de 14 espécies de macroalgas coletadas na região costeira do Atlântico do Canadá (7 Rodophyta, 4 Phaeophyceae e 3 Chlorophyta). Estas leveduras foram recuperadas a partir da macroalga Rhodophyta *Mastocarpus stellatus* (FLEWELLING et al., 2013).

O segundo táxon com maior abundância no presente trabalho foi *Mrakia* sp. (classe Tremellomycetes, ordem Cystofilobasidiales) (n = 45, 21,9 %) presente em 5 espécies de macroalgas: *Cystosphaera jacquinotti*, *Desmarestia menziesii*, *Himantothallus grandifolius* (Phaeophyceae), *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta) e *Monostroma hariatii* (Chlorophyta). O gênero *Mrakia* possui a região D1/D2 do DNA ribossomal bastante conservada em diferentes espécies, não podendo o sequenciamento desta região ser utilizado para definição da espécie (THOMAS-HALL et al., 2010). A similaridade de sequências de diferentes representantes do gênero *Mrakia*, como as espécies *M. robertii*, *M. frigida* e *M. gelida* com a sequência do gene rDNA D1/D2 da levedura 43.HGRG isolada no presente estudo é observada na Figura 40. O sequenciamento da região ITS1/ITS2 é necessário para definição de espécie deste gênero.

Figura 40. Árvore filogenética da sequência de DNA ribossomal 26S para *Mrakia* sp. isolada de macroalga do ambiente Antártico utilizando o método de *Neighbour-joining*, o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e *bootstraps* com 1000 repetições. *Guehomyces pullulans* AFTOL-ID 1958^T foi utilizada como *outgroup*.

Mrakia sp. foi o único táxon recuperado a partir de macroalgas coletadas nas 5 ilhas estudadas. Os 24 táxons de leveduras apresentaram distribuição diferenciada por substrato (macroalga) e pela origem geográfica (ilha Antártica). Dos 24 táxons identificados, 19 ocorreram apenas uma ilha do ambiente Antártico: ilha Rei George (10 táxons), seguido por ilha *Deception* (5 táxons) e ilha Robert (4 táxons). (Figura 41).

Figura 41. Diagrama de Venn indicando a origem (ilha de coleta) dos diferentes táxons de leveduras recuperadas de macroalgas do ambiente Antártico.

Assim como o gênero *Mrakia*, representantes de *Cryptococcus magnus* e *Filobasidium floriforme* (forma anamorfa de *Cryptococcus albidus*), possuem alta similaridade no domínio D1/D2 do DNA ribossomal (BEH et al., 2006). Neste trabalho a levedura 8.PDDEC foi recuperada de *Palmaria decipiens* (Rhodophyta) e apresenta tais características. O sequenciamento da região IT1-ITS2 definiu a espécie como *Cryptococcus magnus* (Figura 42). Esta levedura tem sido recuperada a partir de outros ambientes frios tais como as geleiras Glacier du Géant, na França e Miage Glacier na Itália (TURCHETTI et al., 2013).

A)

B)

Figura 42. Árvore filogenética da sequência de DNA ribossomal para o isolado de macroalga *Palmaria decipiens* 8.PDDEC utilizando o método de *Neighbour-joining*, modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e *bootstrap* com 1000 repetições. **(A)** região D1/D2 do rDNA 26S; **(B)** região ITS1-ITS2 do rDNA 26S. *Cryptococcus terricolus* CBS 4517^T e *Cryptococcus antarcticus* CBS7689^T, *Cryptococcus antarcticus* CBS7689^T foram utilizados como *outgroup* para o rDNA D1/D2 e ITS1-ITS2, respectivamente.

Dentre as demais leveduras isoladas a a partir das macroalgas pode-se destacar: *Rhodotorula glacialis* (n = 19), *Candida sake* (n = 9), *Leucosporidiella muscorum* (n = 8), *Glaciozyma litorale* (n = 7), *Dioszegia xingshanensis* (n = 5) e *Sporidiobolus pararoseus* (n = 4) (Tabela 37).

O maior número de táxons foi recuperado a partir da macroalga parda *Himantothallus grandifolius* – HGRG, endêmica do ambiente Antártico. Esta macroalga pode apresentar comprimento de até 10 metros, estando bem adaptada as condições extremas de temperatura e ausência de luz durante o inverno (WIENCKE; CLAYTON, 2002). Foram recuperados 37 isolados pertencentes a 11 táxons distintos. Deste total, sete táxons foram recuperados apenas desta macroalga: *C. carnescens*, *C. victoriae*, *Cryptococcus* sp. 1, *Dioszegia xingshanensis*, *Holtermanniella festucosa*, *H. nyarrowii*, *Leucosporidiella fragaria* (Tabela 37). Não há na literatura dados sobre a diversidade de leveduras relacionada a *Himantothallus grandifolius*, sendo este o primeiro estudo.

Quanto às leveduras isoladas das macroalgas *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta), a maior diversidade foi encontrada nas amostras coletadas na ilha Rei George (n = 5 táxons), seguida pelas amostras da Ilha Robert (n = 3 táxons) e *Half Monn* (n = 2 táxons). *Metschnikowia australis* e *Mrakia* sp. foram isoladas a partir das amostras de macroalgas coletadas nas três ilhas Antárticas: Rei George, Robert e *Half Monn* (Tabela 37).

Para as amostras da macroalga *Adenocystis utricularis* (Phaeophyceae) foram identificados seis táxons diferentes de leveduras associadas: *Metschnikowia australis*, *Glaciozyma litorale*, *Pseudozyma* sp.1, *Ustilaginaceae* sp. 2, *Pseudozyma tsukubaensis* e *Sporidiobolus pararoseus*. Godinho et al., (2013) avaliando a diversidade fúngica associada a *Adenocystis utricularis* recuperaram as leveduras *Meyerozyma caribbica* e *Debaromyces hansenii*.

A partir da macroalga *Palmaria decipiens* (Rhodophyta) foram recuperados 8 isolados de 5 espécies diferentes: *Dioszegia athyri*, *Cryptococcus magnus*, *Ustilaginaceae* sp. 1, *Rhodototula marina* e *Tilletiopsis washingtonensis*. Todas essas leveduras foram recuperadas apenas dessa macroalga.

Godinho et al., (2013) avaliaram a diversidade fúngica relacionada a oito espécies de macroalgas de ocorrência no ambiente Antártico: *Acrosiphonia arcta* (cosmopolita), *Adenocystis* sp. (maioria endêmica), *Adenocystis utricularis* (Austrália, Nova Zelândia e Antártica), *Monostroma hariotii* (Antártica e ilhas subantárticas), *Palmaria decipiens* (Antártica e ilhas subantárticas), *Ulva intestinalis* (cosmopolita), *Phaeurus antarcticus* (Antártica e ilhas subantárticas) e *Desmarestia menziesii* (Antártica e ilhas subantárticas). Os autores recuperaram 148 fungos pertencentes a 21 gêneros e 50 táxons. Os autores recuperaram apenas fungos filamentosos a partir de *Palmaria decipiens*. No estudo reportado por Furbino et al., (2014) referente à avaliação da diversidade fúngica associada a macroalgas *Monostroma hariotti* e *Porphyra endiviifolia* (coletadas nas ilhas

Elefante, Rei George e *Deception*) do total de 239 fungos foram identificados 18 gêneros de 48 táxons distintos.

Embora as macroalgas desempenhem um papel essencial na vida costeira marinha devido à na ciclagem de nutriente, produção de metabólitos bioativos, dentre outras funções, estudos sobre leveduras associados às macroalgas da Antártica são escassos e muitas das espécies algícolas são endêmicas e/ou adaptadas a essa região, podendo constituir uma fonte atrativa de novas espécies e metabólitos de interesse biotecnológico (FURBINO et al., 2014; WIENCKE; CLAYTON, 2002).

5.4.2. Diversidade de leveduras associadas a líquens

Um total de 11 amostras de líquens (Tabela 2, Figura 43) foi coletado em diferentes pontos nas *Shetlands* dos Sul (Antártica marítima). As amostras de líquens foram parcialmente identificadas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Virginia Petry (Universidade do Vale do Rio dos Sinos) como possivelmente pertencentes as espécies *Usnea antartica*, *Usnea auratiaco-atra* e *Usnea fasciata*. Entretanto, como a especiação não foi confirmada, foi considerado apenas o gênero *Usnea* e, desta forma, foi utilizada uma codificação numérica (Tabela 2).

Figura 43. Líquens coletados no arquipélago *Shetlands* do Sul (Antártica Marítima) e utilizados no isolamento de leveduras a 5 e 15 °C. Barra corresponde 1 cm.

Um total de 200 leveduras foi recuperado das 11 amostras de líquens estudadas. Deste total, 66 (33%) leveduras foram recuperadas por cultivo a 5 °C e 134 (67%) a 15 °C. Com relação ao meio de cultivo, 51 (25,5%) leveduras foram recuperadas do meio oligotrófico PDB diluído 10 vezes e 149 (74,5%) leveduras a partir do meio de cultivo YMA. As leveduras foram isoladas a partir das amostras L31 (n = 39, 20 %), L11 (n = 38, 19 %), L20 (n = 29, 14,5 %), L27 (n = 23, 11,5 %), L25 (n = 22, 11 %),

L10 e L15 (n = 12, 6 %), L33 (n = 11, 5,5 %), L9 (n = 9, 4,5 %), L22 (n = 3, 1,5 %) e L2 (n = 2, 1 %) (Figura 44).

Figura 44. Ocorrência de leveduras (número de isolados) de seus respectivos substratos de origem (líquens da Antártica).

De acordo com a origem geográfica, a maior parte das leveduras foi recuperada a partir de líquens coletados nas ilhas Pinguim (L27 e L31: n = 73, 36,5 %), Rei George (L20, L22 e L25: n = 54, 27 %), *Half Moon* (L11 e L15: n = 50, 25 %), *Livingston* (L9 e L10: n = 21, 10,5 %). Nelson (L33: n = 11, 5,5%) e *Deception* (L2: n = 2, 1 %).

A maioria das leveduras recuperadas de líquens do ambiente Antártico foi do Filo Basidiomycota (n = 182, 91%): *Cryptococcus* (n = 85, 42,5 %), *Rhodotorula* (n = 80, 40%), *Mrakia* (n = 11, 5,5%) *Holtermanniella* (n = 3, 1,5 %), *Mrakiella*, *Leucosporidiella* e *Tremella* (n = 1, 0,5%). Por outro lado, 18 isolados (9%) foram classificados com afinidade ao Filo Ascomycota: *Sarcinomyces* sp.1 (n = 17, 8,5 %) e *Leotiaceae* sp. 1 (n = 1, 0,5 %). O isolado 19.L27 *Leotiaceae* sp. 1 (n = 1, 0,5 %) foi recuperado a partir do líquen L27, e não foi possível a definição de gênero, permanecendo a identificação a nível de família.

Um total de 18 táxons foi identificado, sendo o gênero *Cryptococcus* aquele com maior número de táxons identificado (n = 5): *C. antarcticus*, *C. victoriae*, *C. fildesensis*, *Cryptococcus* sp. 2 e *Cryptococcus* sp. 3 (Tabela 38). A espécie de maior abundância foi *C. victoriae* (n = 76, 38 %), com ocorrência em praticamente todas as amostras de líquens, exceto na amostra L22 coletada na ilha Rei George (Tabela 2). *Cryptococcus victoriae* também recuperado a partir de líquens não identificados coletados no ambiente Antártico em março de 2010 (OPERANTAR XXVII, Capítulo 1).

Tabela 38. Origem das leveduras isoladas a partir de diferentes amostras de líquens coletadas no ambiente Antártico em novembro / dezembro de 2013 (OPERANTAR XXXII).

Táxon		Líquens*											TOTAL
		L2	L9	L10	L11	L15	L20	L22	L25	L27	L31	L33	
Ascomycota	Subfilo												
Leotiaceae sp. 1	Pezizomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Sarcinomyces sp. 1	Pezizomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	6	11	-	17
Basidiomycota													
Cryptococcus antarcticus	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Cryptococcus victoriae	Agaricomycotina	1	1	9	20	1	16	-	10	2	12	4	76
Cryptococcus fildesensis	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	3
Cryptococcus sp. 2	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Cryptococcus sp. 3	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
Holtermanniella nyarrowii	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Holtermanniella watticus	Agaricomycotina	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Leucosporidiella fragaria	Pucciniomycotina	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Mrakia sp	Agaricomycotina	-	2	-	-	1	2	-	-	5	1	-	11
Mrakiella aquaticus	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Rhodotorula laryngis	Pucciniomycotina	1	3	3	16	-	10	2	9	3	8	-	55
Rhodotorula arctica	Pucciniomycotina	-	-	-	-	9	-	-	1	-	1	6	17
Rhodotorula glacialis	Pucciniomycotina	-	1	-	-	1	-	-	-	3	-	-	5
Rhodotorula sp. 1	Pucciniomycotina	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Rhodotorula sp. 2	Pucciniomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
Tremella indecorata	Agaricomycotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Número de aislados (n)	-	2	9	12	38	12	29	3	22	23	39	11	200
Número Taxa (n)	-	2	6	2	3	4	4	2	5	8	7	3	-

*L2: Ilha *Deception*; L9 e L10: *Livingston*; L11 e L15: Ilha *Half Moon*; L20, L22 e L25: Ilha Rei George; L27 e L31: Ilha Pinguim e L33: Ilha Nelson.

Cryptococcus victoriae foi isolada primeiramente a partir de amostras de musgos, líquens e solos do ambiente Antártico (MONTES et al., 1999). Vaz et al., 2011 avaliando diferentes amostras do ambiente Antártico observaram a prevalência de *C. victoriae*, sendo a maioria dos isolados recuperados de solo de rizosfera de *Deschampsia antarctica*, uma das duas angiospermas que ocorrem na Antártica.

Leveduras do gênero *Rhodotorula* foram recuperadas a partir de todas as amostras de *Usnea* sp. e cinco táxons foram identificados, a saber: *R. laryngis*, *R. arctica*, *R. glacialis*, *Rhodotorula* sp. 1. e *Rhodotorula* sp. 2. O segundo táxon mais abundante em amostras de líquens foi *Rhodotorula laryngis* (n = 55, 27,5%) recuperada a partir de todas as amostras, exceto de L15 e L33, Tabela 38. Três espécies de *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*, *R. laryngis* e *R. glacialis*) também foram recuperadas a

partir das amostras de líquens não identificados e pedras com líquens coletados na OPERANTAR XXVIII (março de 2010).

Em geral, leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas por produzir substâncias fotoprotetoras como carotenóides e micosporinas (LIBKIND et al., 2004; LIBKIND et al., 2009), adaptações que possivelmente auxiliam na colonização de substratos que estão submetidos a altos níveis de radiações UVA e UVB como os líquens do continente Antártico.

