

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Laura Esteves Furbino

**Fungos associados à macroalgas tropicais e antárticas: taxonomia, diversidade e
utilização em processos para produção de bioetanol de terceira geração**

Belo Horizonte
2016

Laura Esteves Furbino

**Fungos associados à macroalgas tropicais e antárticas: taxonomia,
diversidade e utilização em processos para produção de bioetanol de
terceira geração**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em
Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Herinque Rosa

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte
2016

043

Furbino, Laura Esteves.

Fungos associados à macroalgas tropicais e antárticas: taxonomia, diversidade e utilização em processos para produção de bioetanol de terceira geração [manuscrito] / Laura Esteves Furbino. – 2016.

73 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Herinque Rosa. Co-orientador: Prof. Dr. Carlos A. Rosa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Fungos. 3. Alga Marinha. 4. Biocombustível. I. Rosa, Luiz Herinque. II. Rosa, Carlos Augusto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Prof. Carlos Augusto Rosa
Relator e Suplente: Prof. Ary Corrêa Junior
Suplente externo: Dra. Carla Pataro

Às 14:00 horas do dia 19 de setembro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Prof. Carlos Augusto Rosa - Co-Orientador (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), pela Dra. Valéria Martins Godinho (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), pela Dra. Raquel Miranda Cadete (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), pelo Dr. Mariana de Lourdes Almeida Vieira (CEFET/MG), pela Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes (CEFET/MG) e o Prof. Luiz Henrique Rosa - Orientador, para julgar o trabalho final "*Fungos associados a macroalgas tropicais e antárticas: taxonomia, diversidade e utilização em processos para a produção de bioetanol de terceira geração*", da aluna Laura Esteves Furbino, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo César Peregrino Ferreira - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de setembro de 2016.

Dra. Valéria Martins Godinho

Valéria Martins Godinho

Dra. Raquel Miranda Cadete

Raquel Miranda Cadete

Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira

Mariana de Lourdes Almeida Vieira

Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Prof. Luiz Henrique Rosa (Orientador)

Luiz Henrique Rosa

Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador

Paulo César Peregrino Ferreira

Paulo César Peregrino Ferreira

Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Microbiologia/ICB/UFMG

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer pessoas que me ajudaram, ensinaram e me apoiaram ao longo desses anos de doutorado. Foram anos de muito trabalho, estudos, lágrimas, incertezas, mas também de muito crescimento pessoal e profissional.

Obrigada, Pai, pela sua infinita grandeza!

Aos meus pais (mamis, papis, Ni), fonte de toda minha inspiração e determinação. Tudo por vocês e pra vocês.

Aos meus irmãos; Fá, Rena e Thania pela oportunidade do amor fraterno. A amizade e o apoio de vocês tornaram a caminhada mais leve.

Ao meu marido, pelo encontro de almas. Como é bom morrer de amor e continuar vivendo!

Ao meu orientador Luiz Henrique Rosa por aceitar os desafios e dificuldade de um novo projeto e linha de pesquisa, pela orientação e amizade ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador Carlos Rosa pelos ensinamentos, pelo otimismo contagiante e por acreditar junto comigo que é necessário um país mais justo e igualitário.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo disponibilizado e pelas contribuições de grande valia.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos e do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos. Somos a prova é possível conviver bem e em harmonia dentro do ambiente de trabalho.

Às curicas, pela amizade e pelas quartas de comilança e risadas sem fim.

Agradeço especialmente à Raquel Cadete, Carla Lara e Camila Gontijo, que me apoiaram, ajudaram e me orientaram muito ao longo desse trabalho. Talvez a caridade seja a melhor das virtudes.

Aos funcionários, professores e colegas do curso de Pós-graduação em Microbiologia.

À Capes pelo apoio financeiro.

“Depois da tempestade nunca mais seremos os mesmos”.

RESUMO

A diminuição das reservas de combustíveis fósseis, a instabilidade do preço do óleo e o aumento das pressões ambientais e políticas tem estimulado o uso de combustíveis produzidos a partir de biomassas renováveis. Neste panorama, a utilização da biomassa de macroalgas para produção de bioetanol tem se mostrado promissora devido à sua sustentabilidade e caráter renovável. Em vista deste panorama, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar fungos associados à macroalgas tropicais e antárticas e avaliar seu potencial quanto à capacidade de hidrolisar a biomassa algal. Da macroalga *Kappaphycus alvarezii* foram obtidos 99 fungos filamentosos e das macroalgas antárticas 19 fungos filamentosos e 35 leveduras. Após a identificação molecular, os gêneros obtidos com maior frequência foram *Cladosporium* em *K. alvarezii* e *Metschnikowia* nas macroalgas antárticas. Todos os fungos foram avaliados quanto à capacidade carragenolítica. O teste colorimétrico em placa demonstrou que uma proporção significativa de fungos filamentosos (71%) foi capaz de hidrolisar a carragenana. A hidrólise enzimática da carragenana nas condições avaliadas apresentou valor máximo de 17 U/mL a partir do crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* UFMGCB10066 em fermentação submersa. A partir do delineamento composto central foi possível determinar uma faixa ótima de cultivo para a fermentação em estado sólido deste fungo e o ponto de ótimo do modelo ajustado para todos os preditores se deu em aproximadamente 9 dias, a 10,8 °C e 77,8% de umidade. O pré-tratamento com ácido cítrico e subsequente hidrólise enzimática de *K. alvarezii* não se mostrou eficiente quando comparado aos demais trabalhos. O rendimento final do processo foi de 9,9 g/L em açúcar redutor. Este resultado mostra que seriam necessários a otimização de outros parâmetros para uma melhor hidrólise enzimática da biomassa algal por este fungo. Muitos trabalhos têm caracterizado a atividade carragenolítica de bactérias marinhas; contudo, este estudo demonstra que as algas são fonte de uma ampla diversidade de fungos capazes de hidrolisar os constituintes das paredes das macroalgas. As características bioquímicas únicas e específicas das enzimas marinhas, bem como o crescente interesse em aplicações biotecnológicas, especialmente nas indústrias de biocombustível e farmacêutica, evidencia o enorme potencial dos fungos associados às algas. O fato da descoberta de fungos filamentosos que capazes de secretar carragenase abre uma nova perspectiva para aplicação desses fungos na produção de etanol de terceira geração.

Keywords: bioethanol; macroalgae; fungi; carrageenase

ABSTRACT

The depletion of fossil fuel reserves, oil price instability and increasing environmental and political pressures have stimulated the use of fuels produced from renewable biomass. In this context, the use of biomass of macroalgae for bioethanol production has shown promise because of its sustainability and renewable character. In view of this panorama, the aims of this study were to isolate and identify fungi associated with tropical and Antarctic macroalgae and evaluate the potential of these fungi as the ability to hydrolyze the algal biomass. From the seaweed *Kappaphycus alvarezii* were obtained 99 filamentous fungi and from Antarctic macroalgae were obtained 19 filamentous fungi and 35 yeasts. After the molecular identification, the genera obtained most frequently were *Cladosporium* in *K. alvarezii* and *Metschnikowia* in Antarctic macroalgae. All fungi were evaluated for carragenolytic capability. The colorimetric test plate demonstrated that a significant proportion of filamentous fungi (71%) was able to hydrolyze carrageenan. Enzymatic hydrolysis of carrageenan under the conditions evaluated showed maximum value of 17 U/ml from the growth of *Penicillium chrysogenum* UFMGCB10066 in submerged fermentation. From the central composite design was possible to determine an optimum range of cultivation for the solid-state fermentation of the fungus and the optimal point of the model adjusted for all predictors occurred in approximately 9 days: 10.8 ° C and 77.8% humidity. Pretreatment with citric acid and subsequent enzymatic hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* was not efficient when compared to other jobs. The final yield was 9.9 g/L. This result shows that would be required to optimize other parameters for improved enzymatic hydrolysis of algal biomass by this fungus. Many studies have characterized the carragenolytic activity of marine bacteria; However, this study demonstrates that algae are a source of a wide variety of fungus capable of hydrolyzing the constituents of the walls of macroalgae. The unique and specific biochemical characteristics of the marine enzymes, as well as the growing interest in biotechnological applications, especially in the biofuel and pharmaceutical industries, shows the enormous potential of fungi associated with algae. The fact of the discovery of filamentous fungi capable of secreting carragenase opens a new perspective for the application of these fungi in the third-generation ethanol production.

Keywords: bioethanol; macroalgae; fungi; carrageenase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura básica de galactanas formadas por unidades repetidas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em α -(1 $\rightarrow$ 3) (Goh & Lee, 2010). **Pág. 6**

Figura 2 Representação das carragenanas: kappa (a), iota (b) e lambda (c) (Yao et al. 2013). **Pág. 6**

Figura 3 Coleta de *Kappahycus alvarezii* cultivadas em tanque no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. **A** Macroalgas em tanques de cultivo. **B** Amostras de *K. alvarezii*. **C** Processamentos das amostras. **Pág. 14**

Figura 4 Macroalgas antárticas coletadas em dezembro de 2013. **A** *Ascoseira mirabilis* **B** *Curdiea racovitzae* **C** *Georgiella confluens* **D** *Gigartina skottsbergii* **E** *Iridaea cordata* **F** *Palmaria decipiens*. Fotos: Franciane Pellizzari. **Pág. 16**

Figura 5 Mapas indicando as áreas de coleta, bem como as espécies de macroalgas coletadas na Península Antártica. Pontos de amostragem marcados com ▲ nas Ilhas: Rei George (Vaureal point - 62°10'49"S, 58°17'19.5" W - *Ascoseira mirabilis*, *Georgiella confluens*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*; Turret point - 62°05'092"S, 057°56'763"W – *A. mirabilis*, *I. cordata*, *G. confluens*), Robert (Coppermine Peninsula - 62°37'941"S, 59°70'400"W – *G. confluens*, *P. decipiens*), Livingston (Hannah point - 62°39'231"S, 060°36'336"W - *Curdiea racovitzae*, *Gigartina skottsbergii*) e Deception (Whales Bay - 62°46'373"S, 061°14'996"W – *I. cordata*). **Pág. 17**

Figura 6 Porcentagem de fungos algícolas associados à macroalga *Kappaphycus alvarezii* classificados por classe. **Pág. 29**

Figura 7 Árvore filogenética gerada a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank para as espécies do gênero *Cladosporium*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR 126116) foi utilizada como grupo externo. **Pág. 34**

Figura 8 Árvores filogenéticas geradas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) **(b)** e do gene da β -tubulina **(a)** em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank para as espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR 126116) foi utilizada como grupo externo. **Pág. 35**

Figura 9 Árvores filogenéticas geradas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) **(a)** e do gene da β -tubulina **(b)** em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank para as espécies do gênero *Penicillium*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR 126116) foi utilizada como grupo externo. **Pág. 36**

Figura 10 Porcentagem de fungos algícolas associados à macroalgas antárticas distribuídos por classe. **Pág. 37**

Figura 11 Halo indicativo da atividade carragenolítica de fungos algícolas. **Pág. 41**

Figura 12 Efeito do pH e temperatura na hidrólise enzimática da carragenana. Atividade expressa em U/mL. **Pág.47**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Matriz do delineamento experimental para a otimização das condições do cultivo para produção do extrato enzimático bruto. **Pág. 26**

Tabela 2 Identificação molecular dos fungos algícolas associados à macroalga *Kappaphycus alvarezii*. **Pág. 31**

Tabela 3 Número de isolados fúngicos obtidos das espécies de macroalgas amostradas. **Pág. 37**

Tabela 4 Identificação molecular de fungos algícolas associados à macroalgas antárticas. **Pág. 39**

Tabela 5 Medida dos halos hipocrômicos dos fungos carragenolíticos associados à *Kappapycus alvarezii*. **Pág. 42**

Tabela 6 Medida dos halos hipocrômicos dos fungos carragenolíticos associados às macroalgas da Antártica. **Pág. 44**

Tabela 7 Determinação da atividade volumétrica carragenolítica (U) dos fungos associados às macroalgas por meio da quantificação de D-galactose (μ g) liberada por minuto por mL. **Pág. 45**

Tabela 8 Temperatura e pH ótimos de carrageenases bacterianas de diferentes micro-organismos. **Pág. 48**