Assim como as leveduras de macroalgas, poucos táxons foram recuperados em mais de um local de coleta (ilha). Dos 18 táxons identificados, 12 ocorreram em apenas 1 ilha (5 na ilha Pinguim, 3 na ilha Rei George, 2 na ilha *Livinstong* e 1 em Nelson e em *Half Moon*). Apenas *Cryptococcus victorae* foi recuperada a partir das 6 ilhas estudadas (Tabela 38). Embora essa distribuição seja influenciada pelo substrato, os líquens utilizados no presente estudo foram apenas do gênero *Usnea*, sendo a influência geográfica um parâmetro importante na distribuição de táxons de leveduras do ambiente Antártico.

5.4.3. Diversidade de leveduras associadas a macroalgas e líquens da Antártica

A diversidade de leveduras associada a macroalgas e líquens foi avaliada pelos índices de Fischer- α , Margalef e Simpson. O índice de diversidade Fisher- α foi de 5,113 para comunidade de leveduras recuperadas de macroalgas e 4,79 para comunidade de leveduras recuperadas de líquens, evidenciando que a macroalgas apresentaram maior diversidade de leveduras quando comparada aos líquens. Além disto, as macroalgas apresentaram maior riqueza de espécie de leveduras (índice de Margalef) quando comparada com a comunidade de leveduras recuperadas a partir de líquens, cujo valores foram de 3,382 e 3,209, respectivamente (Tabela 39). O índice de dominância (Simpson's) foi similar para os dois substratos estudados, com valor de 0,7717 para as leveduras isoladas de macroalgas e 0,778 para as leveduras isoladas de líquens (Tabela 39).

Tabela 39. Índices de diversidade das comunidades de leveduras associadas a macroalgas e líquens do ambiente Antártico.

Substratos	Fisher – α (Diversidade) *	Margalef's (Riqueza de Espécies)	Simpson's (1/D) (Dominância)
Macroalgas (n = 205)	5,113 (3,402 - 5,113)	3,382 (2,442 – 3,382)	0,7717 (0,718 – 0,810)
Líquens (n = 200)	4,790 (2,803 – 4,439)	3,209 (2,076 – 3,02)	0,778 (0,7332 – 0,8119)

*Estes valores representam a média e entre parênteses encontram-se os valores mínimo e máximo. Os resultados foram obtidos com 95% de confiança e os valores de bootstraps calculados com 1000 repetições.

Para calcular os índices de diversidade e para construção das curvas de rarefação foram utilizados os “clusters” construídos com o software RDPipeline a partir das 405 sequências do domínio D1/D2 de todos os isolados de levedura. De acordo com as curvas de rarefação, a riqueza de espécies foi similar para ambos os substratos estudados (Figura 45). Entretanto, foram utilizados *cutoff* de 0,03 e 0,05% e algumas espécies de leveduras recuperadas de macroalgas apresentaram alta similaridade da região D1/D2 (Tabela 40), reduzindo assim a riqueza de espécie expressa na curva de rarefação.

Figura 45. Curvas de rarefação para os isolados de macroalgas e líquens do ambiente Antártico. Foram utilizadas todas as sequências do domínio D1/D2 dos 205 isolados de macroalgas e 200 isolados de leveduras. Cutoff de 0,03 e 0,05%.

Tabela 40. Similaridade entre táxons distintos isolados de macroalgas do ambiente Antártico.

Táxon		Identidade (%)	Diferença (nt)	Gaps (%)
<i>Cryptococcus victoriae</i> 42.HGRG (610nt)	<i>Cryptococcus carnescens</i> 40.HGRG (615nt)	98% (598/610)	12	0 (0%)
<i>Holtermanniella nyarrowii</i> 8.HGRG (611nt)	<i>Holtermanniella festucosa</i> 7.HGRG (610nt)	99% (602/610)	8	0 (0%)
<i>Leucosporidiella fragaria</i> 18.HGRG (567nt)	<i>Leucosporidiella muscorum</i> 2.HGRG (603nt)	98% (556/567)	11	0 (0%)
<i>Pseudozyma</i> sp.1 H.AURO (618nt)	<i>Sporisorium penniseti</i> 6.DAPP (617nt)	99% (609/616)	7	1 (0%)
<i>Ustilaginaceae</i> sp.1 2.PDDEC (617nt)	<i>Ustilaginaceae</i> sp. 2 6.AURO (620nt)	98% (606/6017)	11	2 (0%)

Dentre os 24 táxons recuperados de macroalgas e 18 táxons recuperados de líquens, apenas 5 táxons foram comuns aos dois substratos: *Cryptococcus victoriae*, *Holtermanieella nyarrowi*,

Leocosporidiella fragaria, *Mrakia* sp. e *Rhodotorula glacialis*. Representantes de 19 táxons foram recuperados apenas de amostras de macroalgas e 13 apenas de líquens (Figuras 46 e 47). As leveduras do ambiente Antártico possivelmente apresentam diferentes padrões de distribuição nos ambientes terrestres e aquáticos.

Figura 46. Diagrama de Venn para os táxons de leveduras recuperadas de macroalgas (n = 24) e líquens (n = 18) coletados no arquipélago *Shetlands* do Sul (Antártica Marítima).

Figura 47. Visualização esquemática das leveduras recuperadas de macroalgas e líquens do arquipélago *Shetlands* do Sul (Antártica Marítima).

Além disto, a similaridade entre os diferentes táxons de leveduras recuperadas de macroalgas (Figura 48) e líquens (Figura 49) foi estimada por meio da construção de dendogramas utilizando o índice de similaridade *Bray-Curtis*. Os resultados demonstram uma maior similaridade entre os isolados de recuperados de macroalgas quando comparado aos isolados recuperados de líquens (Figuras 48 e 49).

Figura 48. Dendrograma de similaridade (*Bray-Curtis*) da comunidade de leveduras isoladas de macroalgas do ambiente Antártico. Os resultados foram calculados com 95% de confiança e bootstrap com 1000 repetições. Amostras de mesma cor indica o mesmo local de coleta.

Figura 49. Dendrograma de similaridade (*Bray-Curtis*) da comunidade de leveduras isoladas de líquens do ambiente Antártico. Os resultados foram calculados com 95% de confiança e bootstrap com 1000 repetições. Amostras de mesma cor indica o mesmo local de coleta.

Uma alta similaridade foi observada para isolados de uma mesma espécie de macroalga, como os GSRO e GSHM isolados de *Gigartina skottsbergii* coletada nas ilhas Robert e *Half Moon*, respectivamente. Observa-se também uma similaridade entre macroalgas de diferentes espécies coletadas em uma mesma ilha como ICRO (*iridaea cordata*) e AURO (*Adenocystis utricularis*) coletadas na ilha Robert (Figura 47). Por outro lado, a maior similaridade na comunidade de leveduras associadas a líquens foi observada para as amostras L20 e L25 (Figura 48), ambas isoladas na ilha Rei George.

Furbino et al., (2014) observaram uma maior similaridade utilizando *Bray-Curtis* entre a comunidade fúngica isolada da macroalga *Pyropia endiviifolia* (Rhodophyta) quando comparada a comunidade fúngica de *Monostroma hariatii* (Chlorophyta).

A diferença entre a comunidade de leveduras recuperadas de macroalgas e de líquens foi avaliada em um mesmo dendograma (amostras com n acima de 20 isolados) (Figura 50). Os resultados demonstram um agrupamento das amostras de macroalgas AURO, DMRO e GSRG. Além disto, as amostras de líquens L20 e L25 apresentaram uma alta similaridade, confirmando o dendograma com apenas as amostras de líquens (Figura 49).

Figura 50. Dendrograma de similaridade (*Bray-Curtis*) da comunidade de leveduras isoladas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico (substratos com n acima de 20). Os resultados foram calculados com 95% de confiança e bootstrap com 1000 repetições. Amostras de mesma cor indica o mesmo local de origem.

A análise dos componentes principais dos dados físico-químicos da água do mar no momento da coleta e dos índices de diversidade das leveduras associadas a macroalgas revelou uma correlação

A)

B)

Figura 52. Árvores filogenéticas das sequências de DNA ribossomal 26S (região D1/D2) para leveduras isoladas de macroalgas do ambiente Antártico utilizando o método de *Neighbour-joining*, o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros e *bootstraps* com 1000 repetições. **A)** 46.HGRG - *Cryptococcus* sp. 1; **B)** 2.PDDEC – *Ustilaginaceae* sp. 1 e 6.AURO – *Ustilaginaceae* sp. 2; **C)** 9.AURO – *Pseudozyma* sp. 1.

Tabela 41. Identificação molecular de leveduras isoladas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico por meio da análise das sequências dos domínios D1/D2 e região ITS1/ITS2 do DNA ribossomal 26S.

Código	Isolados	Espécie próxima do GenBank	Número	Cobertura	Identidade	Gaps	Identificação
D1-D2 e ITS1-ITS2	(n)	(Número de acesso)	pb (nt)	(%)	(%)	(%)	
2.PDDEC - D1/D2	2	<i>Anomalomyces yakirrae</i> H.U.V. 21918 (KC184906)	618	100	99	1 (0%)	<i>Ustilaginaceae</i> sp. 1
		<i>Sporisorium andropogonis</i> 56588 (AY740095)	618	100	99	0 (0%)	
		<i>Pseudozyma pruni</i> BCRC 34227 (EU379942)	650	94	94	16 (2%)	
ITS1-TS2							
6.AURO – D1/D2	1	<i>Macalpinomyces loudetiae</i> MS250(AY740151)	620	100	98	0 (0%)	<i>Ustilaginaceae</i> sp. 2
		<i>Sporisorium trachypogonis-plumosi</i> MS281(AY740113)	620	100	98	2 (0%)	
		<i>Sporisorium andropogonis</i> MS283 (AY740095)	620	100	98	2 (0%)	
		<i>Ustilago trichophora</i> MP1898 (AY740023)	678	98	86	51 (7%)	
ITS1-TS2							
9.AURO – D1/D2	5	<i>Pseudozyma</i> sp. HB 1202 (AM160636)	619	100	100	0 (0%)	<i>Pseudozyma</i> sp.1
46.HGRG – D1/D2	1	<i>Cryptococcus</i> sp. PDD-28b-7 (HQ256890)	613	100	99	0 (0%)	<i>Cryptococcus</i> sp. 1
		<i>Cryptococcus fagi</i> CBS9964 (DQ054535)	613	100	94	11(1%)	
		<i>Cryptococcus</i> sp. DBVPG 5459 (KC455886)	470	92	88	24 (5%)	
ITS1-TS2							
9.L27 – D1/D2	17	Fungal sp. A25M023 (KC580668)	581	100	98	1 (0%)	<i>Sarcinomyces</i> sp. 1
		<i>Sarcinomyces crustaceus</i> UAMH 4286 (JN040515)	581	100	96	1 (0%)	
		<i>Sarcinomyces crustaceus</i> UAMH 4286 (NR_121503.1)	557	100	87	23 (4%)	
ITS1-TS2							
10.12.L25	1	Agaricomycotina sp. RS (AB727237)	530	100	95	6 (1%)	<i>Cryptococcus</i> sp. 2
		<i>Cryptococcus armeniacus</i> PYCC 5855 (AY562140)	530	98	93	6 (1%)	
ITS1-TS2							
9.L31 – D1-D2	4	<i>Cryptococcus laurentii</i> MB2011 (KC798409)	611	100	94	1 (0%)	<i>Cryptococcus</i> sp. 3
		<i>Fibulobasidium murrhardtense</i> CBS 9109 (NR_121466)	473	100	86	26 (5%)	
ITS1-TS2							
19.L27 – D1-D2	1	<i>Mycosymbiocytes mycenaphila</i> JLF2627 ^T (KF030236)	580	100	97	0 (0%)	<i>Leotiaceae</i> sp.1
		<i>Helotiales</i> sp. DU60 (KM113762)	526	100	99	2 (0%)	
ITS1-TS2							
D.L9 - D1/D2	2	<i>Rhodotorula</i> sp. I12F-02277 (JX852397)	605	95	99	2 (0%)	<i>Rhodotorula</i> sp. 1
		<i>Rhodotorula lignophila</i> CBS7109 (AF189943)	605	100	95	5 (0%)	
		<i>Rhodotorula</i> sp. I12F-02277 (JX852347)	614	97	90	6 (1%)	
ITS1-TS2							
10.10.L31 - D1/D2	1	<i>Rhodotorula</i> sp. CBS 10219 (EU002838)	546	97	94	3 (0%)	<i>Rhodotorula</i> sp. 2
		<i>Rhodotorula bloemfonteinensis</i> MYA-4817 (NR_111686)	565	100	89	24 (4%)	
ITS1-TS2							

A sequência da levedura *Cryptococcus* sp.1 46.HGRG isolada da macroalga endêmica do ambiente Antártico *Himantothallus grandifolius* apresentou 88% de similaridade (24 gaps e 92% de cobertura 470/447) com a sequência de *Cryptococcus* sp. DBVPG 5459 isolada de neve com sedimento em regiões montanhosas (TURCHETTI et al., 2013) (Tabela 41).

Das 200 leveduras recuperadas a partir de líquens, além de *Mrakia* sp., seis outros táxons não puderam ter as espécies definidas (mesmo após o sequenciamento das regiões D1/D2 e ITS1-ITS2) e cinco destes foram afiliadas aos seus respectivos gêneros: *Cryptococcus* sp. 2, *Cryptococcus* sp. 3, *Rhodothotula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2 e *Sarcinomyces* sp. 1. Em adição, para um táxon não houve definição de gênero, o isolado 19.L27 recuperado de *Usnea* coletado na ilha Pinguim. As sequências apresentaram maior similaridade da região D1-D2 com as espécies *Mycosymbiocytes mycenaphila* e *Flagellospora curvula* e a região ITS1-ITS2 com representante identificado apenas a nível de ordem, Helotiales sp., sendo assim foi mantida a identificação a nível de família *Leotiaceae* sp. 1 (Tabela 42, Figura 53). Espécies da ordem Helotiales têm sido reportadas como fungos endofíticos em plantas vasculares em diferentes ecossistemas, incluindo o ambiente Antártico (ZHANG et al., 2013).

Por se tratar de um ambiente em que a diversidade microbiana encontra-se em estágio inicial de descoberta, descrições de novos táxons a partir de diferentes amostras estão sendo realizadas de forma crescente. Connel et al., (2007) avaliando a diversidade de leveduras em diferentes solos Antárticos reportaram a prevalência de 89 % de espécies do Filo Basidiomycota, das quais 43 % de espécies ainda não haviam sido descritas.

A)

E)

F)

Figura 53. Árvores filogenéticas das sequências de DNA ribossomal 26S (região D1/D2) isoladas de líquens do ambiente Antártico utilizando o método de *Neighbour-joining*, o modelo de substituição Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) e *bootstraps* com 1000 repetições. **A)** *Sarcinomyces* sp. 9.L27; **B)** *Cryptococcus* sp. 2 10.12.L25; **C)** *Cryptococcus* sp. 3 9.L31; **D)** *Leotiaceae* sp.1 19.L27; **E)** *Rhodotorula* sp.1 D.L9; **F)** *Rhodotorula* sp.2 10.10.L31

O isolado *Rhodotorula* sp.1 D.L9 apresentou maior similaridade de sequência do domínio D1/D2 e região ITS1-ITS2 com *Rhodotorula* sp. I12F-02277 (Tabela 41) isolada a partir de musgos *Sanionia uncinata* coletado na ilha Rei George na Antártica (ZHANG et al., 2013). A segunda sequência mais próxima apresentou 92% de similaridade com *Rhodotorula* sp. AU_CryS05 (36 nt diferentes 437/473, 10 gaps e 76% de cobertura) isolada a partir de estruturas conhecidas como “cryoconite” ou “buracos” em gelo glacial do continente Ártico (EDWARDS et al., 2013).

He; Zhang, (2012) avaliaram a diversidade microbiana associada a *Usnea longissima* por métodos dependente e independente de cultivo. Os líquens foram coletados em um parque nacional na China cujas médias anuais de temperatura e precipitação pluviométrica foram de 5,4 °C e 580 mm. Os autores reportaram o isolamento de representantes do gênero *Cladosporium*, *Hypocrea*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Arthrinium* com abundância de 35,6, 17,2, 15,2, 12,1 e 13,2 %, respectivamente. No entanto, não há poucos estudos de diversidade de leveduras isoladas de líquens, sendo este o primeiro relato da diversidade de leveduras recuperadas a partir de líquens do gênero *Usnea* do ambiente Antártico.

O isolamento de leveduras no meio de cultura PDB diluído 10 vezes, resultou na obtenção de 9 isolados a partir de macroalgas e 51 isolados a partir de líquens. Das leveduras isoladas de líquens *C. antarcticus* 10.E, *Cryptococcus* sp. 2 10.12.L25 e *Holtermanniella nyarrowi* 10.2.L20 foram recuperadas apenas neste meio de cultivo. Este resultado sugere que os micro-organismos associados aos líquens podem estar mais adaptados às condições mínimas de nutrientes.

Geralmente, leveduras basidiomicéticas prevalecem em relação as leveduras ascomicéticas em ambiente marinho. Algumas espécies de *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e seus teleomorfos foram encontrados em várias regiões oceânicas (BURGAUD et al., 2010; KANDASAMY et al., 2012). Leveduras do gênero *Cryptococcus* são encontradas com frequência em diferentes amostras do ambiente Antártico. No presente estudos representantes desse gênero foram isoladas apenas das macroalgas pardas *Himantothallus grandifolius*, cujas espécies recuperadas foram *C. victoriae*, *C. carnescens* e *Cryptococcus* sp. 1. Por outro lado, quatro espécies de *Cryptococcus*, *C. antarcticus*, *C. fildesensis*, *Cryptococcus* sp. 2, e *Cryptococcus* sp. 3 foram recuperadas apenas nas amostras de líquens. *C. antarcticus* foi isolada inicialmente a partir de solo de regiões conhecidas como deserto frio, os Vales McMurdo da Antártica (VISHNIACH; ONOFRI, 2003), tendo sido também reportada em amostras de solo de rizosfera da Antártica (VAZ et al., 2011). Por outro lado, *C. fildesensis* foi recentemente recuperado a partir do musgo *Chorisodontium aciphyllum* coletado na ilha Rei George, Antártica marítima (ZHANG et al., 2014). Nas regiões mais úmidas do ambiente Antártico predominam os musgos, enquanto os líquens ocorrem em locais mais secos e rochosos (ZHANG et al., 2014).

Representantes do gênero *Rhodotorula* foram recuperados a partir de três amostras de macroalgas: *R. glacialis* partir de (*Gigartina skottsbergii* e *Himantothallus grandifolius*) e *R. marina* (*Palmaria decipiens*). Em adição, as espécies *R. arctica*, *R. laryngis* e *Rhodotorula* sp. 1 foram recuperadas apenas das amostras de líquens.

Neste trabalho, dois táxons do gênero *Pseudozyma* foram isolados a partir da macroalga *Adenocystis utricularis* (*Pseudozyma* sp.1 e *P. tsukubaensis*). O gênero *Pseudozyma* (Classe Ustilaginomycetes, ordem Ustilaginales) tem sido frequentemente isolado a partir de vegetais (BUXDORF et al., 2013; GOLUBEV et al., 2007). Além disto, há relato do isolamento deste gênero de leveduras a partir de sedimento marinho (NAGAHAMA et al., 2001) e água do mar em região de corais (STADZELL-TALLMAN et al., 2010).

A levedura mais abundante nas amostras de macroalgas foi identificada como *Metschnikowia australis*. O gênero *Metschnikowia* tem sido associado ao ambiente marinho, sendo os representantes deste gênero isolados de diferentes substratos, tais como água do mar, invertebrados marinhos, peixes, algas (KUTTY; PHILIP, 2008). No presente estudo, além do isolamento de *M. australis* em diferentes espécies de macroalgas, representantes deste gênero também foi obtida a partir de amostras de sedimento marinho e de *Salpa* sp. (Capítulo 1, Tabela 9).

Leveduras marinhas são versáteis em processos de biodegradação, especialmente em ambientes estuarinos e costeiros. Atividades como decomposição de substratos vegetais, ciclagem de nutrientes, biodegradação de resíduos de óleos e compompostos recalcitrantes, além do parasitismo de macro-organismos marinhos (BURGAUD et al., 2010).

Representantes do gênero *Mrakia* têm sido encontrados em diferentes ambientes frios, tais como líquens da região da Groelândia (DEPRIEST et al., 2000), água da região da patagônia argentina (GARCIA et al., 2007), sedimento, gelo e água de região dos Alpes italianos (THOMAS-HALL et al., 2010). Neste estudo, representantes do gênero *Mrakia* foram recuperadas tanto de macroalgas *Cystosphaera jacquinotti*, *Desmarestia menziesii*, *Gigartina skottsbergii*, *Himantothallus grandifolius* e *Iridaea cordata* quanto de líquens (recuperada em 5 das 11 amostras de líquens avaliadas).

Devido a flutuações de temperatura no ambiente antártico, além da introdução de micro-organismos exógenos ao ambiente, poucas espécies são descritas como psicrófilas (RUISI et al., 2007). Entretanto, no presente estudo foram isoladas espécies consideradas psicrófilas: *C. antarcticus*, *C. victoriae*, *C. fildesensis*, *Glaciozyma martinii*, *Glaciozyma litorale*, *M. australis*, *R. arctica* e *R. glacialis*.

Dentre os gêneros encontrados nas amostras de macroalgas e líquens da Antártica coletadas nas ilhas do arquipélago *Shetlands* do Sul (Dezembro de 2013, OPERANTAR XXXII), representantes dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula* e *Tremella* foram também isolados a partir das amostras coletadas próximo à Estação Comandante Ferraz na Ilha Rei George

(OPERANTAR XXVIII, março de 2010). Por outro lado, representantes dos gêneros *Dioszegia*, *Glaciozyma*, *Holtermanniella*, *Leucosporidiella*, *Mrakia*, *Mrakiella*, *Pseudozyma*, *Sarcinomyces*, *Sporidiobolus*, *Sporisorium* e *Tilletiopsis* foram recuperados apenas nas amostras de macroalgas e líquens coletadas na OPERANTAR XXXII (Dezembro de 2013). E representantes dos gêneros *Bullera*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Guehomyces*, *Leucosporidium*, *Meyerozyma* e *Wickerhamomyces* foram recuperados apenas das amostras coletadas na OPERANTAR XXVIII (Março de 2010).

O número de isolados de leveduras recuperados a partir de amostras marinhas e terrestres do Ambiente Antártico totaliza 502 (21 espécies - OPERANTAR XXVIII; 24 táxons recuperados de macroalgas e 18 táxons recuperados de líquens - OPERANTAR XXXII), evidenciando o potencial deste ambiente para o estudo de diversidade de leveduras. Além disto, 9 táxons (3 de leveduras recuperadas de macroalgas e 6 recuperadas a partir de líquens) apresentaram baixa similaridade com sequências de leveduras descritas, podendo assim representar putativas novas espécies de leveduras.

6 CONCLUSÃO

- ✓ As leveduras recuperadas de amostras do ambiente Antártico marinho e terrestre apresentaram capacidade para produção de lipase a temperaturas baixas e moderadas;
- ✓ A otimização da produção de lipase pelo delineamento experimental foi satisfatória com um aumento de 6 vezes na produção da lipase por *C. laurentii* L59 (de 0,143 para 0,887 U.mL⁻¹) e de 9 vezes na produção por lipase por *L. scottii* L117 (de 0,230 para 2,07 U.mL⁻¹) quando comparado ao meio de cultura basal.
- ✓ Dentre os métodos aplicados para a purificação parcial de lipase de *L. scottii* L117, o sistema micelar utilizando TX-114 (SDFA) apresentou maior eficiência e pode ser considerado uma alternativa para a extração da lipase produzida por *L. scottii* L117.
- ✓ A otimização das condições de extração de lipase de *L. scottii* L117 por sistema micelar foi eficiente, com aumento de 10,1 vezes na partição da lipase para fase bottom do sistema (fase rica em micelas) com K inicial de 0,75 e após a otimização de 7,6;
- ✓ A comunidade de leveduras recuperada de macroalgas (n = 205) apresentou maior diversidade (Fisher- α) e riqueza de espécies (Margalef's) quando comparada com a comunidade de leveduras isoladas de líquens *Usnea* sp. (n = 200).
- ✓ O ambiente Antártico representa uma fonte de recursos microbianos potencialmente desconhecida, uma vez que 33% (n = 6) dos táxons de leveduras recuperados de líquens e 16,6 % (n = 4) dos táxons de leveduras recuperados de macroalgas são possíveis putativas novas espécies.
- ✓ A riqueza de espécies de leveduras obtidas no presente estudo sugere que o ambiente Antártico é propício para o desenvolvimento deste grupo de micro-organismo, representando uma fonte potencial de recursos genéticos a ser conhecido e explorado.

PERSPECTIVAS PARA PRÓXIMOS ESTUDOS

- ✓ Considerando que o ambiente Antártico é uma rica fonte de recursos genéticos com propriedades específicas (extremófilos), a coleção de leveduras obtidas no presente estudo (n = 502) poderá ser utilizada em estudos futuros que visem o entendimento de mecanismos de adaptação a baixas temperaturas; produção de compostos naturais para aplicação biotecnológica;
- ✓ Descrição das possíveis novas espécies de leveduras recuperadas de macroalgas e líquens do ambiente Antártico;
- ✓ *Leucosporidium scottii* L.117 poderá ser utilizada para estudos de escalonamento da produção de lipase em biorreator visando aumentar a atividade enzimática;

REFERÊNCIAS*

- ALMEIDA, J. M. G. C. F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 295–303, 2005.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potencial Application. **BioMed Research International**, p.435818. doi:10.1155/2013/435818, 2013.
- ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e Caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, 2002.
- ARIFIN, A. R.; KIM, S. J.; YIM, J. H.; SUWANTO, A.; KIM, H. K. Isolation and Biochemical Characterization of *Bacillus pumilus* lipases from the Antarctic. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 661–667, 2013.
- BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 2008. Tese. 138 f. (Doutorado em Química) Universidade Federal do Paraná, 2008.
- BARBIER, B. A. **Investigating the Biodiversity of Microbial Communities in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica: An Inter-Valley Comparison Study**. 2009. 92 p. [tese] Master of Science in Biological Science - Institution the University of Waikato, 2009.
- BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; FRICKS, A.T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3853-3858, 2011.
- BARDOU, P.; MARIETTE, J.; ESCUDIÉ, F.; DJEMIEL, C.; KLOOP, C. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, v. 15, p. 1-7, 2014.
- BATAICHE, I.; KACEM-CHAOUCHE, N.; DESTAIN, J.; LEJEUNE, A.; THONART, P. Sceening of *Candida boidinii* Chmial spent olive characterized by higher alkaline-cold adapted lipase production. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 1287-1294, 2014.
- BEH, L. A.; FLEET, G. H.; PRAKICHAIWATTANA, C; HEARD, G. M. **Evaluation of molecular methods for analysis of yeasts in foods and beverages**. In: Advances in Food Mycology, v. 571, pp. 69-106, 2006.
- BESEL, E. **Use of Triton-X114 aqueous two phase system for recobery oof mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase**. Dissertation, 2003, 86 p. The Middle East Technical University, Turkey. 2003.
- BIGEY, F.; TUEY, K.; BOUGARD, D.; NICAUD, J.; MOULIN, G. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. **Yeast**, v. 20, p. 233–248, 2003.

*De acordo com: Associação Brasileira de Normas e Técnicas. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426–438, 2011.

BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SAMPAIO, J. P.; BANDONI, R. J.; FELL, J. W.; KWON-CHUNG, K. J. (2011). Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds) **The Yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 1339–1372

BONUGLI-SANTOS, R. C., DURRANT, L. R., SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 46, p. 17-37, 2010a.

BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SETTE L.R. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biololy**, v. 114, p. 863–872, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SETTE, L.D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water Air Soil Pollution**, v. 223, p. 2333–2345, 2012.

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

BRADNER, J. R. **Antarctic Microfungi as a Potential Bioresource**. 2003. 180p. [tese] Macquarie University Sydney and Macquarie University Biotechnology Research Institute Sydney, New South Wales, Australia, 2003.

BURGAUD, G.; ARZUR, D.; DURAND, L.; BONAVIDA, M. A. C.; BARBIER, G. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 73, p. 121-33, 2010.

BURGAUD, G.; ARZUR, D.; DURAND, L.; CAMBON-BONAVIDA, M.; BARBIER, G. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 121–133, 2010.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 229-234, 2005.

BUXDORF, K.; RAHAT, I.; GAFNI, A.; LEVY, M. The Epiphytic Fungus *Pseudozyma aphidis* Induces Jasmonic Acid- and Salicylic Acid/Nonexpressor of PR1-Independent Local and Systemic Resistance. **Plant Physiol**, v. 161, p. 2014-2022, 2013

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. **Biology** (7th edition). San Francisco: Pearson Education Inc., 2005, p. 621-622.