Tabela 9 Matriz do delineamento experimental com os valores reais e preditos para a atividade volumétrica carragenolítica (U/mL). **Pág. 50**

Tabela 10 Açúcares redutores totais produzidos após pré-tratamento com ácido cítrico e hidrólise enzimática. **Pág. 51**

ABREVIATURAS

%: por cento

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural

AHG: anidro-galactose

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CM: Caldo marinho

cm: centímetro

CO₂: gás carbônico

CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNS 3,5-ácido dinitrosalicílico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EAM: extração assistida por micro-ondas

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

g/L: grama por litro

g: grama

Gerais

GYMP: glicose, extrato de levedura, extrato de malte, fosfato de sódio

h: Hora

H₂O: água

HCl: Ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ITS: Região transcrita interna

M: molar

MgCl₂: cloreto de magnésio

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: nanograma

ng: nanograma

°C: graus Celsius

p/v: peso por volume

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

r.p.m.: Rotações por minuto

rDNA: DNA ribossomal

rRNA: RNA ribossomal

s: Segundo

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TBE: Tris borato

U: Unidade

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMGCB : Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas

UTD: unidades taxonômicas distintas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E O PANORAMA ATUAL DA ENERGIA NO MUNDO	15
2.2 FONTES RENOVÁVEIS DE ENERGIA: BIOCOMBUSTÍVEIS.....	15
2.2.1 BIOETANOL	16
2.3 MACROALGAS: FONTE DE BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL	18
2.3.1 Classificação das macroalgas e composição da biomassa algal.....	18
2.4 PRODUÇÃO DO ETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO.....	21
2.4.1 Pré-tratamento da biomassa algal	21
2.4.2 Hidrólise da biomassa algal.....	21
2.4.3 Fermentação microbiana.....	23
2.5 ENZIMAS MICROBIANAS: CARRAGENASES	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	30
4.1.1 Isolamento e preservação dos fungos associados à macroalgas.....	30
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	30
4.2.1 Extração do DNA total dos fungos filamentosos.....	31
4.2.2 Extração do DNA total das leveduras	32
4.2.3 PCR com iniciador (GTG) ₅	32
4.2.4 Obtenção dos amplicons.....	31
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARRAGENOLÍTICA DOS ISOLADOS	36
4.3.1 Seleção de fungos produtores de carragenases	36
4.3.2 Produção do extrato enzimático bruto de carragenase.....	36
4.3.3 Determinação da atividade volumétrica carragenolítica	36
4.4 PRODUÇÃO DE CARRAGENASE POR <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i>	36
4.4.1 Determinação da temperatura ótima e pH ótimo de reação da carragenase.....	36
4.4.2 Otimização das condições de cultivo para produção do extrato enzimático bruto da carragenase	25
4.5 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA ALGAL	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ALGÍCOLAS ASSOCIADOS A	

5.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ALGÍCOLAS ANTÁRTICOS.....	48
5.3	SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE CARRAGENASES	52
5.4	PRODUÇÃO DE CARRAGENASE POR <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i>	58
5.4.1	Efeito do pH e temperatura na reação enzimática.....	58
5.4.2	Otimização das condições de cultivo de <i>P. chrysogenum</i> UFMGCB10066 para produção do extrato enzimático bruto da carragenase.....	59
5.4.3	Pré-tratamento com ácido cítrico e hidrólise enzimática.....	62
6	CONCLUSÕES.....	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 Introdução

O desenvolvimento industrial e o aumento na demanda por energia são dependentes, atualmente, da utilização de fontes de energia provenientes de reservas fósseis não -renováveis. Essas fontes, além de finitas, contribuem para a formação do efeito estufa, imp acto ambiental responsável em grande parte pelo aumento da temperatura global. Uma alternativa à utilização de combustíveis fósseis é a utilização de biomassa vegetal e afins, as quais representam uma fonte abundante e renovável de energia.

Neste contexto, as macroalgas podem representar uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustível devido à sua rápida taxa de crescimento e grande produção de biomassa, com produtividade superior a muitas espécies vegetais terrestres. O rendimento de biomassa elevado das macroalgas é atribuído à menor necessidade de energia para a produção de tecidos de suporte em comparação com as plantas terrestres. As macroalgas são capazes de absorver nutrientes por toda sua superfície, poupando, desta forma, a energia requisitada para o transporte interno de substâncias. Além disso, em geral as macroalgas possuem maior teor de carboidratos hidrolisáveis, e conseqüentemente, maior potencial para a produção de etanol que as matérias-primas normalmente utilizadas.

Desta forma, torna-se relevante aperfeiçoar processos fermentativos a partir de biomassas alternativas às convencionais para produção de etanol. Neste panorama, este projeto tem como objetivo isolar e identificar fungos filamentosos associados a macroalga que sejam capazes de produzir enzimas capazes de degradar eficientemente este substrato, disponibilizando açúcares simples para a fermentação.

2 Revisão de literatura

2.1 Combustíveis fósseis e o panorama atual da energia no mundo

Desde o início da revolução industrial os combustíveis fósseis (o carvão mineral, gás natural e o petróleo) têm sido a força motriz por trás do mundo industrializado e seu crescimento econômico (Höök & Tang 2013). Atualmente, cerca de 80% de toda a energia primária no mundo é derivada destes combustíveis e mais de 50% é utilizada no setor dos transportes (Höök & Tang 2013). Sabendo-se que os combustíveis fósseis são recursos naturais finitos e não renováveis, e que as estimativas apontam para esgotamento dessas fontes de energia nos próximos 20-30 anos (Höök & Tang 2013), pode-se considerar a existência de uma iminente crise energética mundial.

Além do problema do esgotamento dos recursos e instabilidade do mercado, existe uma preocupação relativa às emissões de poluentes e gases de efeito estufa (Goldemberg 2007). A combustão proveniente deste tipo de combustível gera uma quantidade significativa de gás carbônico (CO₂) e outros gases, conhecidos por contribuir com o aumento da temperatura do planeta. Como resultado, o planeta vem sofrendo mudanças climáticas, tais como alterações na intensidade e distribuição das chuvas, elevação do nível dos oceanos e aumento da frequência e intensidade dos fenômenos climáticos extremos (Goldemberg 2007). A partir dessa problemática há um consenso que as estratégias necessárias para tornar um modelo energético viável devem levar em conta a sustentabilidade, a otimização dos processos para reduzir custos e danos ambientais e o aumento da contribuição das fontes de energia renováveis (Rodrigues 2012).

2.2 Fontes renováveis de energia: biocombustíveis

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, os “biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis originados de petróleo e gás natural em motores à combustão ou outro tipo de geração de energia” (www.anp.gov.br). Os biocombustíveis mais comuns são: (i) bioetanol, obtido principalmente a partir de cana, milho e beterraba; (ii) biodiesel, produzido a partir de uma variedade de culturas, tais como óleos de soja e palma; (iii) singás, produzido a partir da “gaseificação do carvão”; e o (iv) biogás, nome dado a um combustível gasoso obtido pela digestão anaeróbia de compostos orgânicos (Somma et al. 2009; Gasparatos et al. 2013). O bioetanol e o biodiesel são mais utilizados para fins de transporte (Gasparatos et al. 2013).

Os biocombustíveis derivados de produtos da agricultura alimentícia como grãos, cana de açúcar e óleo vegetal são conhecidos como de primeira geração (Taylor 2008; Mohr & Raman 2013). Os principais impactos socioeconômicos e ambientais em relação aos atuais biocombustíveis de primeira geração incluem a segurança alimentar e preço dos alimentos (Gasparatos et al. 2013; Lee & Lavoie 2013; Mohr & Raman 2013). O aumento da capacidade de produção compete com a agricultura e pecuária por terras utilizadas na produção de insumos alimentícios e pode levar à grave escassez de alimentos, em particular para os países em desenvolvimento, onde a fome e a desnutrição são um grande problema social. Outros impactos incluem o desmatamento de reservas ambientais, além das emissões dos gases causadores do efeito estufa, a poluição atmosférica, a poluição e o consumo das águas, a perda de biodiversidade, entre outros (Rodrigues 2012).

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir da biomassa lignocelulósica, que não é voltada para a produção de alimentos, não estabelecendo um conflito direto com a segurança alimentar (Lee & Lavoie 2013; Mohr & Raman 2013). As fontes para biocombustíveis incluem resíduos agrícolas, resíduos florestais ou de colheita, tais como folhas, palhas ou lascas de madeira, assim como os componentes não comestíveis de milho ou cana de açúcar (Taylor 2008; Brennan & Owende 2010; Naik et al. 2010; Cadete et al. 2014). Os biocombustíveis de segunda geração ainda não atingiram níveis competitivos comparáveis com o etanol de primeira geração (Taylor 2008; Brennan & Owende 2010; Naik et al. 2010; Cadete et al. 2014). Já os biocombustíveis de terceira geração incluem aqueles derivados de alga, como biodiesel de óleo de microalgas, bioetanol de micro e macroalgas e o hidrogênio de microalgas verdes e micro-organismos (Dragone et al. 2010; Lee and Lavoie 2013). A viabilidade econômica do bioetanol de terceira geração assim como o de segunda geração depende da conversão eficaz da biomassa em açúcares fermentáveis e sua utilização completa por micro-organismos, bem como uma série de barreiras técnicas a serem superadas.

2.2.1 Bioetanol

O etanol é um produto com diversas aplicações no mercado e largamente utilizado como combustível automotivo na forma hidratada ou misturado à gasolina (Goldemberg, 2008). No Brasil, o etanol a partir de cana de açúcar começou a ser produzido em grande escala em 1975 devido ao incentivo do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) (Goldemberg, 2008). Hoje o país é o segundo maior produtor de etanol do mundo e líder mundial na produção de etanol a partir de

cana de açúcar (<http://ethanolrfa.org>). Em conjunto, Brasil e Estados Unidos lideram a produção do etanol no mundo. Em 2015, o Brasil foi responsável por 28% da produção mundial de etanol, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que produziram 57% (<http://ethanolrfa.org>, acessado em maio de 2016).

Enquanto combustível, o etanol apresenta características vantajosas quando comparado com a gasolina, dentre as quais se destacam: (i) possui um calor latente de vaporização superior, o que se traduz numa maior eficiência energética do motor; (ii) apresenta baixa toxidez, elevada biodegradabilidade e alto teor de oxigênio, possibilitando uma combustão mais limpa e eficaz (Aquino et al. 2014); além disso, (iii) pode ser produzido a partir de diferentes tipos de biomassa, como biomassas ricas em açúcar ou amido, que requerem pouco ou nenhum pré -tratamento anteriormente à etapa de fermentação, e a biomassa lignocelulósica que, devido à sua elevada complexidade, requer pré-tratamentos para a liberação dos açúcares (Ogbonna et al. 2001). Após a disponibilização dos açúcares simples, os micro-organismos podem fermentá-los e produzir etanol.

Apesar da produção de bioetanol a partir de milho e cana de açúcar estar bem estabelecida, o potencial de difusão dos biocombustíveis de primeira geração é limitado (Searchinger et al. 2008). A sua sustentabilidade varia de acordo com a matéria-prima utilizada devido a competição por terras agricultáveis e os elevados custos de processamento que frequentemente necessitam de subsídios governamentais (Searchinger et al. 2008). Para diminuir o custo na produção do etanol a fim de tornar o produto mais competitivo em relação aos combustíveis fósseis, e também sanar os problemas relativos à competição por terras cultiváveis, é necessário substituir as culturas tradicionais pelo uso de substratos menos onerosos e mais abundantes. Uma alternativa é a produção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos (etanol de 2^a geração). Diferentemente do etanol de primeira geração, o celulósico necessita de um pré-tratamento físico-químico, utilizando-se agentes ácidos, básicos ou solventes, para disponibilizar a celulose e hemicelulose às enzimas hidrolíticas (Mosier et al. 2005). No processo seguinte, os carboidratos componentes da celulose e hemicelulose são hidrolisados para formar monossacarídeos e fermentados por micro-organismos para a produção do etanol (Mosier et al. 2005). Apesar das vantagens do etanol de 2^a geração sobre o de 1^a, os custos da hidrólise enzimática ainda são muito elevados e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizada nos processos fermentativos na indústria, não possui a capacidade de fermentar alguns sacarídeos derivados das biomassas celulósica e hemicelulósica, tornando a produção, até o momento, não competitiva em comparação com a do

etanol sacarídeo e a gasolina (Cadete et al. 2014). Neste contexto, o bioetanol de 3ª geração produzido a partir da biomassa algal constitui uma alternativa aos combustíveis fósseis com vantagens de produção em relação ao etanol de 1ª e 2ª geração.