CARDOSO, S. M.; CARVALHO, L. G.; SILVA, P. J.; RODRIGUES, M. S.; PEREIRA, O. R.; PEREIRA, L. bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian Peninsula. **Current Organic Chemistry**, v. 18: p. 896-917, 2014.

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

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

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. **Basidiomycetous yeasts: current status**. In: **Yeast biotechnology: diversity and application**, pp 19-46. SATYNANAYANA, T.; KUNZE, G. New York, Springer, 2009

CLARK, M. S.; CLARKE, A.; COCKELL, C. S.; CONVEY, P.; DETRICH, H. W.; FRASER, K. P. P.; JOHNSTON, I. A.; METHE, B. A.; MURRAYS, A. E.; PECK, L. S.; ROMISCH, K.; ROGERS, A. D. Antarctic genomics. **Comparative and Functional Genomics**, v. 5, p. 230–238, 2004.

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

DA SILVA, M.; PASSARINI, M. R. Z.; BONUGLI, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental Technology**, v. 29, p. 1331-1339, 2008.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M. CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbil Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

DARTNELL, L. R.; FALLAIZE, D. R.; WHITING, S. J.; WARD, J. M. Desiccation resistance of Antarctic Dry Valley bacteria isolated from contrasting locations. **Antarctic Science**, v. 22, p. 171-172, 2010.

D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **European Molecular Biology Organization**, v. 7, p. 385-389, 2006.

D'ELIA, T. **Isolation of bacteria and fungi from lake vostok accretion ice**. 114p. 2008. [tese] (Doctor of Philosophy) Graduate College of Bowling Green State University, 2008.

DEPRIEST, P. T.; IVANONA, N. V.; FAHSELT, H.; ALSTRUP, V.; GARGAS, A. Sequences of psychrophilic fungi amplified from glacier-preserved ascolichens. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p. 1450–1459, 2000.

DOMASCHKE, S.; VIVAS, M.; SANCHO, L. G.; PRINTZEN, C. (2013). Ecophysiology and genetic structure of polar versus temperate populations of the lichen *Cetraria aculeata*. **Oecologia**, v. 173, p. 699–709, 2013.

DUNCAN, S. M.; FARRELL, R. L.; THWAITES, J. M.; HELD, B. W.; ARENZ, B. E.; JURGENS, J. A.; BLANCHETTE, R. A. Endoglucanase-producing fungi isolated from Cape Evans historic expedition hut on Ross Island, Antarctica. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1212–1219, 2006.

EDWARDS, A.; DOUGLAS, B.; ANESIO, A. M.; RASSNER, S. M.; IRVINE-FYNN, T. D. L.; SATTLER, B.; GRIFFITH, G. W. A distinctive fungal community inhabiting cryoconite holes on glaciers in Svabard. **Fungal Ecology**, v. 6, p. 168-176, 2013.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast's as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351-1371, 2000.

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

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

FERRAREZI, A. L. **Produção de lipases por fungos termofílicos imobilizados e a sua utilização para produção de Biodiesel por transesterificação**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.

FISHER, R.A.; CORBET, A.S.; WILLIAMS, C. B. The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population. **Journal of Animal Ecology**, v. 12, p. 42-58, 1943.

FLEWELLING, A. J.; ELLSWORTH, K. T.; SANFORD, J.; FORWARD, E.; JOHNSON, J. A.; GRAY, C. Macroalgae Endophytes from Atlantic Coast of Canada: A Potential Source of Antibiotic Natural Product? **Microorganisms**, v. 1, p. 175-187, 2013.

FRATE, G. D.; CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material, **Polar Biology**, v. 11, p. 1-7, 1990.

FRISVAD, J. C. Fungi in Cold Ecosystems. In: Margesin, R.; Schinner, F.; Marx, J.C.; Gerday, C. (ED). **Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology**. Springer, p. 137-156, 2008.

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

GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human serum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1082-1087, 2010.

GARCÍA, V.; BRIZZIO, S.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; van BROOCK, M. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 59, p. 331-341, 2007.

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

GERDAY, C.; AITTALEB, M.; BENTAHIR, M.; CHESSA, J.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; DUMONT, J.; GARSOUX, G.; GEORLETTE, D.; HOYOUX, A.; LONHIENNE, T.; MEUWIS, M.; FELLER, G. Cold-adapted Enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Tibtech**, v. 18, p. 103-107, 2000.

GILBERT, J. A.; HILL, P. J.; DOOD, C. E. R.; LAYBOURN-PARRY, J. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. **Microbiology**, v. 150, p. 171-180, 2004.

GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N. S.; PUPO, D.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME Journal**, v. 7, p. 1434–1451, 2013.

GOMES, J.; STEINER, W. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. **Food Technology Biotechnology**, v. 42, p. 223–235, 2004.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P. A.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. **BioMed Research International**, Article ID 154549. doi.org/10.1155/2013/154549, 2013.

GRUBE, M.; CERNAVA, T.; SOH, J.; FUCHS, S.; ASCHENBRENNER, I.; LASKKEK, C.; WEGNER, U.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; SENSEN, C. W.; BERG, G. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. **ISME Journal**, v. 9, p. 412- 424, 2015.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HAGA, R. B.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; SILVA, M. S. C.; PESSOA, A.; RANGEL-YAGUI, C. O. Clavulcanic acid partitioning in charged aqueous two-phase micellar systems. **Separation and Purification Technology**, v. 103, p. 273-278, 2013

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1–9, 2001.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.

HATHA, A. A. M.; RAHIMAN, M. K. M.; KRISHNAN, K. P.; SARAMMA, A. V.; SARITHA, G.; DEEPU, L. Characterisation and bioprospecting of cold adapted yeast from water samples of Kongsfjord, Norwegian Arctic. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 42, p. 458-465, 2013.

HE, Y.; ZHANG, Z. Diversity of organism in the *Usnea longissima* lichen. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 4797-4804, 2012.

HEATH, C.; HU, X. P.; CARY, S. C., COWAN, D. Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from Antarctic desert soil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4657–4659, 2009;

HOVENDEN, M. J.; SEPPELT, R. D. Field photosynthetic activity of lichens in continental Antarctic. **Symbiosis**, v. 18, p. 111 – 118, 1995.

HARVEY, J. B. J.; GOFF, L. I. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology**, v. 114, p. 82-95, 2010.

JAEGER K. E.; EGGERT T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002.

JIANG, B.; FENG, Z.; LIU, C.; XU, Y.; LI, D.; JI, G. Extraction and purification of wheat-esterase using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal of Food Science and Technology**, in press, 2014

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G.; SHRIVASTAVA, N. Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 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.

JURGENS, J. A. **Fungal Biodiversity in Extreme Environments and Wood Degradation Potential**. 2010, 240p. [tese] (Doctor in Biological Sciences) - Institution the University of Waikato, 2010.

KAVANAGH, K. Fungi: Biology and Applications. **Ed. John Wiley & Sons Ltd**, 267p. ISBN 0-470-86702-7, 2005.

KAMPAA, A.; GAGUNASHVILIB, A. N.; GULDERA, T. A. M.; MORINAKAA, B. I; DAOLIC, C.; GODEJOHANNC, M.; MIAOD, V. P. W.; PIELA, J.; ANDRÉSSONB, O. S. Metagenomic natural product discovery in lichen provides evidence for a family of biosynthetic pathways in diverse symbioses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 3129-3127, 2013.

KAPPEN, L. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. **Antarctic Science**, v. 12, p. 314-324, 2000.

KESTER, D.R.; DUEDALL, I.W.; CONNORS, D. N.; PYTKOWICZ, R.M. Preparation of artificial seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 12, p. 176-179, 1967.

KANDASAMY, K.; ALIKUNHI, N. M.; SUBRAMANIAN, M. Yeasts in marine and estuarine environments. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 3, p. 74 – 82, 2012.

KHAYATI, G.; ALIZADEH, A. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Fluid Phase Equilibria**, v. 353, p. 132-134, 2013.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Jorunal Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KIRK, P.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. Ainsworth & Bisby's **Dictionary of the Fungi**. 10 th edn. CAB International, Wallingford, UK, 2008.

KLINGLER, J. M.; VISHNIAC, H. S. A Contribution of Antarctic Ecology to Yeast Systematics. **Polar for schung**, v. 58, p. 83-92, 1988.

KRISHNAN, A.; CONVEY, P.; GONZALEZ-ROCHA, G.; ALIAS, S. A. Production of extracellular hydrolase enzymes by fungi from King George Island. **Polar Biology**, in press. Doi 10.1007/s00300-014-1606-7. 2014.

KOLANJINATHAN, K; GANESH, P; SARANRAJ, P. Pharmacological Importance of Seaweeds: A Review. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 1, p. 1-15, 2014.

KURTZMAN, C.P. Yeast systematics: from phenotype to genotype. **Food technology and Biotechnology**, v. 36, p. 261-266, 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts**. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds). 5. Ed. San Diego: Elsevier, 2001, p. 88-110.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **Yeast systematics and phylogeny: Implications of molecular identification methods for studies in ecology**. In C. A. Rosa and G. Peter, eds., The Yeast Handbook. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg. 2006.

KUTTY, S.N.; PHILLIP, R. Marine yeasts-a review. **Yeast**, v. 25, p. 465–483, 2008.

KWON, M. A; KIM, H. S; HAHM, D. H.; SONG, J. K. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 741-746, 2011.

LAICH, F.; VACA, I.; CHAVEZ, R. *Rhodotorula portillonensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from Antarctic shallow-water marine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3884-3891, 2013.

LEE, G.; TANG, S.; SUN, K.; SHAW, J. Analysis of the Gene Family Encoding Lipases in *Candida rugosa* by Competitive Reverse Transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3888–3895, 1999.

LI, X.; ZHANG, W.; WANG Y.; DAI, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; WANG, H. A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 16-24, 2014.

LIBKIND, D.; PÉREZ, P.; SOMMARUGA, R.; DIÉGUEZ, M. C; FERRARO, M.; BRIZZIO, S.; ZAGARESE, H.; BROOCK, M. Constitutive and UV-inductive synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. **Photochemical Photobiological Science**, v. 3, p. 281-286, 2004.

LIBKIND, D.; MOLINÉ, M.; SAMPAIO, J. P.; van BROOCK, M. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 352-362, 2009.

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

LIMA, G. M. V. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. Curitiba, 2004. 148 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, 2004.

MACELROY, R. R. Some comments on the Evolution of Extremophiles. **Biosystems**, v. 6, p. 74-75, 1974.

MAGRINI, M.J. **Produção de enzimas ligninolíticas e degradação de HPAs por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas.** 2012, 100 f. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade de Campinas, 2012.

MARÍA, P. D. DE.; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; MEER, A. ; GEMERT, R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, p. 36–46, 2005.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate. **Chemosphere**, v. 38, p. 3463-3472, 1999.

MARGESIN, R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, p. 3-10, 2000.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 346-361, 2011.

MARGESIN, R.; FELL, J. *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, anamorphic, basidiomycetous yeast from alpine and arctic habitats. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, v. 58, p. 2977–2982, 2008.

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

MAAYER, P.; ANDERSON, D.; CARY, C.; COWAN, D. A. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. **EMBO reports**, v. 15, p. 508-517, 2014.

MEDEIROS, A. S. **Diversidade de macroalgas da Baía do Almirantado, ilha Rei George, Península Antártica baseada em “DNA barcoding” e outros marcadores moleculares** 2013, 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2013.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G.; FREEDMAN, E.Z.; VILGALUS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2274-2280, 1993.

MINUTH, T. **Extraction of amphiphilic proteins using detergent-based aqueous two-phase systems.** In Hatti-Kaul R (ed) *Methods In Biotechnology*, 11 rd ed, Lund, Sweden, pp. 291-302, 2008.

MONTESINOS, J. L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLA, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 59, p. 25–37, 1996.

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

MONTES, M. J.; BELLOCH, C.; GALIANA, M.; GARCIA, M. D.; ANDRES, C.; FERRER, S.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M. GUINEA, J. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from Antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov. **Systematic Applied Microbiology**, v. 22, p. 97–105, 1999.

MORITA, t.; KOIKE, H.; HAGIWARA, H.; ITO, E.; MACHIDA, M.; SATO, S.; HABE, H.; KITAMOTO, D. Genome and Transcriptome Analysis of the Basidiomycetous Yeas *Pseudozyma antarctica* Producing Extracellular Gltcolipids, Mnnosylerythritol Lipids. **Plos One**, v. 9, p. 1-12.

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

NAGAHAMA, T.; HAMAMOTO, M.; NAKASE, T.; TAKMI, H.; HORIKOSKI, K. Distribution and identification of red yeasts in deepsea environments around the northwest Pacific Ocean. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 101–110, 2001.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid–Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 295–303, 2011.

NIKAS, Y. J.; LIU, C. L.; SRIVASTAVA, T.; ABBOTT, N. L.; BLANKSCHTEIN, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. **Macromolecules**, v. 25, p. 6794-4806, 1992.

NILSSON, R. H., KRISTANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., AND LARSSON, K.-H. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 4, p. 193-201, 2008.

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

OHAMA, T.; SUZUKI, T.; MORI, M.; OSAWA, S.; VEDA, T.; WATANABE, K.; NAKASE, T. Nonuniversal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 4039-4045, 1993.

OKSANEN, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 723-734, 2006.

OLIVEIRA, E. C.; ABSHER, T. M.; PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, M. C. The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island, Antarctic. **Polar Biology**, v. 32, p. 1630–1647, 2009.

ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; HOOG, G. S.; GRUBE, M.; BARRECA, D.; RUISI, S.; ZUCCONI, L. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v. 40, p. 1657–1664, 2007.

OOI, C. W.; TAN, C. P.; HII, S. L.; ARIFF, A.; IBRAHUM, S.; LING, T. C. Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia* sp. ST8 with aqueous micellar two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1846-1852, 2011.

ØVERSUSTEDAL, D. O.; SMITH, L. R. I. Four additional lichens from the Antarctic and South Georgia, including a new *Leciophysma* species. **Folia Cryptogamica Estonica**, v. 48: 65-68, 2011.

ØVERSUSTEDAL, D. O.; SMITH, L. R. I. Further additions to the lichen flora of Antarctica and South Georgia. **Nova Hedwigia**, v. 88 p. 157-168, 2004.

PADILHA, G. S.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Partição da lipase de *Burkholderia cepacia* em sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato, **Exacta**, v. 8, p. 193-199, 2010.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 517-526, 2008.

PARK, C. H.; KIM, J. M.; ELVENAKK, A.; KIM, O.; JEONG, G.; HONG, S. G. Algal and Fungal Diversity in Antarctic Lichens. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 0, p. 1–10, 2014.

PASSARINI, M. R. Z. **Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos**. 2008, 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, 2008.

PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N.; DA SILVA, M.; SETTE, L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 364-370, 2011.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005, 440 p.

PFEFFER, J. C. **The Lipases from *Candida antarctica*: Cloning, Expression and their Application in the Synthesis of Structured Lipids**. 2008, 121p, [Tese] Institute of Technical Biochemistry at the University of Stuttgart. 2008.

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

POOJARI, Y.; CLARSON, S. J. Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 7-11, 2012.

QIAN, Z.; HORTON, J. R.; CHENG, X.; LUTZ, S. Structural Redesign of Lipase B from *Candida antarctica* by Circular Permutation and Incremental Truncation. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, p. 191–201, 2009.

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

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

RAY, M. K.; SHIVAJI, S.; SHYAMAIA-RAO, N.; BHARGAVA, P. M. Yeast strains from the Schirmacher Oasis Antarctica. **Polar Biology**, v. 9, p. 305-309, 1989.

RICHARDS, T. A.; JONES, M. D. M.; LEONARD, G.; BASS, D. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. **Annual Review Marine Science**. v. 4, p. 495-522, 2012.

RIVKINA, E. M.; FRIEDMANN, E. I.; MCKAY, C. P.; GILICHINKY, D. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3230-3233, 2000.

ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151, p. 341–353, 2001.

RODRIGUEZ, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª Ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, 326p, 2005.

ROGERS, A. D.; MURPHY, E. J.; JOHNSTON, N. M.; CLARKE, M. Introduction. Antarctic ecology: from genes to ecosystems. Part 2. Evolution, diversity and functional ecology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological.**, v. 362, p. 2187–2189, 2007.

ROMANOVSKAIA, V. A.; TASHIREV, A. B.; SHILIN, S. O.; CHEMAIA, N. A. Resistance to UV radiation of microorganisms isolated from the biotopes of Antarctic region. **Mikrobiol Z**, v. 72: p. 8-13, 2010.

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

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Review Environmental Science Biotechnology.**, v. 6, p. 127–141, 2007.

RUSSO, G.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J. P.; van BROECK, M. R. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Cavihue volcanic environment (Patagonia, Argentina). **FEMS Microbiol Ecology**, v. 65, p. 415–424, 2008.

RUSSELL, N.J.; COWAN, D. A. **Handling of psychrophilic microorganisms** In: Rainey FA, Oren A (eds) *Methods in microbiology, Extremophiles*, 35. Academic Press, London, p. 371–393, 2006.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, Á.; FELL, J. W. (2001). Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v. 51, p. 687–697, 2001.

SAMPAIO, J. P. *Rhodotorula* Harrison (1928) In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W.; , BOEKHOUT, T, Ed. *The yeasts, a taxonomic study*. 5th ed. v 3, Burlington, Elsevier, pp. 1873–1927, 2011.

SANCHO, L.; GREEN, A.; PINTADO, A. Slowest to fastest: Extreme range in lichen growth rates support their use as an indicator of climate change in Antarctica. **Flora**, v. 202, p. 667-673, 2007.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W.; ROSHINI, K. T.; SHANTALA, Y. M. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 564-568, 2007.

SELBMANN, L.; HOOG, G. S.; MAZZAGLIA, A.; FRIEDMANN, E. I.; ONOFRI, S. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from the Antarctic desert. In: de Hogg, G.S. (Ed) *Fungi of the Antarctic: Evolution Under Extreme Conditions*. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 1–32, 2005.

SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; RUISI, S.; GRUBE, M.; CARDINALE, M.; ONOFRI, S. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. **Polar Biology**, v. 33, p. 71–83, 2010.

SPIEGEL **Théorie et Applications de la Statistique**, Paris: McGraw-Hill, 1982.

STADZELL-TALLMAN, A.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W. Three species of yeasts: *Candida spencermartinsiae*, *Candida taylori* and *Pseudozyma abaconensis* spp. nov. from mangrove and coral reef ecosystems. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v. 60, p. 1978-1984, 2010.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G.S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. In: **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Satyanarayana, T.; Kunze, Gotthard (Eds.). Springer Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp 3-18, 2009.

SINGH, P.; SINGH, S. M.; TSUJI, M.; PRASAD, G. S.; HOSHINO, T. *Rhodotorula svalbardensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from cryoconite holes of Ny-Ålesund, Arctic. **Cryobiology**, v. 68, p. 122-128, 2014.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, p. 486-520, 2011.

SHIVAJI, S.; BHADRA, B.; RAO, R. S.; PRADHAN, S. *Rhodotorula himalayensis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from Roopkund Lake of the Himalayan mountain ranges, India, **Extremophiles**, v. 12, p. 375–381, 2008.

SHOW, P. L.; TAN, C. P. ; ANNUAL, M. S.; ARIFF, A.; YOSOF, Y. A.; CHEN, S. K.; LING, T. C. Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia cenocepacia* strain ST8 and recycling of phase components in an aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 74-80, 2012.

SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-Adapted Enzymes. **Annual Review Biochemistry** v. 75, p. 403-433, 2006.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23-40, 2011.

SOARES, B. M. **Diversidade de fungos decompositores de madeira presentes em ecossistemas brasileiros: bioprospecção de espécies úteis em processo de biodegradação de poluentes aromáticos**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de Minas Gerais, 2013.

SOUZA, R. L.; BARBOSA, J. M.; ZANIN, G. M.; LOBAOM, M. W.; SOARES, C. M.; LIMA, A. S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 161, p. 288-300, 2010.

SURYANARAYANAN, T. S.; JOHNSON, J. A. Fungal Endosymbionts of Macroalgae: Need for Enquiries into Diversity and Technological Potential. **Oceanography**, v. 2, p. 119-121, 2014.

SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATACHALAM, A.; THIRUNAVUKKARASU, N.; RAVISHANKAR, J. P.; DOBLE, M.; GEETHA, V. Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. *Botanica Marina*, v. 53, p. 457–468, 2010.

TAMURA, K., DUDLEY J., NEI M.; KUMAR S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TERSTAPPEN, G. C.; RAMELMEIER, R. A.; KULA, M. R. Protein partitioning in detergent-based aqueous two-phase systems. **Journal Biotechnology**, v. 28, p. 263–275, 1993.

THOMAS-HALL, S.R.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; BRANDA, E.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; WATSON, K. Cold adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps. Description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. **Extremophiles**, v. 14, p. 47–59, 2010.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D.G., GIBSON T. J., CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids. Research.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; DIOLAIUTI, G.; D'AGATA, C.; SMIRAGLIA, C.; VAUGHAN-MARTINI, A. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 63, p. 73–83, 2008.

TURCHETTI, B.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; DIOLAIUTI, G.; D'AGATA, C.; SMIRAGLIA, C.; ONOFRI, A.; BUZZINI, P. Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. **FEMS Microbiol Ecology**, v.86, p. 327-340, 2013.

TURCHETTI, B.; SELBMANN, L.; BLANCHETTE, R. A.; DI MAURO, S.; MARCHEGANI, E.; ZUCCONI, L.; ARENZ, B. E.; BUZZINI, P. *Cryptococcus vaughanmartinae* sp. nov. and *Cryptococcus onofrii* sp. nov.: two new species isolated from worldwide cold environments. **Extremophiles**, in press. 2014.

TURKIEWICZ, M.; PAZGIER, M.; DONACHIE, S. P.; KALINOWSKA, H. Invertase and glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Polar Research**. v. 26, p. 125-136, 2005.

UETAKE, J.; YOSHITAKA, Y.; NAOKO, N.; HIROSHI, K. Isolation of oligotrophic yeasts from supraglacial environments of different altitude on the Gulkana Glacier (Alaska). **FEMS Microbial Ecology**, v. 82, p. 279-286, 2012.

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

VAZ, A. B. M.; ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L.; de GARCIA, V.; BRANDAO, L. R.; TEIXEIRA, L. C. R.S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; VAN, B. M. G.; ROSA, C.A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 937-947, 2011.

VENTURA, S. P. M.; SOUZA, G. S.; FREIRE, M. G.; SERAFIM, L. S.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2679-2687, 2011.

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

VISHNIAC, H. S. Yeast biodiversity in the Antarctic. In **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Ed. PETER, G.; ROSA, C. A. Berlin: Springer, 2006, p. 428–440.

VISHNIAC, H. S.; ONOFRI, S. *Cryptococcus antarcticus* var. circumpolaris var. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, p. 231–233, 2003.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, v. 15: p. 147-52, 2002.

YAVUZ, M. Lichens Mentioned by Pedanios Dioscorides. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. p. 103-109, 2012.

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

WIENCKE, C. Recent advances in the investigation of Antarctic macroalgae. **Polar Biology**, v. 16, 231-240, 1996.

WIENCKE, C.; AMSLER, C. D. Seaweeds and Their Communities in Polar Regions. C. Wiencke and K. Bischof (eds.), *Seaweed Biology*, **Ecological Studies**, p. 265-291, 2012.

WIENCKE, C.; CLAYTON, M. M. **Antarctic Seaweeds**, n: J.W. Wägele & J. Sieg (eds.) *Synopses of the Antarctic Benthos*, v. 9, 239p., 2002.

WIENCKE, C.; CLAYTON, M. M.; GOMEZ, I.; IKEN, K.; LUDER, U.H.; AMSLER, C.D.; KARSTEN, U.; HANELT, D.; BISCHOFF, K.; DUNTON, K. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, p. 95-126, 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, New York, pp. 315-322, 1990.

WULFF, A.; IKEN, K.; QUARTINO, M. L.; AL-HANDAL, A.; WIENCKE, C.; CLAYTON, M. N. **Biodiversity, biogeography and zonation of marine benthic micro- and macroalgae in the Arctic and Antarctic**. In: Wiencke C (ed) *Biology of polar benthic algae*. De Gruyter, Berlin, pp 23–52, 2011.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty Acid Composition of Vegetable Oils and Fats. **B.CEPPA**, v. 25, p. 111-120, 2007.

ZALAR, P.; GUNDE-CIMERMAN, N. **Cold-Adapted Yeasts in Arctic Habitats**. P. Buzzini and R. Margesin (eds.), *Cold-Adapted Yeasts*, 2014.

ZHANG, T.; ZHANG, Y.; LIU, H.; WEI, Y.; LI, Y.; SU, J.; ZHAO, L. X.; YU, L. Y. Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, p. 52–61, 2013.

ZHANG, T.; ZHANG, Y.; LIU, H.; SU, J.; ZHAO, L. X.; YU, L. Y. *Cryptococcus fildesensis* sp. nov., a psychrophilic basidiomycetous yeast isolated from Antarctic moss. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 675–679, 2014.

ZHONG, H.; FANG, Z.; ZOU, B. H.; LI, X.; GUO, K. Studies on the Immobilized-Lipase-Catalyzed Esterification of Alkyl Oleates in Solvent-Free Systems. **Advanced Materials Research**, v. 645, p. 19–23, 2013.

ZHOU, Y. L.; HU, C. L.; WANG, N.; ZHANG, W. W.; Yu, X. Q. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 77–82, 2013.

ZLATANOV, M.; PAVLOVA, K.; GRIGOROVA, D. Lipid Composition of Some Yeast Strains from Livingston Island, Antarctica. **Eoha Microbiology**, v. 46, p. 402–406, 2001.

APÊNDICE A

Apêndice A. Curva padrão utilizando *p*-nitrofenol a 405 nm.

APÊNDICE B

Artigo publicado no periódico Extremophiles, v. 17, p. 1023-1035, 2013.

"Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples"

DUARTE, A. W. F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F. S.; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L. C.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G.; SETTE, L. D.

Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples

A. W. F. Duarte · I. Dayo-Owoyemi ·
F. S. Nobre · F. C. Pagnocca · L. C. S. Chaud ·
A. Pessoa · M. G. A. Felipe · L. D. Sette

Received: 3 April 2013 / Accepted: 16 September 2013 / Published online: 11 October 2013
© Springer Japan 2013

Abstract The aim of the present study was to investigate the taxonomic identity of yeasts isolated from the Antarctic continent and to evaluate their ability to produce enzymes (lipase, protease and xylanase) at low and moderate temperatures. A total of 97 yeast strains were recovered from marine and terrestrial samples collected in the Antarctica. The highest amount of yeast strains was obtained from marine sediments, followed by lichens, ornithogenic soils, sea stars, *Salpa* sp., algae, sea urchin, sea squirt, stone with lichens, *Nacella concinna*, sea sponge, sea isopod and sea snail. Data from polyphasic taxonomy revealed the presence of 21 yeast species, distributed in the phylum Ascomycota ($n = 8$) and Basidiomycota ($n = 13$). Representatives of encapsulated yeasts, belonging to genera

Rhodotorula and *Cryptococcus* were recovered from 7 different Antarctic samples. Moreover, *Candida glabrata*, *Cryptococcus victoriae*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *R. laryngis* were the most abundant yeast species recovered. This is the first report of the occurrence of some species of yeasts recovered from Antarctic marine invertebrates. Additionally, results from enzymes production at low/moderate temperatures revealed that the Antarctic environment contains metabolically diverse cultivable yeasts, which could be considered as a target for biotechnological applications. Among the evaluated yeasts in the present study 46.39, 37.11 and 14.43 % were able to produce lipase (at 15 °C), xylanase (at 15 °C) and protease (at 25 °C), respectively. The majority of lipolytic, proteolytic and xylanolytic strains were distributed in the phylum Basidiomycota and were mainly recovered from sea stars, lichens, sea urchin and marine sediments.

Communicated by M. da Costa.

A. W. F. Duarte · F. S. Nobre · L. D. Sette
Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA), Universidade
Estadual de Campinas, UNICAMP, Paulínia, São Paulo, Brazil

I. Dayo-Owoyemi
Centro de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista,
UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil

F. C. Pagnocca · L. D. Sette (✉)
Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade
Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil
e-mail: larasette@rc.unesp.br

L. C. S. Chaud · M. G. A. Felipe
Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de
Lorena, Universidade de São Paulo, USP, Lorena,
São Paulo, Brazil

A. Pessoa
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São
Paulo, USP, São Paulo, São Paulo, Brazil

Keywords Antarctic · Yeast · Cold-active enzymes ·
Biodiversity · Biotechnology

Introduction

The Antarctic continent is characterized by restrictive environmental conditions of climate, habitats and biogeography; presenting the coldest and driest climate known on earth. Among the characteristics that prevail in this continent are very low temperatures (with monthly mean temperatures always below 0 °C), extreme dryness, frequent freeze/thaw cycles, low precipitation and nutrient availability as well as high salinity and UV radiation alternating with prolonged periods of darkness (Onofri et al. 2007; Margesin and Miteva 2011). This extreme

environmental condition of the Antarctic continent is expected to form a barrier to any form of microbial life. However, it has been revealed to provide a habitat for a diversity of species of psychrophilic (extremophiles) and psychotropic microorganisms including yeasts (Frisvad 2008; Yergeau and Kowalchuk 2008; Carrasco et al. 2012).