2.3 Macroalgas: fonte de biomassa para a produção de bioetanol

As macroalgas têm sido investigadas como uma fonte renovável potencial para a produção de bioetanol (Wi et al. 2009; Mutripah et al. 2013), pois, além de não competirem com as culturas terrestres destinadas à alimentação e não necessitarem de água continental para o cultivo, apresentam uma rápida taxa de crescimento e eficiência fotossintética e produtividade maiores que as biomassas terrestres, sendo viáveis mais de cinco colheitas ao ano (John et al. 2011; Jung et al. 2013; Mutripah et al. 2013; Schultz-Jensen et al. 2013). A biomassa algal é rica em açúcares (pelo menos 50%) e a lignina e hemicelulose são ausentes (Adams et al. 2008; Wi et al. 2009; Jang et al. 2012; Wei et al. 2013), o que reduz tempo, custo e dificuldades do processo (Harun et al. 2014). O elevado rendimento das macroalgas é atribuído à menor energia exigida na produção de tecidos de suporte do que nas plantas terrestres, além da capacidade de absorver nutrientes em toda a superfície do talo, poupando energia para o transporte interno de nutrientes (Wi et al. 2009). Em outras palavras, as macroalgas produzem rapidamente biomassa por meio da assimilação de recursos naturais abundantes tais como água do mar, energia solar e dióxido de carbono (Wei et al. 2013). Além disso, do ponto de vista ecológico e ambiental, as macroalgas contribuem para a diminuição do dióxido de carbono na atmosfera, fornecem oxigênio para o ambiente marinho e algumas são capazes de remover metais pesados da água, além de sua produção não acarretar na contaminação do ambiente com fertilizantes provenientes do cultivo (Goh & Lee 2010; Hargreaves et al. 2013).

2.3.1 Classificação das macroalgas e composição da biomassa algal

As macroalgas são divididas em três grandes grupos de acordo com a cor do talo derivado de pigmentos e clorofilas: Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta (Ragan et al. 1994; Jung et al. 2013). As algas verdes pertencem às Chlorophyta e a composição química é similar às plantas terrestres; as Phaeophyta apresentam clorofila *a*, xantofilas e carotenos como pigmentos fotossintéticos; as Rhodophyta formam uma das principais linhagens monofiléticas dentro dos eucariotos e apresentam caracteres químicos, ultra-estruturais e reprodutivos que as separam de outros grupos de algas (Ragan et al. 1994; Jung et al. 2013). As espécies de Rhodophyta possuem

clorofila *a*, pigmentos acessórios (ficocianina e ficoeritrina) e pigmentos fotoprotetores (carotenóides); além disso, produzem o amido das florídeas (polissacarídeo de reserva) que é depositado no citoplasma. As espécies são predominantemente marinhas e tropicais (Jung et al. 2013) As Rhodophyta são filogeneticamente a divisão mais antiga das macrófitas marinhas e diferem muito das plantas terrestres em relação à composição de polissacarídeos (Usov, 1998).

Os polissacarídeos estruturais da parede celular das algas consistem geralmente em uma matriz externa amorfa mucilaginosa, que é constituída por galactanas lineares sulfatadas, tais como as carragenanas, agaranas e alginatos, além do componente rígido interno formado pelas fibras de celulose (Abd-Rahim et al. 2014). Em todas as espécies estudadas, os principais açúcares dos polímeros são xilose, glicose e galactose, encontradas em diferentes proporções, dependendo das espécies (Abd-Rahim et al. 2014). Açúcares secundários, tais como açúcares metilados, manose, arabinose e ribose também são detectados (Abd-Rahim et al. 2014).

Carragenana é um nome genérico dado às galactanas sulfatadas lineares extraídas de diversas espécies de Rhodophyta, principalmente daquelas pertencentes aos gêneros *Euchema* e *Kappaphycus* (Henares et al. 2010; Meinita et al. 2011). As galactanas sulfatadas possuem estruturas heterogêneas, variáveis de acordo com as espécies de algas, etapa do ciclo de vida e o processamento (Henares et al. 2010; Meinita et al. 2011). Algumas espécies do grupo são cultivadas como fonte de alimento ou para a extração de hidrocolóides (“gomas”) (Henares et al. 2010; Meinita et al. 2011), os quais são empregados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de cosméticos devido às propriedades emulsificante, espessante, estabilizante e gelificante (Jouanneau et al. 2010; Liu et al. 2013; Yao et al. 2013). Na macroalga, a carragenana é um dos principais componentes da parede celular e possui função estrutural análoga à celulose em plantas terrestres (Goh & Lee, 2010). A carragenana consiste em copolímeros de ésteres, sódio, cálcio, magnésio, sulfato de amônio, D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligados alternadamente em α (1,3) e β (1,4) (Goh & Lee, 2010) (Figura 1).

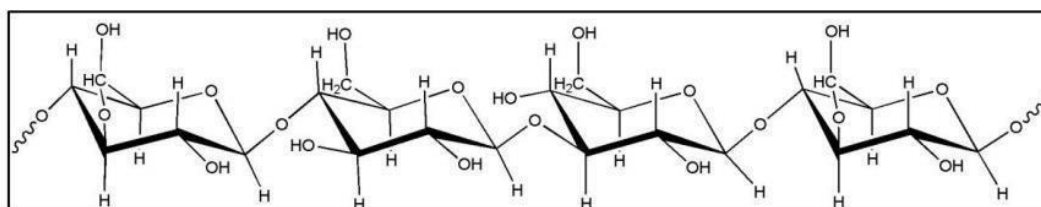


Figura 1 Estrutura básica de galactanas formadas por unidades repetidas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em α -(1→3) (Goh & Lee, 2010).

Na forma nativa, as carragenanas apresentam peso molecular de mais de 100 kDa (Henares et al. 2010). Existem três tipos de carragenanas comerciais, kappa, lambda e iota que podem ser distinguidas dependendo da quantidade de 3,6 anidro-D-galactose, e do grau de sulfatação (Yao et al. 2013) (Figura 2), os quais determinam as propriedades de gelificação dos hidrocolóides (Henares et al. 2010). Embora a carragenana seja utilizada na indústria, estudos tem revelado que os oligossacarídeos derivados deste polissacarídeo apresentam atividades antitumorais e antivirais (Tayco et al. 2013).

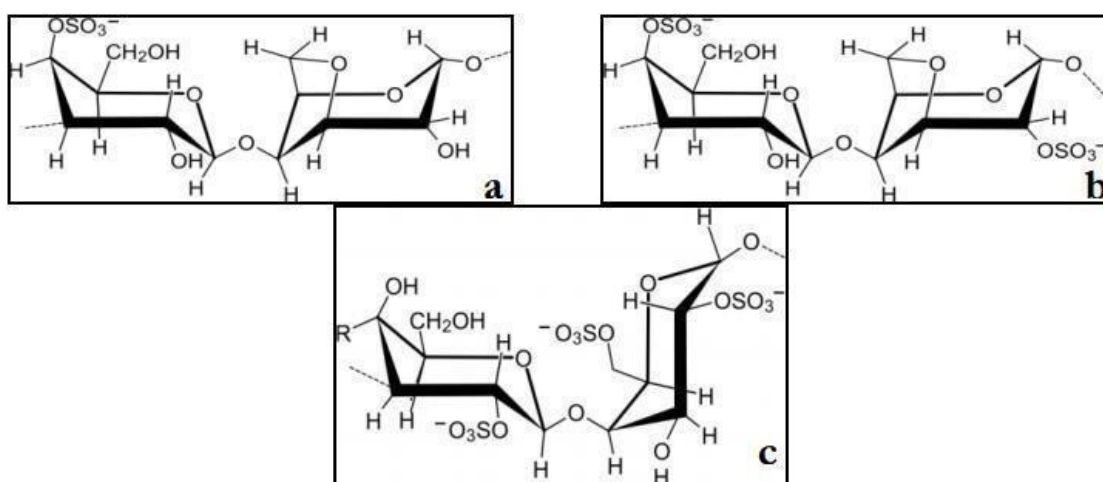


Figura 2 Representação das carragenanas: kappa (a), iota (b) e lambda (c) (Yao et al. 2013).

Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex P. Silva é uma das espécies de rodófitas mais importantes comercialmente devido à produção de carragenana (Ateweberhan et al. 2015; Terada et al. 2015). Possui mais de 60% de carboidratos em sua composição, sendo a carragenana o principal constituinte. A concentração desses polissacarídeos tem variação de acordo com a época de cultivo, pois a temperatura, salinidade e maré são fatores de grande impacto no crescimento e composição das algas, influenciando principalmente na quantidade e concentração dos diferentes tipos de carragenana (kappa, iota, lambda) (De Faria et al. 2013).

Kappaphycus alvarezii, nativa das Filipinas, teve o cultivo comercial estabelecido nesse país nos anos de 1970 e hoje é amplamente cultivada em várias regiões tropicais, incluindo África, Sudeste Asiático, América Central e América do Sul (Ask et al. 2003; Hayashi et al. 2010). O cultivo é desenvolvido em baixo custo de capital inicial e operacional e com mão de obra pouco especializada e não necessita de altos investimentos (Hayashi et al. 2010). No Brasil, *K. alvarezii* foi introduzida em 1995 em Ubatuba, São Paulo, com aprovação do Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a fim de avaliar a viabilidade comercial e os impactos ambientais do cultivo no litoral brasileiro (Hayashi et al. 2010). Diversos estudos foram realizados desde a introdução no litoral paulista e evidenciaram características favoráveis ao cultivo desta espécie. Destacam-se a adaptação da espécie na região, altas taxas de crescimento, alto teor de carragenana e, em contrapartida, não foram observados indícios de riscos ambientais, sugerindo a possibilidade de cultivo da espécie em grande parte do litoral brasileiro (Hayashi et al. 2010). Além do potencial para produção de etanol, o cultivo de algas pode ter um forte impacto socioeconômico em regiões onde tem ocorrido um declínio da pesca comercial, possibilitando uma nova fonte de renda aos pescadores e suas famílias. Além disso, pode proporcionar refúgio e alimento para outras espécies e diminuir a eutrofização pela associação com outras culturas aquáticas tais como bivalves e peixes (Paula & Pereira 1998; Neori et al. 2004, Pellizzari & Reis, 2011).

2.4 Produção do etanol de terceira geração

Apesar das vantagens ambientais e econômicas, muitos desafios ainda existem para a utilização eficaz da biomassa algal na produção de bioetanol. Um dos desafios é que as macroalgas têm composição química única em relação aos seus carboidratos (Tan & Lee 2014). Além do ágar, carragenana, amido e celulose, também podem conter manitol e laminarina, as quais são muito distintas da biomassa vegetal terrestre. Devido a esta diferença, os métodos utilizados para a obtenção de bioetanol a partir da biomassa vegetal terrestre não podem ser diretamente aplicados à biomassa algal (Tan & Lee 2014). Portanto, desenvolver métodos e técnicas apropriadas com base nas propriedades da biomassa algal é essencial (Cho et al. 2013).

2.4.1 Pré-tratamento da biomassa algal

O pré-tratamento é comumente utilizado para otimizar a sacarificação enzimática, uma vez que torna o polissacarídeo mais acessível à ação enzimática e aumenta a solubilidade do substrato em água (Meinita et al. 2013; Kim et al. 2014). A quantidade mais baixa ou existência de lignina em algas vermelhas faz com que o pré-tratamento seja mais fácil e menos dispendioso do que o da lignocelulose (Sambusiti et al. 2015; Yun et al. 2016). Atualmente, os métodos de pré-tratamento mais comumente utilizados para algas são físicos, hidrotérmicos e químicos (Sambusiti et al. 2015). O pré-tratamento físico é considerado como um dos métodos mais eficazes porque aumenta a acessibilidade do substrato às enzimas ao aumentar a superfície de contato.