Poorly explored ecological niches such as the Antarctic continent have received great attention due to the potential of the microbial genetic resources that inhabit these ecosystems, including complex metabolic diversity and unique biomolecules (Shivaji and Prasad 2009). Microorganisms from these habitats may hold keys to the biodegradation of organic matter and in the cycle of essential nutrients, metal detoxification and the food chain in extreme environments (Connell et al. 2008). Moreover researches involving the isolation and exploitation of terrestrial and marine Antarctic microorganisms should be encouraged, since they can result in the discovery of enzymes produced under saline and/or low-temperature conditions.

Fungi appear to play a variety of ecological roles in Antarctica; however, little is still known about their diversity (Arenz and Blanchette 2010). Several species of yeasts have been found to successfully colonize the Antarctic continent. While some of these yeasts are indigenous to the Antarctic and obligate psychrophiles, others were brought in by the wind and ocean currents as well as by migratory birds, humans and other animals who occasionally visit this habitat. The latter groups are mostly psychrotrophic and mesophilic, which equally grow and multiply at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), although remaining dormant for a long time at low temperatures. The ability to tolerate low temperature, high salinity, high radiation and other extreme conditions are fundamental adaptations of yeasts found in Antarctic environments (Ruisi et al. 2007; Shivaji and Prasad 2009). Some of these mechanisms of adaptation to cold climate include an increase in the intracellular trehalose and polyol concentrations, unsaturated membrane lipids as well as secretion of antifreeze proteins and enzymes active at low temperatures (Robinson 2001; Ruisi et al. 2007).

Psychrophilic enzymes are up to tenfold more active at low and moderate temperatures than their mesophilic homologues, require lower energy activation to disrupt the native state and therefore the conformational stability and are inactivated at temperatures higher than the optimal for catalysis (Feller and Gerday 2003). In this context, cold-active microbial enzymes have attracted increasing attention in recent years (Joseph et al. 2008; Quanfu et al. 2012), one of the main advantages related to the use of these enzymes to decrease energy expenditures and processing costs associated with industrial heating steps.

Considering that little is known about the diversity and genetic resources of Antarctic microbial communities, the

aim of the present study was to investigate the diversity of yeasts recovered from terrestrial and marine samples and their ability to produce cold-active enzymes at low and moderate temperatures.

Materials and methods

Sampling

Samples used in this study were obtained during an expedition to Antarctica in the austral summer (2009 and 2010) by the Brazilian Antarctic Program team. The sources and places in which samples were obtained are listed in Table 1. The samples were placed in sterile plastic bags, transported to Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base and immediately processed.

Table 1 Data related to marine and terrestrial Antarctic samples

Samples	Site (GPS data)
Marine	
Sediments	Punta Ulmann—21.6 m depth ($62^\circ05,015'S$ $58^\circ20,987'W$)
	Refuge 2—21 m depth ($62^\circ04,373'S$ $58^\circ25,335'W$)
	Botany Point—26 m depth ($62^\circ05,734'S$ $58^\circ19,919'W$)
	Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base—22.8 m depth ($62^\circ05,130'S$ $58^\circ23,356'W$)
Star	Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base ($62^\circ05,130'S$ $58^\circ23,356'W$)
Algae	Punta Plaza ^b
Snail	Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base ($62^\circ05,130'S$ $58^\circ23,356'W$)
Isopod	Punta Plaza ^b
Gastropod (<i>Nacella concina</i>)	Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base ($62^\circ05,130'S$ $58^\circ23,356'W$)
Tunicate (<i>Salpa</i> sp.)	Punta Plaza ^b
Ascidian (squirt)	Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base ($62^\circ05,130'S$ $58^\circ23,356'W$)
Urchin	Punta Plaza ^b
Sponge	Comandante Ferraz Brazilian Antarctic Base ($62^\circ05,130'S$ $58^\circ23,356'W$)
Terrestrial	
Ornithogenic (penguin) soils ^a	Demay and Arctowski ^b
Stones with lichens	Punta Plaza ^b
Lichens	Punta Plaza ^b

^a All samples were collected in 2 with the exception of Penguin soils that were collected in 2009

^b Samples without GPS data

Yeasts isolation

Isolation of yeasts from lichens, stone with lichens, *Salpa* sp., sea urchin, sea stars, algae, sea squirt, *Nacella concinna*, sponge, sea isopod, and sea snail was carried out on malt extract agar (MA, 20 g L⁻¹ malt extract and 15 g L⁻¹ agar) and potato dextrose agar (PDA: 200 g L⁻¹ potato, 20 g L⁻¹ dextrose, 15 g L⁻¹ agar) supplemented with rifampicin (300 µg mL⁻¹). Samples were pre-washed with sterile sea-water in order to avoid the isolation of surface microorganisms and cut into small fragments, which were placed in the culture media cited above. The plates were kept at 15 °C for 30 days. Yeasts growths were monitored every 24 h and colonies were transferred to the same media used for their isolation.

For the yeasts isolation from marine sediments and penguin soils, 1 g of each sample was initially homogenized in 50 mL of liquid media: yeast malt broth (YMB: 3.0 g L⁻¹ yeast extract, 3.0 g L⁻¹ malt extract, 5.0 g L⁻¹ peptone and 20.0 g L⁻¹ glucose) and potato dextrose broth (PDB: 200 g L⁻¹ potato and 20.0 g L⁻¹ dextrose), both prepared with artificial sea water (ASW) and supplemented with streptomycin (300 µg mL⁻¹). The enrichment media were incubated at 15 °C and 150 rpm for 3 days and after that period, 100 µL was inoculated in the same media containing 15 g L⁻¹ of agar (YMA and PDA). Growths of yeasts were monitored every 24 h and colonies were transferred to YMA or PDA. All purified yeasts are being maintained by cryopreservation (−80 °C in 10 % glycerol) in the research collections associated to the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms (CBMAI) at Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA) at the Campinas State University (UNICAMP) and to the Central of Microbial Resource (CRM-UNESP) at the São Paulo State University (UNESP/Rio Claro).

Yeast diversity

Morphological characterization

For the morphological characterization, the strains were cultivated on YMA supplemented with chloramphenicol (150 µg mL⁻¹) and incubated at 15 °C. After 3 days of incubation, yeast isolates were differentiated by their macro and micro-morphologies according to Kurtzman et al. (2011).

Molecular characterization

DNA extraction and genetic fingerprinting Genomic DNA from 2- to 3-day-old cultures was extracted according to Almeida (2005). Two loopfulls of the cell cultures were suspended in 500 µL lysing buffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.3 % SDS, pH 8) containing

approximately 200 µL of 425–600 µm glass beads (Sigma). The tubes were initially vortexed for 3 min before incubating at 65 °C for 1 h. This step was repeated after which the tubes were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. The supernatants were collected and preserved at −20 °C. Genomic DNA was used for grouping the isolates (each colony morphotype) by genetic fingerprinting based on microsatellite primed polymerase (MSP) PCR analysis using primer (GTG)₅. Representative fingerprints were subjected to sequence and phylogenetic analyses.

Sequencing and phylogenetic analyses The primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') were used for the amplification of the D1/D2 regions of the 26S rDNA gene. A 25-µL polymerase chain reaction was performed for DNA samples selected after morphological and genetic (MSP-PCR) analyses in a GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology) using 1 µL of 50 mM MgCl₂, 4 µL of 1.25 mM of each dNTP, 2.5 µL of 10× PCR buffer, 2 µL of 10 µM of each primer, 0.2 µL of 5 U of Taq polymerase with 5 µL DNA template (diluted 1:750). PCR products were purified using the *illustra PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK). The purified products were used as templates for sequencing using ABI Genetic analyzer BigDye Terminator cycle sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequences of the D1/D2 regions were obtained using the same sets of primers used for the amplification. Forward and reverse sequences were aligned with the program ClustalW provided in BioEdit (Hall 1999). The sequences obtained for both regions were compared with sequences of other yeasts obtained by BLAST_N search from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)-GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequences were aligned using CLUSTAL X program (Thompson et al. 1994) and analyzed in MEGA version 4.0 (Tamura et al. 2007). Phylogenetic relationships were estimated in MEGA using the Neighbour-joining analysis DNA by the Maximum Likelihood model with bootstrap values calculated from 1,000 replicates.

Prospecting of enzymes

Screening for lipase protease and xylanase activities

Screening for lipase-producing yeasts was carried out using the plate assay described by Kouker and Jaeger (1987). The method is based on the measurement of fluorescence in UV light at 350 nm caused by the interaction of Rhodamine B with the fatty acids released by enzymatic hydrolysis of olive oil. The medium used for lipase screening was the Tubakii modified (TM: 1 g L⁻¹ peptone, 0.5 g L⁻¹ extract

of yeast and 15 g L⁻¹ agar) added olive oil (31.25 mL L⁻¹) as a carbon source and Rhodamine B solution 0.01 % v/v (10 mL L⁻¹) in ethanol absolute. The mixture was homogenized in a sterilized blender after which it was poured onto each plate. A high throughput screening (HTS) method was applied by the inoculation of 24 yeasts per plate. Lipase positive strains were detected by the presence of an orange colored fluorescent halo under UV light after every 24 h (24–144 h) of incubation at 15 °C. All positive strains were cultured individually in order to confirm the presence of orange fluorescent halos.

Assessment of the extracellular protease production was made by inoculating yeasts on skim milk agar Sabouraud containing 10 g L⁻¹ skim milk and 65 g L⁻¹ agar Sabouraud based on Charoenchai et al. (1997) and Geok et al. (2003). Assays were performed to identify the appropriate dilution for individualization of colonies on plates (10⁻⁵) and the identification of a clear halo around the colonies indicated the production of proteases by the yeasts after 120 h of incubation at 25 °C. The experiments were carried out in triplicate.

The yeast cultures were screened for the ability to degrade xylan on a medium containing 10 g L⁻¹ Birchwood xylan, 6.7 g L⁻¹ yeast nitrogen base (YNB) and 1.5 g L⁻¹ agar. Cell suspensions were calibrated to an average concentration of 10⁶ cells mL⁻¹ and 10 µL was point inoculated on 15 mL of the solidified xylan medium. All experiments were carried out in triplicate. After incubation for 14 days at 15 °C, plates were flooded with an iodine solution according to Pointing (1999). Xylanase activity was detected by the formation of a clear halo around the cell colony.

Estimation of lipase, protease and xylanase activities

The enzymatic activity of lipase was spectrophotometrically determined at 405 nm by using *p*-nitrophenyl palmitate as substrate (Yang et al. 2002). Aliquots of cell suspension (10⁷ cells mL⁻¹) were used to inoculate 50 mL of the lipase medium containing 5 g L⁻¹ peptone, 3 g L⁻¹ yeast extract, 1 g L⁻¹ magnesium sulfate (MgSO₄·7H₂O), 1 g L⁻¹ sodium nitrate (NaNO₃) and 20 g L⁻¹ olive oil during 144 h at 20 °C under 180 rpm. Fermented substrates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant phase was used as the lipase enzyme source. The reaction mixture for lipase quantification contained 3.8 mg of *p*-nitrophenol palmitate dissolved in 500 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and homogenized in a sodium phosphate buffer [50 mM, pH 8.0 with Triton X100 (5 g L⁻¹)]. The reaction mixture contained 100 µL of diluted enzyme and 900 µL of substrate (25 °C for 5 min). The reaction was stopped by heat shock at 90 °C for 1 min in a water bath, followed by the addition of 1 mL of a

saturated solution of Na₂B₄O₇·10H₂O. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 µmol of *p*-nitrophenol per milliliter per minute of reaction. The standard curve was constructed using *p*-nitrophenol (0.4–16.0 µM), *R*² = 0.9996.

For quantifying the proteolytic activity, yeasts selected in the screening were grown in a Sabouraud broth at 25 °C during 120 h. Standardized inoculum of 1 × 10⁸ cells mL⁻¹ was transferred to Erlenmeyer flasks of 125 mL containing 50 mL of medium (pH 5.5) and was incubated under agitation (150 rpm) in a rotary shaker. Proteolytic activity was determined by spectrophotometry at 430 nm in the cell-free extract by digestion of azocasein 1 % acetate buffer (pH 5.0) at 37 °C. After 40 min of incubation the reactions were stopped by the addition of TCA 100 g L⁻¹. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that catalyzes the release of azo dye, so that ΔA/Δt = 0.001/min.

For the xylanolytic activity aliquots of 10⁶ cells mL⁻¹ were used to inoculate 25 mL of Vogel's medium (Vogel 1956) containing 5 g L⁻¹ birchwood xylan in a 150-mL Erlenmeyer flask. The inoculated flasks were incubated at 15 °C at 120 rpm. Samples were retrieved after 3 days of incubation, centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatants were used as extracellular crude enzymes source. Endoxylanase activity was assayed using 10 g L⁻¹ birchwood xylan as a substrate. The reaction mixture contained 100 µL each of diluted enzyme and 5 g L⁻¹ xylan in 50 mM acetate buffer at pH 5.5. The mixture was incubated at 25 °C for 30 min. After incubation, xylanase activity was determined by measuring the amount of reducing sugars according to the dinitrosalicylic acid method of Miller (1959) using xylose as standard. Absorbance readings of the resulting samples were measured against a blank at 575 nm. β-Xylosidase activity was estimated using a cell-associated enzyme according to Knob and Carmona (2008) and Ohta et al. (2010) with modifications. An amount of 200 µL of homogenized culture suspension was centrifuged and washed twice with sterilized distilled water. The cells were later suspended in 200 µL of ice cold (50 mM), pH 5.5, sodium acetate buffer and ground with sterile glass beads. The assay mixture contained 200 µL sodium acetate buffer (50 mM), pH 5.5, 200 µL *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (4 mg mL⁻¹) and 100 µL of enzyme preparation. The reaction mixtures were incubated at 40 °C for 30 min, and stopped by adding 1 mL Na₂CO₃ (1 M) solution. The *p*-nitrophenol released was determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 410 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the enzyme amount that releases 1 µmol of reducing sugar per minute. All assays of estimation activities were performed in triplicate.