Os métodos físicos de pré-tratamento de algas vermelhas podem ser divididos em moagem e extração assistida por micro-ondas (Sambusiti et al. 2015; Yun et al. 2016). Para moagem, as algas são lavadas, em seguida, secas e cominuídas (Jung et al. 2011). O pré-tratamento de moagem permite que os carboidratos contidos na parede celular sejam expostos a catalisadores químicos ou enzimáticos durante a hidrólise (Yun et al. 2016). A extração assistida por micro-ondas (EAM) é altamente eficaz para as macroalgas vermelhas devido ao seu teor relativamente elevado de água, o que permite que o calor interno gerado por irradiação por micro-ondas provoque a ruptura e desagregação das células e induza a exposição dos carboidratos à fase aquosa (Vazquez-Delfin et al. 2014). As principais vantagens do processo são: a redução do consumo de solventes, de energia e do tempo de extração, mas que atualmente é comercialmente inviável, pois apenas um volume limitado de algas pode ser processado.

O pré-tratamento mais utilizado é o tratamento hidrotérmico ácido ou alcalino. Em alguns casos, o tratamento com ácido diluído (<5%) é considerado como pré-tratamento e em outros, é chamado de hidrólise ácida (Jiang et al. 2016). A denominação é normalmente determinada pelo desenho do processo já que em alguns casos o tratamento hidrotérmico é seguido por degradação enzimática. No processo de tratamento hidrotérmico a combinação da acidez e da temperatura funciona como catalisador para quebrar a cadeia do polissacarídeo. O tratamento hidrotérmico é relativamente simples, mas tem como inconveniente a formação de subprodutos tóxicos para a fermentação, tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e ácido levulínico (Ge et al. 2011; Kim et al. 2013; Jiang et al. 2016).

2.4.2 Hidrólise da biomassa algal

As opções básicas parahidrólise de algas incluem hidrólise ácida/ou hidrólise enzimática. Os carboidratos de todas as três classes de macroalgas (Chlorophyta, Phaeophyta, Rhodophyta) podem ser eficazmente hidrolisados por tratamento ácido (Jang et al. 2012; Wei et al. 2013). Na hidrólise ácida, a frequente degradação dos açúcares e a formação de inibidores recalcitrantes no processo fermentativo têm sido as principais desvantagens deste tipo de hidrólise. A degradação de açúcares gera subprodutos como furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), conhecidos inibidores da fermentação; as quantidades produzidas são em grande parte dependentes das condições da reação tais como temperatura, concentração de ácido e tempo de hidrólise (Jang et al. 2012; Wei et al. 2013; Wu et al. 2014). Geralmente, quanto mais severa as condições utilizadas na reação, mais inibidores e menos açúcares fermentáveis são produzidos; assim, o ajuste

cuidadoso das condições de hidrólise é uma etapa crucial para a eficiência da produção (Wu et al. 2014).

Apesar dos processos ácidos serem relativamente satisfatórios, a hidrólise enzimática é uma abordagem mais eficaz para liberação dos açúcares fermentáveis, pois fornece uma utilização mais eficiente dos carboidratos, uma vez que as enzimas apresentam especificidade de ação sobre o substrato evitando assim a formação de produtos inibidores (Adsul et al. 2005; Tan & Lee 2014). Apesar de vantajosa, o custo dos tratamentos enzimáticos é alto devido ao alto valor comercial das enzimas (Adsul et al. 2005). De acordo com Farinas et al. (2010), o desenvolvimento de processos eficientes e otimizados para a produção de enzimas em escala industrial é fundamental para garantir a viabilidade econômica e concretização da produção de etanol de terceira geração.

2.4.3 Fermentação microbiana

Embora existam micro-organismos capazes de fermentar os açúcares provenientes das algas, a produção economicamente viável de biocombustíveis a partir dessa biomassa requer uma conversão mais completa e eficiente por linhagens robustas (Yun et al. 2014; Yun et al. 2016). Entre os principais açúcares encontrados nas rodófitas (D-galactose, anidro-galactose/AHG, e D-glicose), AHG juntamente com D-galactose são os açúcares mais abundantes sendo que a AHG não pode ser fermentada por micro-organismos comumente utilizados nos processos fermentativos, como *Escherichia coli* e *S. cerevisiae* (Yun et al. 2014; Yun et al. 2016). Presume-se que a via metabólica só exista nas bactérias marinhas. Recentemente, uma nova via catabólica para AHG foi descoberta na bactéria marinha *Vibrio* sp. EJY3, que é capaz de utilizar AHG como uma fonte única de carbono. Apesar AHG ser um açúcar raro e não encontrado em plantas terrestres, seu metabolismo é relativamente simples (Yun et al. 2014).

Embora *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar galactose em etanol, há duas questões importantes que limitam o rendimento e produtividade (Lee et al. 2011; Wei et al. 2013): (i) a taxa de produção de etanol a partir da galactose é consideravelmente inferior a de glicose; (ii) a presença da glicose reprime a utilização de galactose por causa da repressão dos genes *GAL* que codificam enzimas para metabolismo da galactose. Estes dois problemas conduzem a um consumo diáuxico de glicose e galactose no hidrolisado (Wei et al. 2013). Galactose e glicose diferem molecularmente no carbono 4, no qual o grupo hidroxila possui orientação oposta em cada um dos compostos. Apesar dos sistemas de metabolismo desses açúcares serem parecidos, a galactose usa um frágil transportador protéico e uma complexa sequência de fosforilação, transporte e

epimerização, antes da glicólise (Bro et al. 2005). A utilização de galactose em *S. cerevisiae* é mediada pela via de Leloir na qual a galactose é fosforilada a galactose-1-fosfato por galactocinase (*GAL1*) e depois isomerizada a glicose-1-fosfato pela galactose-1-fosfato uridiltransferase (*GAL7*). Fosfoglicomutase e fosfomanomutase (*GAL5 / PGM2*) convertem a glicose-1 fosfato em glicose-6-fosfato, que pode entrar tanto para a via glicolítica tanto para a via das pentoses fosfato (Bro et al. 2005).

Os principais reguladores de transcrição dos genes *GAL* dessa via são *GAL4* e *GAL80*, que são fortemente reprimidos na presença de glicose, impedindo a produção de todos os genes relacionados à assimilação e transformação da galactose (Goh & Lee 2010). A *GAL4* é o ativador do gene, enquanto a *GAL80* é o regulador negativo, que na presença de glicose forma proteínas que se acoplam a porção terminal da *GAL4* (Goh & Lee 2010).

Apesar da glicose ser a fonte de carbono preferencial, a adaptação celular leva a alterações no mecanismo de regulação nas células. As células de leveduras adaptadas em meio contendo galactose aumentam a absorção simultânea de galactose e outros açúcares como a glicose e frutose na fermentação (Dhaliwal et al. 2011). A utilização de galactose requer a repressão de glicose por uma multiplicidade de genes envolvidos na captação do açúcar quando as células não estão adaptadas ao meio contendo galactose (Dhaliwal et al. 2011).

A concentração de sal também é um fator importante para a produção de etanol de algas marinhas, onde elevadas concentrações de NaCl são encontradas devido à origem marinha da biomassa, o qual pode constituir um inibidor, resultando na redução da multiplicação celular e no rendimento da fermentação. Se a concentração de sal é maior do que a condição ideal de leveduras na fermentação de algas, os sais podem inibir o processo de fermentação com baixa produção de etanol (Cho et al. 2013).

2.5 Enzimas microbianas: carragenases

Nos últimos anos, com o avanço da biotecnologia e a crescente demanda por biocatalisadores que possam suportar as condições do processo industrial, consideráveis esforços estão sendo dedicados à procura por enzimas com novas propriedades (Van Den Burg 2003; Zhang & Kim 2010). Apesar das enzimas serem encontradas em abundância em plantas e animais, as de origem microbiana representam a fonte mais atraente para obtenção devido à ampla diversidade estrutural, variedade de atividades catalíticas disponíveis, facilidade de manipulação genética, rendimentos elevados e fornecimento regular (Buzzini & Martini 2002; Zhang & Kim 2010;

Kasana & Gulati 2011). Enzimas microbianas também podem ser mais estáveis, com produção relativamente mais conveniente e segura (Kasana & Gulati 2011).

Alguns trabalhos recentes têm destacado o potencial de ambientes extremos e não convencionais como habitat e fonte de micro-organismos úteis para a indústria (Kasana & Gulati 2011). Neste panorama, a complexidade dos ambientes marinhos envolvendo alta salinidade, alta pressão e alta incidência de radiação UV podem contribuir para diferenças significativas e características fisiológicas únicas entre as enzimas geradas por micro-organismos marinhos e seus homólogos terrestres (Zhang & Kim 2010).

As enzimas denominadas carragenases possuem especificidade para os substratos carragenanas (Ruiter and Rudolph 1997). Até o momento, as carragenases foram obtidas a partir de várias bactérias marinhas, pertencentes aos gêneros *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (Ruiter and Rudolph 1997; Liu et al. 2013; Ma et al. 2013; Yao et al. 2013), sendo *Pseudoalteromonas carrageenovora* o micro-organismo mais estudado. Até o momento, não existe relato na literatura acerca da caracterização de carragenases de origem fúngica.

As carragenases que têm sido descritas possuem como substrato principal kappa-carragenana ou iota-carragenana e têm distinções em termos de estrutura primária, características enzimáticas e produtividade. (Ruiter and Rudolph 1997; Liu et al. 2013; Ma et al. 2013; Yao et al. 2013). Estas enzimas pertencem às famílias GH16 e GH82, respectivamente, e clivam as ligações internas β -1,4 da carragenana. A digestão por carragenases gera oligo-galactanas de vários tamanhos, com um grau de polimerização (GP)- número de unidades estruturais repetidas- de 2, 4 e 6 (Babeyron et al. 2005; Rhein-Knudsen et al. 2015). A razão para a produção de diferentes GP é resultado da estrutura heterogênea da carragenana e os mecanismos de ação das enzimas. As ligações alternadas α -1,3 e β -1,4 resultam em ligações sucessivas β -1,4 em orientações opostas e, portanto, somente o segundo dissacarídeo está na posição certa para a clivagem (Babeyron et al. 2005; Rhein-Knudsen et al. 2015).

No caso da macroalga *K. alvarezii*, que apresenta mais de 60% de carragenana, sendo em sua maioria k-carragenana, a hidrólise enzimática deste substrato poderá otimizar o aproveitamento da biomassa para a produção de bioetanol. Além disso, os oligossacarídeos produzidos a partir da degradação da carragenana são promissores para aplicações fisiológicas e biomédicas, impulsionando a busca por novos micro-organismos produtores de enzimas que viabilizem a aplicação biotecnológica e industrial destas substâncias.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Isolar e identificar fungos associados à macroalgas de ambientes tropical e antártico e testá-los quanto à capacidade de hidrolisar a biomassa algal para potencial uso na produção de bioetanol de terceira geração.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos a partir de fragmentos dos talos de macroalgas tropicais e antárticas;
- Purificar todos os fungos obtidos e depositá-los na Coleção de Cultura de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais para montagem de uma coleção temática de fungos produtores de enzimas de interesse industrial;
- Identificar todos os fungos por meio de técnicas de taxonomia polifásica (morfológica, fisiológica e molecular);
- Selecionar fungos produtores de carragenase e potencialmente capazes de hidrolisar a carragenana da biomassa algal;
- Avaliar a atividade carragenolítica dos fungos selecionados em meio semi-sintético e na biomassa algal por meio da quantificação dos açúcares redutores;
- Otimizar as condições de cultivo do melhor fungo selecionado para produção do extrato enzimático bruto da carragenase por meio do delineamento composto central rotacional;
- Produzir o hidrolisado de *Kappaphycus alvarezii* por meio da hidrólise enzimática após pré-tratamento com ácido cítrico.

4 Materiais e métodos

4.1 Coleta e processamento das amostras

A coleta de *K. alvarezii* foi realizada na cidade de Florianópolis/SC, Brasil, em março de 2013. As macroalgas foram coletadas em tanques de cultivo do Laboratório de Camarões Marinhos/UFSC (**Figura 3, B**) gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Leila Hayashi. O cultivo das algas no laboratório é realizado em tanques de polietileno de volume útil de 100 L, com 80 L de água do mar esterilizada por uma sequência de filtros de cartucho e seguida por esterilização com lâmpada UV, em fotoperíodo natural e temperatura média de 22 °C. Os talos das macroalgas foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados, devidamente identificados e conduzidos para processamento no Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos da Universidade Federal

de Minas Gerais em um período máximo de horas.



Figura 3 Coleta de *Kappahycus alvarezii* cultivadas em tanque no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. (A) Amostras de *K. alvarezii*, (B) Macroalgas em tanques de cultivo (C) Processamentos das amostras.

A segunda coleta foi realizada em dezembro de 2013, na Antártica. A Antártica é o continente mais meridional do planeta, localizado quase inteiramente dentro do Círculo Polar Antártico e compreende um dos ambientes mais extremos da Terra (Child & Kelly 1990; Ferreira 2009). É um continente remoto e o clima é o mais frio e seco conhecido no planeta (Child & Kelly 1990; Ferreira 2009). O continente Antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e climático e a maior parte possui pouca ou nenhuma influência antrópica (Ruisi et al. 2007; Brunati et al. 2009). As condições que prevalecem são de baixas temperaturas, ciclos de congelamento e degelo, alta incidência de radiação ultravioleta, baixa precipitação anual, fortes ventos e baixa disponibilidade de água (Onofri et al. 2007; Ruisi et al. 2007; Shivaji & Prasad 2009), fatores considerados limitantes para a vida (Onofri et al. 2007). Apesar das condições extremas encontradas, diferentes formas de vida estão presentes no continente Antártico como bactérias, fungos, invertebrados, aves e mamíferos (Ruisi et al. 2007; Rosa et al. 20010; Shivaji & Prasad 2009). A flora antártica é considerada primitiva e as condições climáticas e a pouca espessura do solo dificultam a sobrevivência da maioria dos vegetais. Por outro lado, o ambiente marinho é ideal para proliferação de algas (Bischoff, 1996).

Foram coletadas amostras das macroalgas *Ascoseira mirabilis* (Phaeophyta), *Curdiea racovitzae* (Rhodophyta), *Georgiella confluens* (Rhodophyta), *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta), *Iridaea cordata* (Rhodophyta) e *Palmaria decipiens* (Rhodophyta) (**Figura 4**). As amostras de macroalgas foram coletas nas ilhas Rei George, Robert, Livingston e Deception (**Figura 5**), armazenadas em sacos plásticos e processadas no Laboratório Úmido do Navio Polar Oceanográfico Comandante Maximiliano.

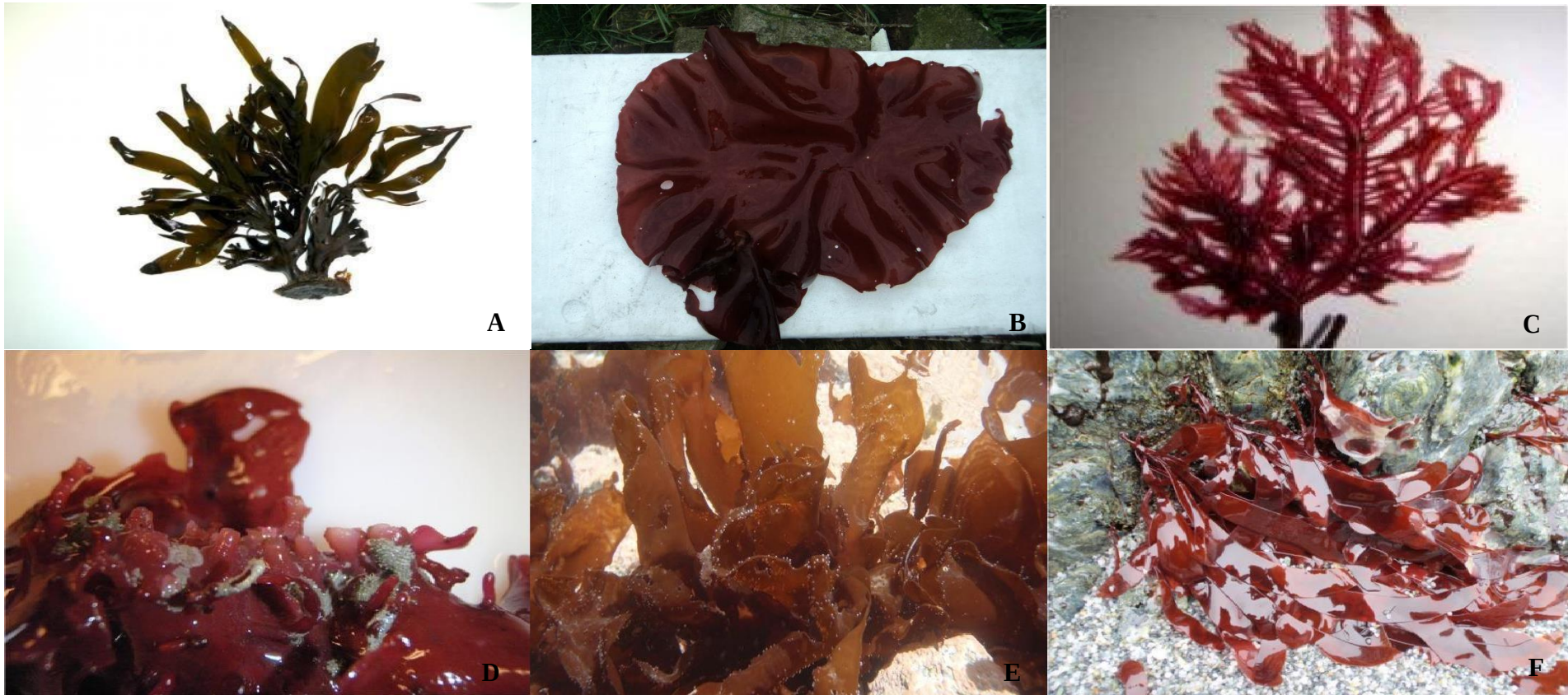


Figura 4 Macroalgas antárticas coletadas em dezembro de 2013. (A) *Ascoseira mirabilis* (B) *Curdiea racovitzae* (C) *Georgiella confluens* (D) *Gigartina skotsbergii* (E) *Iridaea cordata* (F) *Palmaria decipiens*. Fotos: Franciane Pellizzari

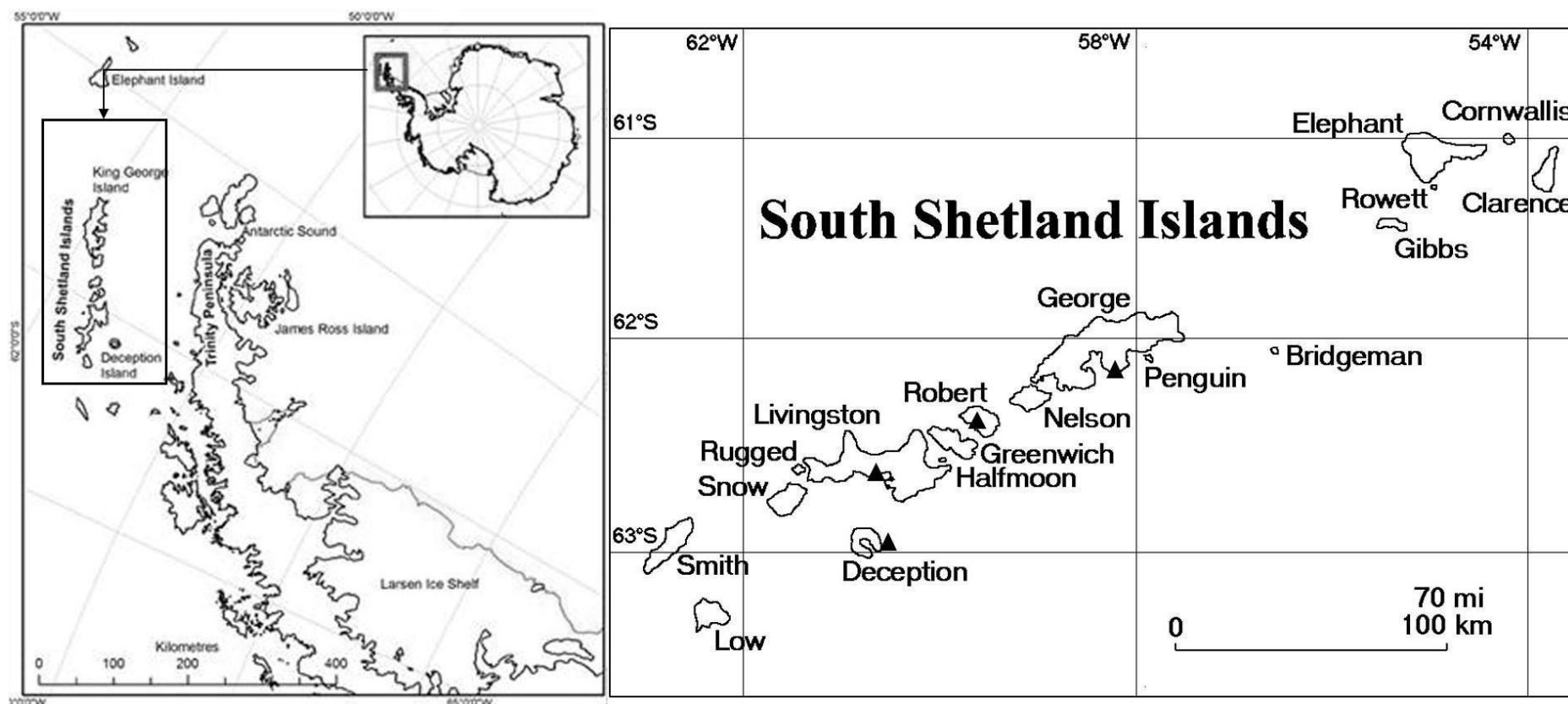


Figura 5 Mapas indicando as áreas de coleta, bem como as espécies de macroalgas coletadas na Península Antártica. Pontos de amostragem marcados com ▲ nas Ilhas: Rei George (Vaurel point - 62°10'49"S, 58°17'19.5" W - *Ascoseira mirabilis*, *Georgiella confluens*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*; Turret point - 62°05'092"S, 057°56'763"W – *A. mirabilis*, *I. cordata*, *G. confluens*), Robert (Coppermine Peninsula - 62°37'941"S, 59°70'400"W – *G. confluens*, *P. decipiens*), Livingston (Hannah point - 62°39'231"S, 060°36'336"W - *Curdiea racovitzae*, *Gigartina skottsbergii*) e Deception (Whales Bay - 62°46'373"S, 061°14'996"W – *I. cordata*

4.1.1 Isolamento e preservação dos fungos associados à macroalgas

Para isolamento dos fungos associados a *K. alvarezii* (**Figura 3, A**) foram obtidos fragmentos dos talos de 50 espécimes. Os talos foram lavados com água do mar esterilizada (**Figura 3, C**) e cinco fragmentos de cada talo foram transferidos para placas de Petri contendo caldo marinho (Zobell Marine broth 2216/Himedia) suplementado com 2% de ágar, 2% de glicose e 0,01% de cloranfenicol (Sigma, EUA) para evitar o crescimento de bactérias contaminantes. As placas foram incubadas a 25 °C por até 30 dias. Os isolados foram purificados em novas placas de Petri contendo o mesmo meio utilizado no isolamento.