Table 2 Diversity of yeasts and their respective origin samples

Species	Samples													No. isolates
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
Ascomycota														
<i>Candida davisiana</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	3
<i>Candida glabosa</i>	–	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7
<i>Candida sake</i>	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1	–	–	3
<i>Debaryomyces macquariensis</i>	–	–	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4
<i>Metschnikowia australis</i>	2	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	–	–	–	1	–	6	–	–	–	–	3	2	13
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	–	–	–	–	–	–	–	1	–	2	–	–	–	3
Basidiomycota														
<i>Bullera pseudoalba</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	1	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	4
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	–	–	–	–	–	4	–	–	–	1	1	–	–	6
<i>Cryptococcus victoriae</i>	4	2	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4
<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>	–	1	–	1	2	–	–	–	–	–	–	–	–	4
<i>Guehomyces pullulans</i>	–	2	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	3
<i>Leucosporidium scottii</i>	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
<i>Rhodotorula glacialis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	1
<i>Rhodotorula laryngis</i>	–	4	–	–	–	1	–	–	2	–	–	–	–	7
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	–	2	–	1	–	3	1	2	–	2	1	–	–	12
<i>Tremella indecorata</i>	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
No. of isolates	14	12	11	9	9	8	8	6	6	5	4	3	2	97
No. of species	6	6	2	5	5	3	3	3	3	3	4	1	1	–

The total number of isolates and species are highlighted in bold

A Marine sediments, B lichens, C ornithogenic soils (penguin soils), D *Salpa* sp., E sea star, F sea urchin, G algae, H sea squirt, I stone with lichens, J *Nacella concinna*, K sea sponge, L sea isopod, M sea snail

Results

Yeast diversity

A total of 97 yeasts strains were recovered from samples collected in the Antarctic marine and terrestrial ecosystems. Marine sediments yielded a higher number of strains ($n = 14$), followed by lichens ($n = 12$), ornithogenic soils ($n = 11$), sea stars ($n = 9$), *Salpa* sp. ($n = 9$), algae ($n = 8$), sea urchin ($n = 8$), sea squirt ($n = 6$), stone with lichens ($n = 6$), *Nacella concinna* ($n = 5$), sponge ($n = 4$), sea isopod ($n = 3$) and sea snail ($n = 2$) (Table 2).

Initially the yeasts were grouped based on their morphological characteristics, resulting in 35 different clusters. Genetic fingerprinting resulted in 24 defined groups based on microsatellite banding patterns (MSP-PCR) (data not shown). One representative of each morphological group

was submitted to molecular identification by a 26S rDNA (D1/D2 domain) sequencing and phylogenetic analyses. A total of 21 yeast species, distributed in 12 genera, were identified (Table 3), with 8 belonging to phylum Ascomycota and 13 to phylum Basidiomycota.

Representatives from phylum Ascomycota ($n = 39$) were affiliated to 5 genera: *Candida* ($n = 13$), *Debaryomyces* ($n = 7$), *Metschnikowia* ($n = 3$), *Meyerozyma* ($n = 13$) and *Wickerhamomyces* ($n = 3$) and representatives from Basidiomycota ($n = 58$) were affiliated to 7 genera: *Bullera* ($n = 1$), *Cryptococcus* ($n = 20$), *Cystofilobasidium* ($n = 8$), *Guehomyces* ($n = 3$), *Leucosporidium* ($n = 5$), *Rhodotorula* ($n = 20$) and *Tremella* ($n = 1$). Among the 21 yeasts species identified the most abundant were *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* ($n = 13$), *Rhodotorula mucilaginosa* ($n = 12$), *Cryptococcus victoriae* ($n = 8$), *Candida glabrosa* ($n = 7$) and *Rhodotorula laryngis* ($n = 7$) (Fig. 1; Tables 2, 3).

Screening for enzymes activities at low and moderate temperatures

Among the 97 yeast strains recovered from the Antarctic samples, 47 were positive for lipase in the HTS experiments, out of which 45 (46.39 %) were confirmed as lipase producers at 15 °C in the individual test (Fig. 2a, b); 14 (14.43 %) were positive for protease, showing a clear halo indicative of protein degradation in a Sabouraud agar medium with skim milk at 25 °C (Fig. 2c); and 36 (37.11 %) were positive for xylanase, due to their ability to produce clearance zones around their colonies when cultivated on xylan substrate at 15 °C (Fig. 2d).

Most of the lipolytic yeasts were recovered from lichens ($n = 10$, 22.2 %), followed by marine sediments ($n = 7$, 15.5 %), sea stars ($n = 6$, 13.3 %), *Nacella concinna* ($n = 5$, 11.1 %), sea urchin ($n = 5$, 11.1 %), *Salpa* sp. ($n = 4$, 8.89 %), sea squirt ($n = 3$, 6.67 %), sponge ($n = 2$, 4.44 %) and algae, sea isopod and ornithogenic soil ($n = 1$, 2.2 % each). Proteolytic strains were

Fig. 1 Phylogenetic analysis of partial 28S rDNA gene (D1/D2 region) sequences of yeast isolates and related type strains. Evolutionary distances were based upon the Maximum Likelihood estimation and tree reconstruction upon the Neighbour-joining method. Bootstrap values (1,000 replicate runs, shown as %) >70 % are listed

recovered from sea stars ($n = 3$, 21.43 %), sea urchin ($n = 3$, 21.43 %), *Nacella concinna* ($n = 2$, 14.3 %) and marine sediments, lichens, *Salpa* sp., sea squirt, sea sponge and algae ($n = 1$, 7.14 % each). On the other hand, xylanolytic strains were recovered from sea stars ($n = 8$, 22.22 %), sea urchin ($n = 6$, 16.66 %), lichens ($n = 5$, 13.88 %), marine sediments ($n = 4$, 11.11 %), *Salpa* sp. ($n = 4$, 11.11 %), stone with lichens ($n = 4$, 11.11 %), *Nacella concinna* ($n = 3$, 8.33 %), sea squirts ($n = 1$, 2.77 %) and sea sponge ($n = 1$, 2.77 %) (Fig. 3).

The majority of lipolytic, proteolytic and xylanolytic strains were distributed in the phylum Basidiomycota. Lipase-producing species were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* ($n = 10$), *Rhodotorula laryngis* ($n = 5$), *Cryptococcus laurentii* ($n = 5$), *Leucosporidium scottii*

Table 3 Molecular identification based on the similarity of partial 26S rDNA gene, accession number and code of the Antarctic yeast strains

CBMAI accession number	Strains code ^a	Sequences similarity BLASTn (%)	Closest relatives (GenBank accession number)
Ascomycota			
CBMAI 1509	L101 , L107, L114	99	<i>Candida davisiana</i> (AF536563)
CBMAI 1510	L75 , L76, L77, L78, L79, L83, L84,	99	<i>C. glabrosa</i> (EU327105)
CBMAI 1511	L51 , L53, L58	100	<i>C. sake</i> (U45728)
CBMAI 1512	L3 , L6, 72	99	<i>Debaryomyces hansenii</i> (U45808)
CBMAI 1513	L74 , L80, L81, L82	99	<i>D. macquariensis</i> (FR799729)
CBMAI 1514	L02, L33 , L48b	99	<i>Metschnikowia australis</i> (U76526)
CBMAI 1515	L4, L5, L9, L10, L11, L13, L15, L17, L18, L19, L20, L21 , L119	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (EU177574)
CBMAI 1516	L36 , L37a, L55	100	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (EU285512)
Basidiomycota			
CBMAI 1517	L71	99	<i>Bullera pseudoalba</i> (AF075504)
CBMAI 1518	L95 , L108, L110, L121	100	<i>Cryptococcus adeliensis</i> (AM748527)
CBMAI 1519	L94 , L112	100	<i>Cryptococcus albidosimilis</i> (DQ377659)
CBMAI 1520	L35 , L59, L63, L62, L64, L70	98	<i>Cryptococcus laurentii</i> (GQ352524)
CBMAI 1521	L42 , L43, L92, L124, L32, 97, 122, 123.	100	<i>Cryptococcus victoriae</i> (AF363647)
CBMAI 1522	L45b , L47b, L47a, L46	99	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> (AJ508233)
CBMAI 1523	L44 , L96, L98, L111	100	<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i> (DQ645523)
CBMAI 1525	L86 , L88, L109a		<i>Guehomyces pullulans</i> (AF105394)
CBMAI 1526	L115 , L116, L117, L118, 120,	100	<i>Leucosporidium scottii</i> (AF070419)
CBMAI 1527	L27 , L25, L29, L60, L87, L103, L104	99	<i>Rhodotorula laryngis</i> (AF189942)
CBMAI 1528	L7 , L26, L28, L34, L38, L49a, L52, L56, L65, L67a, L67b, L69, L73	100	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (EU285499)
CBMAI 1529	L106	99	<i>Rhodotorula glacialis</i> (EF151258)
CBMAI 1530	L99	97	<i>Tremella indecorata</i> (AF042250)

^a Strains that were submitted to sequencing and deposited at CBMAI are highlighted in bold

($n = 5$), *Cryptococcus adeliensis* ($n = 4$), *Guehomyces pullulans* ($n = 3$), *Cryptococcus victoriae* ($n = 2$), *Cryptococcus albidosimilis* ($n = 2$), *Cystofilobasidium capitatum* ($n = 1$), *Cystofilobasidium infirmominatum* ($n = 1$) (Basidiomycota, 84.5 %) and *Wickerhamomyces anomalus* ($n = 3$), *Debaryomyces macquariensis* ($n = 1$), *Candida davisiana* ($n = 1$), *Meyerozyma guilliermondii* ($n = 1$), *Metschnikowia australis* ($n = 1$) (Ascomycota, 15.5 %).

Protease-producing yeasts were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* ($n = 10$), *Cryptococcus adeliensis* ($n = 2$), *Guehomyces pullulans* ($n = 1$) (Basidiomycota, 92.86 %) and *Metschnikowia australis* ($n = 1$) (Ascomycota, 7.14 %). All the Basidiomycota species ($n = 30$, 80.56 %) were able to produce enzymes capable of degrading xylan, except yeasts from the genera *Rhodotorula* and *Bullera*. *Candida davisiana* ($n = 3$), *Wickerhamomyces anomalus*

Fig. 2 Enzymatic screening in solid media: **a** orange halo in UV light for lipolytic yeasts in the HTS; **b** orange halo in UV light for lipolytic yeasts in individual test; **c** clear halos of protein degradation for proteolytic yeasts; **d** clear halo of xylan degradation for xylanolytic yeast

Fig. 3 Number of yeast isolates (n) able to produce protease, xylanase and/or lipase and their respective Antarctic substrate

Fig. 4 Number of yeast isolates (n) able to produce protease, xylanase and/or lipase and their respective species

($n = 3$) and *Metchnikowia australis* ($n = 1$) were the representatives of Ascomycota strains (19.44 %) that presented xylan degrading activities (Fig. 4).

Estimation of enzyme activities

Lipase activity was detected in 38 strains where *Cryptococcus laurentii* (L35, L59, L63, L70), *Leucosporidium scottii* (L116, L117) and *Cryptococcus adeliensis* (L121) showed values above 0.1 U mL^{-1} . The highest values were presented by the strains L117 (0.230 U mL^{-1}) and L59 (0.143 U mL^{-1}) after 120 h of incubation and L121 (0.113 U mL^{-1}) after 144 h of incubation.

All protease-positive strains screened ($n = 14$) showed some activity on the used substrate. The highest proteolytic activity was produced by *Rhodotorula mucilaginosa* L7 (11.12 U mL^{-1}) after 120 h of cultivation, followed by strains L52, L34, L26, L38, L65, L49a, L73, L69, L2, L109a, L67b, L95 and L110, respectively.

Candida davisiana L101 (0.75 U mL^{-1}), *Cryptococcus adeliensis* L108 (0.43 U mL^{-1}), *Guehomyces pullulans* L109 (0.43 U mL^{-1}) presented the highest endoxylanase activities. The other isolates showed endoxylanase activities below 0.5 U mL^{-1} . Yeast strains that showed the highest activities of β -xylosidase were *Cryptococcus laurentii* L62 (1.09 U mL^{-1}), L64 (0.81 U mL^{-1}) and L35 (0.65 U mL^{-1}). The remaining strains presented β -xylosidase activities below 0.55 U mL^{-1} .

Discussion

Yeast diversity

Despite the few mycological investigations on the Antarctic continent, a significant number of new taxa of yeasts

have been described (Ruisi et al. 2007; Connell et al. 2008; Vaz et al. 2011). The number of yeasts isolated in this study ($n = 97$; 21 species) reveals that the Antarctic is a suitable environment for the isolation of this group of microorganism. Data derived from diversity characterization in the present study, suggest that basidiomycetous yeasts are more adapted to the Antarctic ecosystems than the ascomycetous yeasts. Similar findings have also been obtained from studies in different cold environments (Connell et al. 2008; Turchetti et al. 2008; Vaz et al. 2011; Uetake et al. 2012; Carrasco et al. 2012).

Basidiomycetous yeasts have been mainly found in cold environments including the species *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Mrakia* and *Rhodotorula* (Vishniac 2006). In the present study, encapsulating yeasts belonging to the genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus* were predominantly recovered, both being isolated from 7 substrates (Table 2). The predominance of these yeasts in cold environments, such as the Antarctica, could be linked to their ability to produce polysaccharide capsules, utilize available nutrients in oligotrophic systems (needing the minimal nutritional requirements) and the increase in the proportion of unsaturated fatty acids compared to the saturated fatty acids in the plasmatic membrane (Connell et al. 2008; Margesin and Miteva 2011).

Yeast distribution in the Antarctic environments is related to the distribution of different samples, mainly soils, rocks, feathers and bird dung, vegetation (largely limited in the Antarctic continent) and lichens (Ruisi et al. 2007; Connell et al. 2008). The Antarctic marine sediments have been studied by several authors (Connell et al. 2008; Shivaji and Prasad 2009; Arenz and Blanchette 2010; Vaz et al. 2011). In this study 14 yeast strains, representing 6 different species, were isolated from marine sediments. Note that representatives of *Leucosporidium scottii* were only recovered from this substrate.

Although yeasts may play a vital role in marine ecosystems (Kutty and Philip 2008; Burgaud et al. 2010; Richards et al. 2012), studies related to the microbial diversity in Antarctic marine invertebrates are scanty. In the present study, the highest diversity of yeast was achieved in marine invertebrates *Salpa* sp. and sea stars (5 species each), following by sea sponge (4 species), sea urchin, sea squirt and *Nacella concinna* (3 species each) and sea isopod and sea snail (1 species each) (Table 2), broadening the knowledge of yeast diversity derived from Antarctic marine macroorganisms.

The majority of yeasts isolated and identified in the present study (e.g., *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* and *Rhodotorula*) is classified as marine facultative, since they are able to grow and reproduce in terrestrial environments (Kohlmeyer and Kohlmeyer 1979). *Metschnikowia* is considered as indigenous to the Antarctic (Vaz et al. 2011). In this study, representatives of this genus were recovered from marine sediments and from the tunicate *Salpa* sp., being the first report related to the recovery of *Metschnikowia* from this last substrate. In addition, although the nature of the relationship between the microbial community and marine invertebrates is still unknown, *Debaryomyces hansenii* has been frequently isolated from the internal fluids of marine invertebrates, suggesting that this yeast can serve as riboflavin vitamin source for invertebrates (Kutty and Philip 2008). Representatives of this genus were recovered from sponge and algae samples (Table 2).