Para a obtenção dos fungos associados às macroalgas antárticas (*I. cordata*, *G. skottsbergii*, *P. decipiens*, *A. mirabilis*, *G. confluens*, *C. jacquinotti* e *C. racovitzae*) fragmentos dos talos de cada espécie foram inoculados em tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL de dois diferentes meios semi-sólidos de enriquecimento: (1) CM1 (caldo marinho suplementado com 0,1% de ágar e 0,01% de cloranfenicol) e (2) CM2 (caldo marinho suplementado com 0,1% de carragenana e 0,01% de cloranfenicol). Após a turvação do meio, uma alíquota de 100 µL na diluição 10⁻⁴ de cada tubo foi transferida para placas de Petri contendo os meios sólidos (1) CM1.1 (caldo marinho com 2% de ágar e 0,01% de cloranfenicol), (2) CM2.1 (caldo marinho com 1,5% de carragenana e 0,01% de cloranfenicol) e CM 3.1 (caldo marinho suplementado com 2% de Ágar, 2% de glicose e 0,01% de cloranfenicol). As placas foram incubadas a 15 °C por até 30 dias. Os isolados foram purificados em novas placas contendo caldo marinho suplementado com 2% de ágar e 2% de glicose.

Todos os isolados de fungos filamentosos obtidos foram preservados em duplicata em água destilada esterilizada em temperatura ambiente (Castellani 1967) e em glicerol 15% a -80 °C. As leveduras obtidas foram cultivadas por 48 horas em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na₂PO₄ 0,2%) e preservadas em glicerol 20% a -80 °C. Todos os fungos foram depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 Identificação dos fungos

As culturas dos isolados fúngicos obtidos foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda e, para confirmação do agrupamento, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio da PCR utilizando o iniciador GTG₅ (GTGGTGGTGGTGGTG) (Lieckfeldt et al. 1993). Com base no perfil eletroforético, um isolado

dentre os que apresentaram um mesmo padrão de bandas foi selecionado para sequenciamento. Os fungos filamentosos foram identificados por meio do sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS1-5.8S- ITS2) do gene do RNA ribossomal e, quando necessário, foram sequenciadas as regiões codificantes do gene da β -tubulina (Glass & Donaldson 1995) para complementar a identificação molecular dos fungos. As leveduras foram identificadas pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossomal (Lachance et al. 1999).

4.2.1 Extração do DNA total dos fungos filamentosos

A extração do DNA total foi feita de acordo com Rosa et al. (2010), com modificações. Os fungos filamentosos foram inoculados em caldo extrato de malte 2% por sete dias. Após esse período, o micélio foi transferido para tubos de 1,5 mL acrescido de 400 μ L de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – dodecil sulfato de sódio 1%) e armazenados a -20°C até o momento da extração de DNA. No momento da extração, o micélio foi triturado em extrator de células Bullet BlenderTM (Uniscience, EUA) com o auxílio de três esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro). Após essa etapa, foram adicionados 162 μ L de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 30 minutos a 65°C . A seguir, foram acrescentados 570 μ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL onde foram acrescentados 10% do volume de acetato de sódio 3M. Após homogeneização, o tubo foi incubado em banho de gelo por 30 minutos e uma nova centrifugação a 13.200 r.p.m. por 5 minutos foi realizada. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 50% do volume de isopropanol (Merck) e mantido à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada uma centrifugação a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 μ L de etanol (Merck) 70% p/v com o auxílio de uma pipeta, a suspensão foi gentilmente homogeneizada. A amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Novamente foram adicionados 200 μ L de etanol 70% frio, a suspensão foi homogeneizada, centrifugada a 13.200 r.p.m por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Após o tubo secar por aproximadamente 15 minutos, foram adicionados 100 μ L de Tris-EDTA (TrisHCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) seguido por incubação a 37°C por 60 minutos para hidratação do DNA. O produto obtido foi quantificado em

espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Technologies, EUA) e armazenado a -20 °C até utilização.

4.2.2 Extração do DNA total das leveduras

Para extração do DNA total, as leveduras foram crescidas em ágar marinho (Zobell Marine Agar 2216/Himedia) suplementado com 2% glicose. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1%) e incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Decorrida essa etapa do processo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.800 r.p.m durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para que ocorresse a precipitação do DNA. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 13.200 r.p.m por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e ao pellet formado foram acrescentados 200 µL de etanol 70%. Efetuou-se novamente uma centrifugação a 13.200 r.p.m por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e os tubos foram incubados a temperatura ambiente, overnight, para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspensado em 50 µL de tampão Tris EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e estocado a -20°C.

4.2.3 PCR com iniciador (GTG)₅

Para confirmação da identificação morfológica, os isolados foram submetidos à análise molecular utilizando-se o iniciador (GTG)₅. A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) teve um volume final de 25 µL contendo 3 µL de DNA, 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol⁻¹ (Invitrogen), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 93 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0), corridas durante aproximadamente 80 minutos a 80V. As amostras foram coradas pela adição do agente intercalante

GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (VilberLourmat, França).

4.2.4 Obtenção dos amplicons

4.2.4.1 Amplificação da região ITS

Para identificação molecular dos fungos filamentosos foram utilizados os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTGATATGC-3') para amplificação das regiões ITS do gene do rRNA (White et al. 1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 2 µL de DNA, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol-1, 5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf, EUA). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, durante aproximadamente 20 minutos a 120V. Os produtos de PCR foram analisados como descrito anteriormente.

4.2.4.2 Amplificação parcial do gene da β-tubulina

Para amplificação parcial do gene da β-tubulina foram utilizados os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass & Donaldson 1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (de modo que a reação contivesse entre 50 -500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador BT2a e BT2b µmol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 3,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 59 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por 7 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados como descrito anteriormente.

4.2.4.3 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

Dentre as leveduras que apresentaram perfis moleculares distintos, um isolado foi selecionado para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, utilizando os iniciadores NL-1 (5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5' - GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Lachance et al. 1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo: 2,0 μ L de DNA, 1,0 μ L de cada iniciador NL1 e NL4 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2,0 μ L de dNTP 10mM, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados como descrito anteriormente.

4.2.4.4 Purificação dos amplicons e reação de sequenciamento

Para purificar os amplicons, adicionou-se à 47 μ L do produto de PCR, 142 μ L de etanol absoluto e 12 μ L de EDTA. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 30 minutos e, após este período, foram centrifugados a 13.200 r.p.m por 25 minutos; o sobrenadante foi descartado por inversão. A seguir, foram adicionados 120 μ L de etanol 70% refrigerado aos tubos, e posteriormente centrifugado a 13.200 r.p.m por 5 minutos; o etanol foi retirado por inversão. Os tubos foram secos, *overnight*, à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Decorrida essa etapa, 10 μ L de água ultrapura esterilizada foram adicionados aos tubos e os mesmos incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O produto obtido foi dosado em Nanodrop ND 1000 (Nanodrop Technologies).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento 25 automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems) e preparada para um volume final de 10 μ L, no qual foram colocados: 1 μ L do iniciador (5 μ mol⁻¹), 1 μ L de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μ L de Big Dye, 1 μ L de DNA (entre 10 e 20 ng) e 6 μ L de água ultrapura esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e 4 minutos de extensão final a 60 °C. Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 μ L de EDTA a 125 mM, 1 μ L de

acetato de amônio e 50 µL de etanol 96% (Merck), em cada poço. A placa foi homogeneizada brevemente com auxílio de um vórtex e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 r.p.m à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 r.p.m à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foram acrescentados 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems).

4.2.4.5 Análise das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos depositadas no GenBank, pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology*. Os fungos que apresentaram sequências com valor de $E = 0$, cobertura e identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade filogenética, utilizando-se o programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al. 2013), foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Os fungos com sequências com valor de E diferente de 0, bem como cobertura e identidade $\leq 98\%$, foram submetidos a análises filogenéticas e identificados em nível de espécie, gênero ou níveis hierárquicos mais altos. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças em comparação com espécies tipo ou referência.

Para identificação molecular foram utilizadas sequências ≥ 350 pares de bases. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o algoritmo de *Neighbor-joining*. O modelo *Maximum composite likelihood* foi usado para estimar a distância evolucionária. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1.000 repetições utilizando os programas incluídos no MEGA 6. Informações acerca dos níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank e Index Fungorum.

4.3 Avaliação da atividade carragenolítica dos isolados

4.3.1 Seleção de fungos produtores de carragenases

Todos os fungos obtidos foram avaliados quanto à capacidade de degradar carragenana seguindo o protocolo descrito por Feng & Li (2013), com modificações. De formabreve, os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias, a 25 °C (fungos tropicais) e 15 °C (fungos antárticos) e um disco de 5 mm do crescimento micelial foi inoculado (em duplicata) em placas de Petri contendo o meio carragenana (caldo marinho Zobell Marine Broth 2216/Himedia suplementado com 1,5% de carragenana Sigma Aldrich). Para as leveduras antárticas, preparou-se uma solução com as colônias puras, previamente crescidas por sete dias a 15 °C, em solução salina 0,85% e 10 µL foram inoculados em meio carragenana. As placas foram incubadas por sete dias a 25 °C (fungos filamentosos tropicais) e 15 °C (fungos antárticos). A revelação da atividade carragenolítica foi realizada adicionando-se lugol às placas. A presença de halo, evidenciada pela coloração por lugol, foi utilizada como indicativo de atividade enzimática. Os fungos que apresentaram resultados positivos foram selecionados para determinação da atividade carragenolítica.

4.3.2 Produção do extrato enzimático bruto de carragenase

Três discos de 5 mm de diâmetro de micélio dos fungos filamentosos selecionados, crescidos por sete dias a 25 °C (fungos tropicais) e 15 °C (fungos antárticos) em ágar marinho suplementado com 2% de glicose, foram inoculados em tubos cônicos de 50 mL com 20 mL de caldo carragenana (caldo marinho suplementado com 0,1% de carragenana) em duplicata e incubados por um período de três dias a 28 °C (fungos tropicais) e cinco dias a 15 °C (fungos antárticos) sob agitação de 200 r.p.m. Após este período, uma alíquota de 1 mL foi retirada e centrifugada a 13.200 r.p.m. durante 15 minutos. O sobrenadante, livre de células, foi utilizado imediatamente para determinar as atividades enzimáticas de carragenases.

4.3.3 Determinação da atividade volumétrica carragenolítica

A análise da quantificação dos açúcares redutores produzidos nos ensaios enzimáticos foi baseada na metodologia de Miller (1959), que quantifica os açúcares redutores por meio da reação de oxidação com reagente 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) dissolvido em solução básica de NaOH 2M. A atividade da carragenase foi determinada incubando em banho-maria 100 µL de amostra e 300 µL de substrato (0,1% de carragenana em tampão citrato pH 6,5) a 40 °C por 30

minutos (Feng & Li 2013, com modificações). Após a incubação, foram adicionados 600 µL de DNS à mistura. Posteriormente, os tubos contendo DNS e a mistura reacional foram fervidos por 5 minutos. A reação foi interrompida pelo choque térmico em banho de gelo. O método analítico colorimétrico utilizou a leitura de absorbância em 540 nm como medida indireta da concentração de açúcares presentes. A produção de açúcares redutores foi monitorada como liberação aparente de D-galactose. Uma unidade de atividade de carragenase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera um µg de galactose por minuto sob as condições acima. O fungo que apresentou melhor atividade volumétrica carragenolítica foi submetido a novos ensaios a fim de otimizar as condições de cultivo para produção do extrato enzimático bruto da carragenase.

4.4 Produção de carragenase por *Penicillium chrysogenum*

O fungo UFMGCB 10066 identificado como *Penicillium chrysogenum* foi utilizado nos ensaios de otimização das condições de reação e cultivo para produção de carragenase.

4.4.1 Determinação da temperatura ótima e pH ótimo de reação da carragenase

Para avaliar o pH ótimo da reação enzimática, a atividade carragenolítica do extrato enzimático foi primeiramente determinada nos pHs 4; 5; 6 e 6,5, a 40 °C. Posteriormente, ao encontrar o melhor pH, a reação foi testada nas temperaturas 30, 40 e 50 °C.

4.4.2 Otimização das condições de cultivo para produção do extrato enzimático bruto da carragenase

Como planejamento experimental objetivando-se a otimização das condições de cultivo para produção da carragenase, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), tendo como variáveis, o tempo de cultivo, a temperatura e a umidade. Os resultados foram avaliados através da aplicação de Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e Análise de Resíduos. O método de planejamento estatístico DCCR consistiu-se em um planejamento fatorial 2³ com oito ensaios (2x2x2), mais seis pontos axiais e três pontos centrais (PC), totalizando dezessete experimentos, para avaliar a influência dos fatores, no programa R v3.1.0 (2014). Os experimentos foram realizados em duplicata e as respostas foram dadas em atividade volumétrica carragenolítica (U/mL). Os gráficos de Superfícies de Respostas foram gerados no programa R para definir as faixas ótimas operacionais de cada variável. A matriz de design experimental é apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1 Matriz do delineamento experimental para a otimização das condições do cultivo para produção do extrato enzimático bruto

	Tempo de cultivo (X ₁) em dias	Temperatura (X ₂) em °C	Umidade (X ₃) em %
1	0 (6)	0 (20)	0 (60)
2	0 (6)	0 (20)	1,68 (100)
3	-1 (4)	1 (25)	1 (80)
4	-1,68 (2)	0 (20)	0 (60)
5	1 (8)	-1 (15)	1 (80)
6	1 (8)	1 (25)	-1 (40)
7	0 (6)	0 (20)	0 (60)
8	-1 (4)	-1 (15)	-1 (40)
9	1 (8)	-1 (15)	-1 (40)
10	1 (8)	1 (25)	1 (80)
11	0 (6)	1,68 (30)	0 (60)
12	-1 (4)	-1 (15)	1 (80)
13	-1 (4)	1 (25)	-1 (40)
14	1,68 (10)	0 (20)	0 (60)
15	0 (6)	0 (20)	0 (60)
16	0 (6)	0 (20)	-1,68 (20)
17	0 (6)	-1,68 (10)	0 (60)

Para realização dos ensaios do delineamento experimental as amostras algas secas da espécie *K. alvarezii*, provenientes de uma ficocultura em Ilha Grande/Angra dos Reis-RJ, foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de detritos e areia. Posteriormente foram secas a 70 °C até atingir um peso constante e cominuídas em um processador. O fungo selecionado foi cultivado por sete dias a 15 °C em ágar marinho (suplementado com 2% de glicose) e, posteriormente, quatro discos de 5 mm de diâmetro do micélio fúngico foram inoculados em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL com 10 g de alga, umedecidas com caldo marinho (20, 40, 60, 80 ou 100% de umidade) e incubados por um período de até 10 dias, sob agitação de 200 r.p.m. As temperaturas testadas foram: 10, 15, 20, 25 e 30 °C. A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 50 mL de tampão citrato (pH 6,5) e posterior homogeneização em agitador orbital por uma hora a 200 r.p.m. na temperatura de cultivo. A suspensão foi filtrada utilizando-se papel de filtro comum e o sobrenadante, considerado como extrato enzimático bruto, foi imediatamente utilizado para o ensaio da carragenase. A análise da quantificação dos açúcares redutores produzidos nos ensaios enzimáticos foi baseada na metodologia de Miller (1959).

4.5 Pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da biomassa algal

O pré-tratamento de *K. alvarezii* foi realizado segundo a metodologia proposta por Kwon et al (2016), com modificações. Utilizou-se 50 mL de uma solução de ácido cítrico 0,1 M e 5 g de biomassa algal. A mistura foi autoclavada por 60 minutos a 121 °C. Ao final do processo o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 5 M e posteriormente 50 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado para realização da hidrólise enzimática. A hidrólise foi realizada por 24 horas em banho úmido a 50°C. Alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas e centrifugadas por 15 min a 13200 r.p.m para análise dos açúcares redutores totais.

5 Resultados e Discussão

5.1 Isolamento e identificação dos fungos algícolas associados a *Kappaphycus alvarezii*

Apesar do primeiro fungo marinho, *Mycosphaerella pelvetiae*, ter sido obtido da alga *Pelvetia* em 1915 (Sutherland et al. 1915) e as macroalgas serem reconhecidas como importantes repositórios de diversidade de fungos nos oceanos, poucos estudos taxonômicos, biológicos e biotecnológicos foram publicados nos últimos anos com estes organismos (Furbino et al. 2014). A partir dos talos de *K. alvarezii* foram obtidos 99 fungos filamentosos, distribuídos em 40 unidades taxonômicas distintas (UTD), das quais 39 pertencentes ao filo Ascomycota e uma à Basidiomycota (**Tabela 2**). Doze isolados não foram identificados, pois não foi possível amplificar as regiões propostas ou não obteve-se sequências de qualidade satisfatória. Em alguns casos a não amplificação pode estar relacionada à qualidade do DNA bruto, o qual pode conter contaminantes que inibem a ação da Taq DNA polimerase (Nilsson et al. 2009)

A principal hipótese que explica a predominância de fungos ascomicetos em ambientes aquáticos tem sido a possível adaptação dos seus esporos a este ambiente, facilitando a flutuabilidade na coluna d'água e a aderência aos substratos, atribuindo aos fungos desse filo uma alta recuperação em técnicas dependentes de cultivo; por outro lado, fungos basiodimicetos são raramente isolados de substratos marinhos (Menezes et al. 2010). Neste trabalho, *Schizophyllum commune* (Agaricales) foi a única espécie basidiomicética obtida dos talos de *K. alvarezii*. Zuccaro et al. (2008) obtiveram 42 UTD da macroalga *Fucus serratus* (Phaeophyta), enquanto Furbino et al. (2014) obtiveram 20 de *Monostroma hariotti* (Chlorophyta) e 30 de *Pyropia endiviifolia* (Phaeophyta). De acordo com Suryanarayanan (2012), as macroalgas pardas e vermelhas abrigam maior diversidade de espécies em relação as macroalgas clorófitas. Os ciclos de vida curtos de algumas espécies de clorófitas e o crescimento lento das espécies fúngicas podem ser responsáveis por estas abrigarem uma baixa diversidade de fungos (Zuccaro et al. 2008). Vinte e três UTDs (57,5%) ocorreram como singletos (representados por apenas um isolado) neste trabalho, os quais podem representar componentes raros dentro da comunidade.

A classe *Dothideomycetes* foi predominante, apresentando 57,5% do total de isolados identificados (**Figura 6**), a qual é considerada a maior e, provavelmente, a mais filogeneticamente diversa dentro do filo Ascomycota (Kirk et al. 2008). Os membros mais conhecidos do grupo são patógenos de plantas e causam graves perdas nas produções agrícolas (Kirk et al. 2008). A família *Davidiellaceae*, representada por espécies de *Cladosporium*, foi predominantemente encontrada e representou 37 (42,5%) dos isolados identificados, distribuídas em oito UTD. Espécies de ste

gênero são cosmopolitas em distribuição e são frequentemente isolados de solo, ar e água (Bensch et al. 2012; Ogórek et al. 2012). Algumas espécies são patógenas de plantas, causando manchas e lesões foliares, e outras são também conhecidas como fungos endofíticos e do filoplano de diferentes plantas. Outras espécies são reportadas por apresentar relevância médica e podem causar doenças nos homens e animais (Bensch et al. 2012; Ogórek et al. 2012). Entretanto, *Cladosporium* é um gênero frequentemente associado a diferentes espécies de macroalgas, assim como *Aspergillus* e *Penicillium* (Zuccaro et al. 2008; Suryanarayanan et al. 2010; Godinho et al. 2013; Furbino et al. 2014).

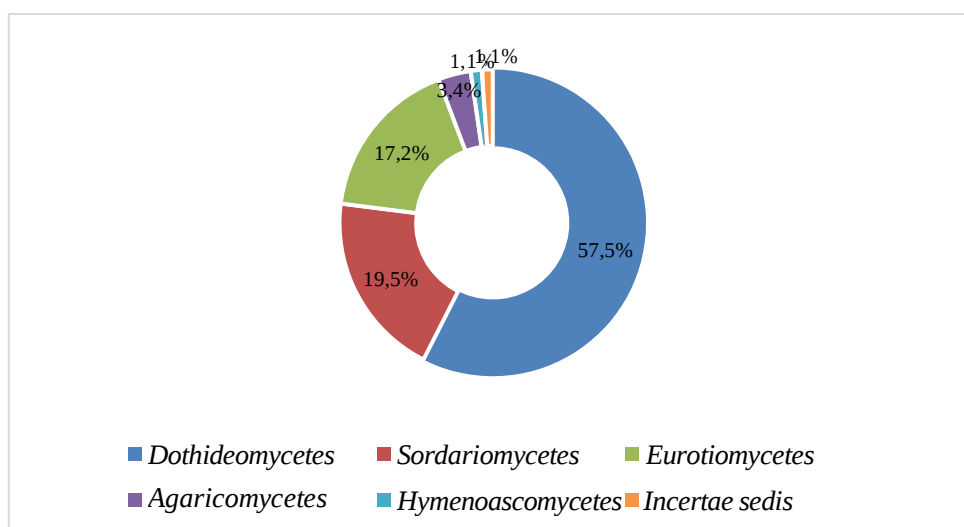


Figura 6 Porcentagem de fungos algícolas associados à macroalga *Kappaphycus alvarezii* classificados por classe.

Segundo Beisner et al. (2006) e Mazaris et al. (2010) a presença de um determinado micro-organismo em um ambiente está relacionada a fatores locais, tais como pH, temperatura, salinidade, nutrientes, entre outros, sendo então, o ambiente responsável pela estruturação das comunidades. Apesar dos fatores que determinam a diversidade e a distribuição dos fungos algícolas não serem conhecidos, os estudos apontam que as condições ambientais sejam responsáveis pela seleção das espécies fúngicas associadas. Os fungos associados às macroalgas parecem então, apresentar poucas espécies dominantes, baixa especificidade ao hospedeiro e uma capacidade de colonizar espécie de macroalgas taxonomicamente não relacionadas.

Os gêneros *Biscogniauxia*, *Diaporthe*, *Lecanicillium* e *Magnaporthe*, encontrados em *K. alvarezii* no presente trabalho, compreendem espécies patógenas de plantas de grande importância econômica por causarem perdas consideráveis na agricultura (Dean et al. 2005; Nugent et al. 2005; Worapattamasri et al. 2005; Goettel et al. 2008; Gomes et al. 2013). Algumas espécies do

gênero *Pestalotiopsis* e *Periconia* são espécies relatadas como fungos endofíticos produtores de taxol. O taxol é um complexo diterpenóide, produzido por todas as espécies de *Taxus*, comercializada como uma droga anticâncer (Li et al. 1998; Strobel et al. 1996). Estes fungos foram encontrados em baixo número nos talos de *K. alvarezii* no presente trabalho.

Apesar da micobiota encontrada em *K. alvarezii* ser constituída por espécies tipicamente terrestres e a coleta ter sido realizada em tanques de cultivo, a boa taxa de recuperação desses fungos em meio de cultivo rico em sais pode indicar uma adaptação desses fungos ao ambiente marinho. Além disso, a utilização dos polissacarídeos constituintes das algas como fonte de carbono, como será demonstrado posteriormente, sugere que estas espécies não sejam contaminantes ou residentes casuais.