As an exception to most Antarctic soils, characterized by their oligotrophic habitats, ornithogenic soils (those from penguin colonies) contain much of the organic carbon and nitrogen in the form of amino acids and urea (Russell and Cowan 2006). In the present study, 11 strains belonging to 2 species (*Candida glabrata* and *Debaryomyces macquariensis*) were recovered from ornithogenic soils. *C. glabrata* was also recovered from Antarctica ornithogenic soils by Vaz et al. (2011). According to Bölter et al. (2002) the rare presence of yeast and mold in ornithogenic soils could be related to the presence of acrylic acid in penguin excrement and the high chitinolytic and antifungal activity of bacteria.

Lichens are pioneer organisms of extreme terrestrial environments (Ruisi et al. 2007), common in cold ecosystems and are especially common on rocks and soil in Antarctica (Frisvad 2008). In the present study, 18 strains, belonging to 8 different species were recovered from lichens and stone with lichens. Only yeasts from phylum Basidiomycota were isolated from lichen samples, which is a representative of *Tremella indecorata* isolated only from this substrate. In addition, *Rhodotorula glacialis* and *Candida davisiana* were only recovered from stone with lichens. *C. davisiana* is an undescribed yeast species.

The majority of yeasts present in Antarctic ecosystems are psychrotolerant and few are obligate psychrophiles. This is possibly due to a response to the wide temperature fluctuations in the Antarctica ice-free micro-habitat which allow microorganisms to survive in unstable environments (Ruisi et al. 2007). Moreover, Antarctica seems to have few endemic fungal species, perhaps due to many terrestrial fungi that have been introduced via humans, animals or wind dispersal (Frisvad 2008). Among the yeasts described from Antarctica, *Candida davisiana*, *Candida sake*, *Cryptococcus victoriae*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii* and *Metschnikowia australis* were isolated from different samples in the present study.

This investigation represents an emerging view of the yeast diversity from Antarctic marine and terrestrial ecosystems, since literature related to this topic is scarce. Additionally, this is the first report of the occurrence of some species of yeasts recovered from Antarctic marine invertebrates.

Screening and estimation of lipases, proteases and xylanases

The ability of yeasts to grow and multiply in cold environments indicates that their metabolisms are catalyzed by enzymes that are active at low temperatures. In this context, yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples were submitted to a screening and quantification of different enzymes at low and moderate temperatures.

The high number of lipase positive yeast strains (46.39 %) screened in the present study could be related to the natural habitat from which these microorganisms were isolated. The lipase production by fungi derived from Antarctic ecosystems may be associated with mechanisms of cold tolerance that have been discussed in the literature (Russell 1990; Crowe et al. 1992; Margesin 2000). In low-temperature environments the freezing and/or dehydration of cells may be caused by the transition of the membrane lipids from the liquid to gel phase (Crowe et al. 1987). Therefore, the maintenance of the fluidity of the cell membrane is essential to their survival and may be achieved by increasing the degree of unsaturation of fatty acids. In addition, the production of cryoprotectant compounds such as glycerol and trehalose has also been reported as one of the mechanisms of cellular adaptation to cold (Robinson 2001; Ruisi et al. 2007). Faced with these observations, the lipase activity is an important mechanism of cold adaptation.

Lipases (EC 3.1.1.3) are carboxyl ester hydrolases of the α/β hydrolase superfamily which catalyze the hydrolysis and synthesis of long chain acylglycerol. Cold-active microbial lipases have attracted scientific interest in recent years, because these enzymes have high specific activity in

processes which occur at low temperatures. This property is very useful in various industrial sectors, especially in the production of detergents used in "cold washing", chemicals, pharmaceuticals and food (Siddiqui and Cavicchioli 2006; Joseph et al. 2008).

Most of the known lipolytic yeasts (e.g., *Candida*, *Yarrowia* and *Saccharomyces*) belong to the phylum Ascomycota (Vakhlu and Kour 2006). *Candida antarctica* isolated from sediments of Lake Vanda in Antarctica (a lake permanently covered by ice), showed the ability to produce two forms of specific lipases (A and B Lipase), from which the processes related to the enzymes production were patented (Maria et al. 2005). In the present study, the main lipases producing yeasts were affiliated to the phylum Basidiomycota, those with higher enzyme production at 20 °C being *C. laurentii* L59, *C. adeliensis* L121 and *L. scottii* L117. Since little is known about the lipase production by basidiomycetous yeasts, these Antarctic-derived species may represent new enzymes with different biotechnological applications.

Proteolytic enzymes or proteases (EC 3.4.21) are hydrolytic enzymes that catalyze the breakdown of peptide bonds in proteins, whose specificity is related to the position of the peptide bond and to the amino acid sequence surrounding the connection (Vermelho et al. 2008). Microbial proteases are the subject of considerable attention and accounting for 60 % of the global market (Bon et al. 2008). However, secretion of proteases by yeasts is not a common property (Turkiewicz et al. 2003). Yeasts such as *Candida humicola*, *C. pulcherrima*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula bacarum*, *Leucosporidium antarcticum*, *Aureobasidium pullulans*, *Yarrowia lypolitica*, *Cryptococcus* sp. were reported as extracellular proteases producers (Ray et al. 1992; CharoENCHAI et al. 1997; Turkiewicz et al. 2003; Li et al. 2009; Rao et al. 2011). Among these, *C. humicola* and *L. antarcticum* produce cold-active proteases, which can be applied in detergents and soap powder for dirt removal in "cold washing" processes and in the food and pharmaceutical fields (Margesin et al. 2008). In the present study, 14 strains were able to produce protease in solid and liquid medium, being the highest activities observed after 96 h of cultivation, coinciding with the stationary phase of growth or decline phase (data not shown). *Rhodotorula mucilaginosa* L7 was able to produce great amount of protease (11.12 U mL⁻¹) at 25 °C.

Xylanases (EC 3.2.1.8) have received great attention due to their wide application in various industrial processes ranging from pulp bleaching, baking, juice clarification (in combination with pectinase and cellulase) and animal feed production (Subramaniyan and Prema 2002). Xylanases active at low temperatures have been used for flour production by modifying hemicelluloses, as well as in the field

of biofuel and bioremediation (Margesin et al. 2008). Studies investigating xylanase production in yeasts are still scanty, since the xylanases of just a few species have been characterized. A cold-adapted endoxylanase produced by *C. adeliensis* (CBS 8351) was characterized by Petrescu et al. (2000).

Although xylanase activity was not found in any of the *Rhodotorula* species recovered from the Antarctic samples, ability to degrade xylan was displayed by almost all the basidiomycetous species screened in this study, suggesting that xylan degradation is more pronounced among the basidiomycetous yeast strains than in the ascomycetous yeasts. All the species of *Cryptococcus* tested showed xylan degrading abilities, thus confirming the fastidious metabolic nature of this basidiomycetous genus (Gadanhó and Sampaio 2009). *Cryptococcus adeliensis* has been reported as a xylanases producer and such enzymes have been purified and studied in detail (Gomes et al. 2000). This is the first report about xylan degradation by *C. davisi*ana. Representatives of this yeast species (L70 and L101) were the highest producers of β -1,4-endoxylanase enzyme in this study.

Taking into account that microbial enzymes produced by fungi are mostly extracellular and propitiate simplified recovery when compared to plant and animal enzymes and that cold-active enzymes have properties useful in industrial and environmental processes, the yeast collection recovered from Antarctic samples may represent a promising genetic resource for R&D, highlighting the biotechnological potential of the Antarctic continent. The yeasts selected in the present study based on their capacity to produce enzymes at low/moderate temperatures are currently being investigated in the search for enzymatic optimization (by experimental design) and application.

Acknowledgments The authors would like to thank Prof. Vivian Helena Pellizari, Prof. Itamar Soares Melo and Prof. Eduardo Carlos Hadju for their contribution in the collection of marine and terrestrial Antarctic samples, as well as Raymond J. Burgess for the English Review. A. Duarte was supported by Ph.D. grants from CAPES and FAPESP (2010/08352-5). Part of the research was supported by the European Community's Seventh Framework Program (FP7 2010–2013, BAMMBO Project). L.D. Sette thanks FAPESP for the financial support (FAPESP grant 2010/17033-0) and PROANTAR Program for the sampling support.

References

- Almeida JMGCF (2005) Yeast community survey in the Tagus estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 53:295–303
- Arenz BE, Blanchette RA (2010) Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biol Biochem* 43:308–315
- Bölter M, Kandeler E, Pietr SJ, Seppelt RD (2002) Heterotrophic Microbes, Microbial and Enzymatic Activity in Antarctic Soils. *Geocol Antarct Ice-Free Coast Landsc Ecol Stud* 154:189–214

- Bon EP, Costa RB, Silva MVA, Leitao VSF, Freitas SP, Ferrara MA (2008) Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. In: Enzimas em Biotecnologia- Produção, Aplicações e Mercado, Ed. Interciência, Rio de Janeiro 20:463–488
- Burgaud G, Arzur D, Durand L, Cambon-Bonavita M, Barbier G (2010) Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. *FEMS Microbiol Ecol* 73:121–133
- Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M (2012) Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiol* 12:251
- Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA, Todd B (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust J Grape Wine Res* 3:2–8
- Connell L, Redman R, Craig S, Scorzett G, Iszard M, Rodriguez R (2008) Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbiol Ecol* 56:448–459
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Wistrom CA (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 242:1–10
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599
- Feller G, Gerday C (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* 1:200–208
- Frisvad JC (2008) Fungi in cold ecosystems. In: Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C (eds) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer, Berlin, pp 137–156
- Gadanhó M, Sampaio JP (2009) *Cryptococcus ibericus* sp. nov., *Cryptococcus aciditolerans* sp. nov. and *Cryptococcus metallitolerans* sp. nov., a new ecoclade of anamorphic basidiomycetous yeast species from an extreme environment associated with acid rock drainage in São Domingos pyrite mine, Portugal. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2375–2379
- Geok LP, Razak CAN, Rahman RNZA, Basri M, Salleh AB (2003) Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochem Eng J* 13:73–77
- Gomes I, Gomes I, Steiner W (2000) Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles* 4:227–235
- Hall TA (1999) Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- Joseph B, Ramteke PW, Thomas G (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* 26:457–470
- Knob A, Carmona EC (2008) Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Appl Sci J* 4(2):277–283
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) Marine micology: the higher fungi. Academic Press, New York
- Kouker G, Jaeger KE (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 53:211–213
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V (2011) Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) *The yeasts: a taxonomic study*, 5th edn. Elsevier, San Diego, pp 88–110
- Kutty SN, Philip R (2008) Marine yeasts—a review. *Yeast* 25:465–483
- Li J, Chi Z, Wang X, Peng Y, Chi Z (2009) The selection of alkaline protease-producing yeasts from marine environments and evaluation of their bioactive peptide production. *Chin J Oceanol Limnol* 27:753–761
- Margesin R (2000) Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *Int Biodeterior Biodegrad* 46:3–10
- Margesin R, Miteva V (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol* 162:346–361
- Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C (eds) (2008) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer, Berlin, Germany, pp 352–360
- Maria PD, Carboni-Oerlemans C, Tuin B, Bargeman G, Meer A, Gemert R (2005) Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art. *J Mol Catal B Enzym* 37:36–46
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the production of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426–620
- Ohta K, Fujimoto H, Fujii S, Wakiyama M (2010) Cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: purification, properties, and characterization of the encoding gene. *J Biosci Bioeng* 110:152–157
- Onofri S, Selbmann L, Hoog GS, Grube M, Barreca D, Ruisi S, Zucconi L (2007) Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Adv Space Res* 40:1657–1664
- Petrescu I, Lamotte-Braaseur J, Chessa JP, Ntarima P, Claeysens M, Devreese B, Marino G, Gerday C (2000) Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. *Extremophiles* 4:137–144
- Pointing SB (1999) Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers* 2:17–33
- Quanfu W, Yanhua H, Yu D, Peisheng Y (2012) Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ 70. *Mol Biol Rep* 39:9233–9238
- Rao S, Mizutani O, Hirano T, Masaki K, Iefuji H (2011) Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. *J Biosci Bioeng* 112:441–446
- Ray MK, Devi KU, Kumar GS, Shivaji S (1992) Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. *Appl Environ Microbiol* 58:1918–1923
- Richards TA, Jones MDM, Leonard G, Bass D (2012) Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Ann Rev Mar Sci* 4:495–522
- Robinson CH (2001) Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol* 151:341–353
- Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Bio/Technol* 6:127–141
- Russell NJ (1990) Cold adaptation of microorganisms. *Philos Trans R Soc Lond Ser B* 326:595–611
- Russell NJ, Cowan DA (2006) Handling of psychrophilic microorganisms. In: Rainey FA, Oren A (eds) *Methods in microbiology, extremophiles*, vol 35. Academic Press, London, pp 371–393
- Shivaji S, Prasad GS (2009) Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer, Amsterdam, pp 3–18
- Siddiqui KS, Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem* 75:403–433
- Subramaniyan S, Prema P (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Crit Rev Biotechnol* 22:33–46
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C, Vaughan-Martini A (2008) Psychrophilic yeasts in

- glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol* 63:73–83
- Turkiewicz M, Pazgier M, Kalinowska H, Bielecki S (2003) A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles* 7:435–442
- Uetake J, Yoshitaka Y, Naoko N, Hiroshi K (2012) Isolation of oligotrophic yeasts from supraglacial environments of different altitude on the Gulkana Glacier (Alaska). *FEMS Microbiol Ecol* 82:279–286
- Vaklu J, Kour A (2006) Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron J Biotechnol* 9:69–85
- Vaz ABM, Rosa LH, Vieira ML, Garcia V, Brandão LR, Teixeira LCRS, Moliné M, Libkind D, Van BMG, Rosa CA (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz J Microbiol* 43:937–947
- Vermelho AB, Melo ACN, Sá MHB, Santos ALS, Davila-Levy CM, Couri S, Bon E (2008) Enzimas Proteolíticas: aplicações Biotecnológicas. In: *Enzimas em Biotecnologia- Produção, Aplicações e Mercado*, Ed. Interciência, Rio de Janeiro 11:273–287
- Vishniac HS (2006) Yeast biodiversity in the Antarctic. In: Rosa CA, Péter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlin, pp 221–240
- Vogel HJ (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microb Genetics Bull* 13:42–43
- Yang J, Koga Y, Nakano H, Yamane T (2002) 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* 15:147–152
- Yergeau E, Kowalchuk GA (2008) Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. *Environ Microbiol* 10:2223–2235