Tabela 2 Identificação molecular dos fungos algícolas associados à macroalga *Kappaphycus alvarezii*

Código UFMGCB^a	Nº de isolados	Resultado Top BLAST (nº de acc. GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp sequenciados	Espécie ou grupo taxonômico proposto^e
9607	10	<i>Cladosporium colombiae</i> (NR119729) ^b	98	99	530	^d <i>Cladosporium</i> sp. 1
9604	9	<i>Cladosporium colocasiae</i> (AF393694) ^b	99	100	552	^d <i>C. colocasiae</i>
9596	6	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i> (NR119730) ^b	100	99	539	^d <i>Cladosporium</i> cf. <i>subuliforme</i>
9642	5	<i>Cladosporium austroafricanum</i> (KT600381) ^b	100	100	438	^d <i>Cladosporium</i> sp. 2
9559	5	<i>Penicillium volgaense</i> (KC411771) ^b	91	99	583	^d <i>P. Volgaense</i>
9637	4	<i>Pestalotiopsis kenya</i> (KM199302) ^b	100	100	487	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
9610	3	<i>Cladosporium halotolerans</i> (NR119605) ^b	91	99	524	^d <i>C. Halotolerans</i>
9653	3	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR111815) ^b	100	99	528	^d <i>P. tardochrysogenum</i>
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981) ^c	100	98	468	
9619	3	<i>Schizophyllum commune</i> (AF280759) ^b	100	99	625	<i>S. commune</i>
9620	2	<i>Arthrimum rasikravindrii</i> (NR119932) ^b	100	100	456	<i>A. rasikravindrii</i>
9612	2	<i>Aspergillus puniceus</i> (NR103579) ^b	77	100	524	<i>A. puniceus</i>
9613	2	<i>Aspergillus versicolor</i> (NR131277) ^b	97	100	528	^d <i>Aspergillus</i> sp.
		<i>Aspergillus protuberus</i> (JN853964) ^c	100	98	406	
9529	2	<i>Biscogniauxia</i> sp. (EU009960) ^b	100	99	563	<i>Biscogniauxia</i> sp. 1
9643	2	<i>Biscogniauxia uniaipiculata</i> (JX507805) ^b	100	97	593	<i>Biscogniauxia</i> sp. 2
9584	2	<i>Cladosporium rugulovarians</i> (KT600459) ^b	100	100	416	^d <i>Cladosporium</i> cf. <i>Exile</i>
9563	2	<i>Penicillium astrolabium</i> (AY373925) ^b	83	99	584	^a <i>P. Astrolabium</i>

		<i>Penicillium astrolabium</i> (DQ645793) ^c	92	88	470	
9640	2	<i>Periconia</i> sp. (HQ608027) ^b	100	99	423	<i>Periconia</i> sp.
9568	1	<i>Acremonium hyalinulum</i> (NR131321) ^b	100	96	463	^d <i>Acremonium</i> sp.
9644	1	<i>Alfaria cyperi-esculenti</i> (KJ869143) ^b	100	98	431	<i>Alfaria</i> sp.
9635	1	<i>Annulohypoxylon stygium</i> (KP322774) ^b	100	100	527	<i>A. stygium</i>
9592	1	<i>Cladosporium oxysorum</i> (HM148118) ^b	100	99	426	^d <i>C. Oxysorum</i>
9609	1	<i>Cladosporium velox</i> (NR119604) ^b	87	100	544	^d <i>C. Velox</i>
9575	1	<i>Curvularia affinis</i> (KM230400) ^b	100	98	514	<i>C. affinis</i>
9616	1	<i>Dendryphion europaeum</i> (KJ869146) ^b	79	99	570	<i>Dendryphion</i> sp.
9569	1	<i>Diaporthe</i> cf. <i>heveae</i> (KC343116) ^b	99	99	502	<i>Diaporthe</i> sp.
		<i>Diaporthe</i> cf. <i>heveae</i> (KC344084) ^c	89	99	493	
9571	1	<i>Epicoccum brasiliense</i> (GU237760) ^b	95	100	470	<i>E. brasiliense</i>
9655	1	<i>Fusarium circinatum</i> (NR120263) ^b	100	99	576	^d <i>Fusarium</i> sp.
9570	1	<i>Lecanicillium antillanum</i> (NR111097) ^b	100	95	416	<i>Lecanicillium</i> sp.
9577	1	<i>Letendraea cordylinicola</i> (KM213995) ^b	100	95	443	<i>Letendraea</i> sp.
9573	1	<i>Magnaporthe grisea</i> (FN555109) ^b	100	100	480	<i>M. grisea</i>
9654	1	<i>Massarina</i> sp. (KP143700) ^b	100	99	492	<i>Massarina</i> sp.
9560	1	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> (AY642530) ^b	98	96	465	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
9574	1	<i>Paraconiothyrium thysanolaenae</i> (KP744453) ^b	99	99	480	<i>P.thysanolaenae</i>
9572	1	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i> (JX496039) ^b	100	100	432	<i>P. neglecta</i>
9634	1	<i>Penicillium solitum</i> (HQ026745) ^b	83	98	491	^d <i>P. fuscoglaucum</i>
		<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (FJ930977) ^c	85	98	335	

9567	1	<i>Phaeosphaeria chiangraina</i> (KM434270) ^a	91	99	516	<i>Phaeosphaeria</i> sp.
9617	1	<i>Phaeosphaeria podocarpi</i> (KP004452) ^a	77	95	690	<i>Phaeosphaeropsis</i> sp.
9645	1	<i>Pseudocercospora nephrolepidicola</i> (HQ599590) ^a	100	99	428	<i>P. nephrolepidicola</i>
9623	1	<i>Roussoella japonensis</i> (KJ474829) ^a	98	90	367	<i>Pleosporales</i> sp.
9618	1	<i>Torula caligans</i> (JX156379) ^a	96	99	446	<i>T. caligans</i>

^aUFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^dTáxons submetidos a análises filogenéticas baseada no sequenciamento das regiões ^bITS, ^cβ-tubulina. ^ePosição taxonômica sugerida. Sequências depositadas: ^fITS, ^gβ-tubulina.

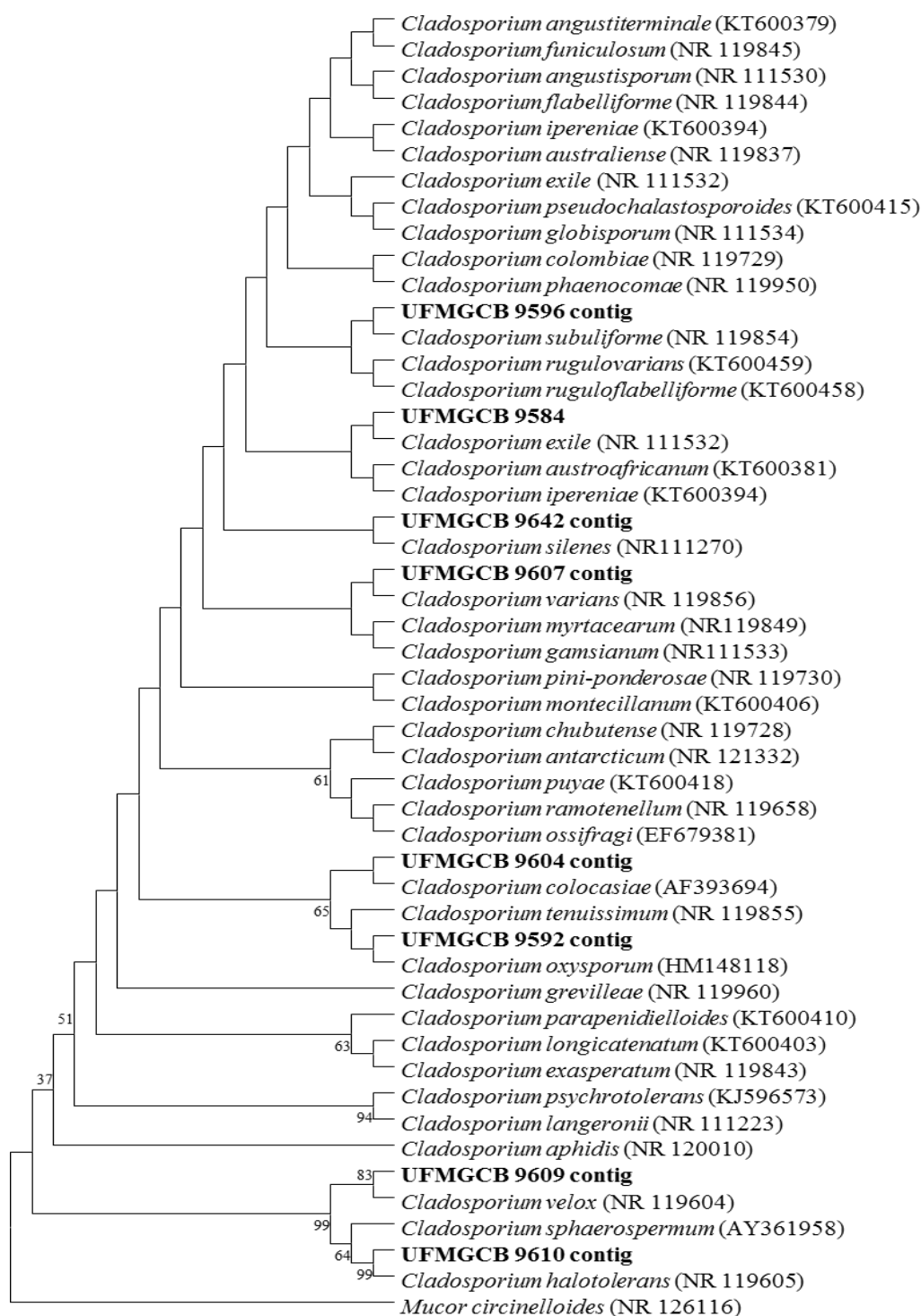


Figura 7 Árvore filogenética gerada a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank para as espécies do gênero *Cladosporium*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR 126116) foi utilizada como grupo externo.

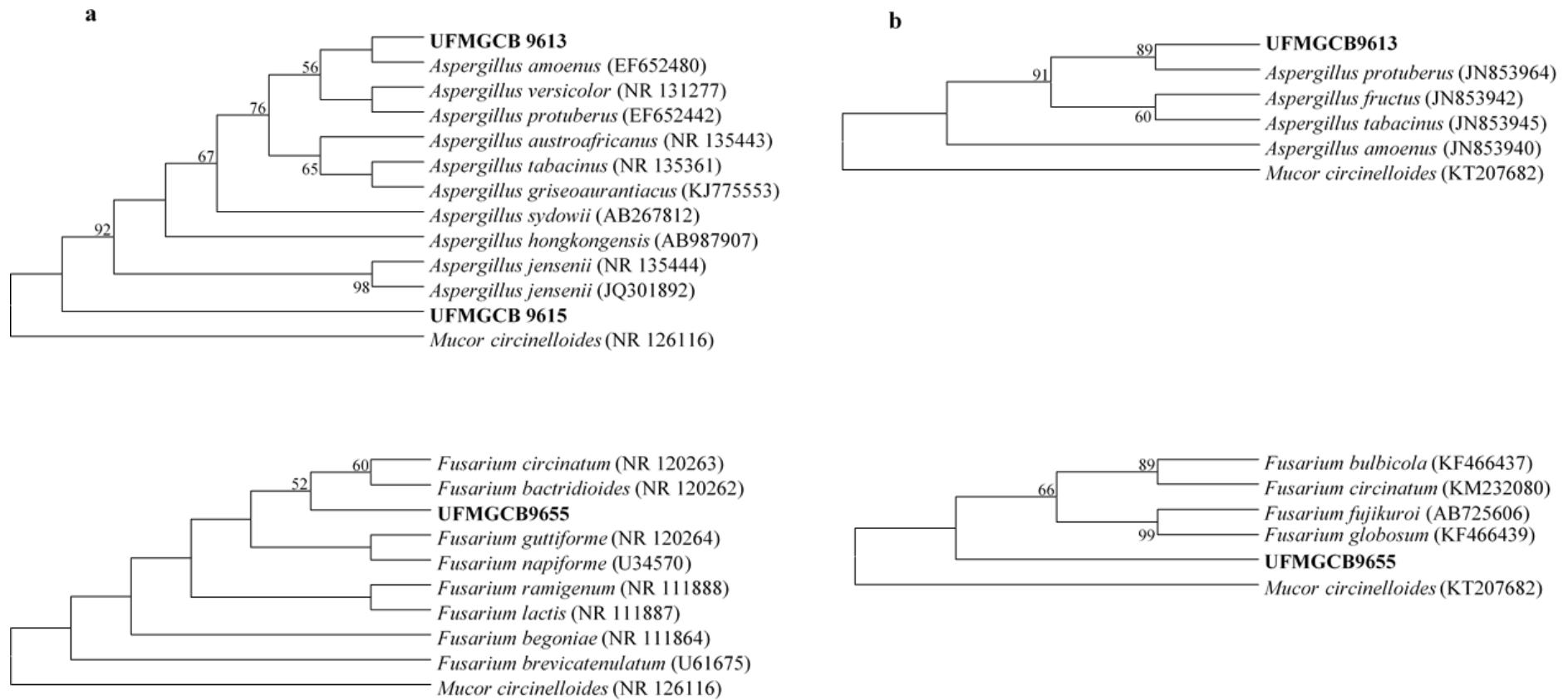


Figura 8 Árvores filogenéticas geradas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) (**a**) e do gene da β -tubulina (**b**) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank para as espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR 126116) foi utilizada como grupo externo.

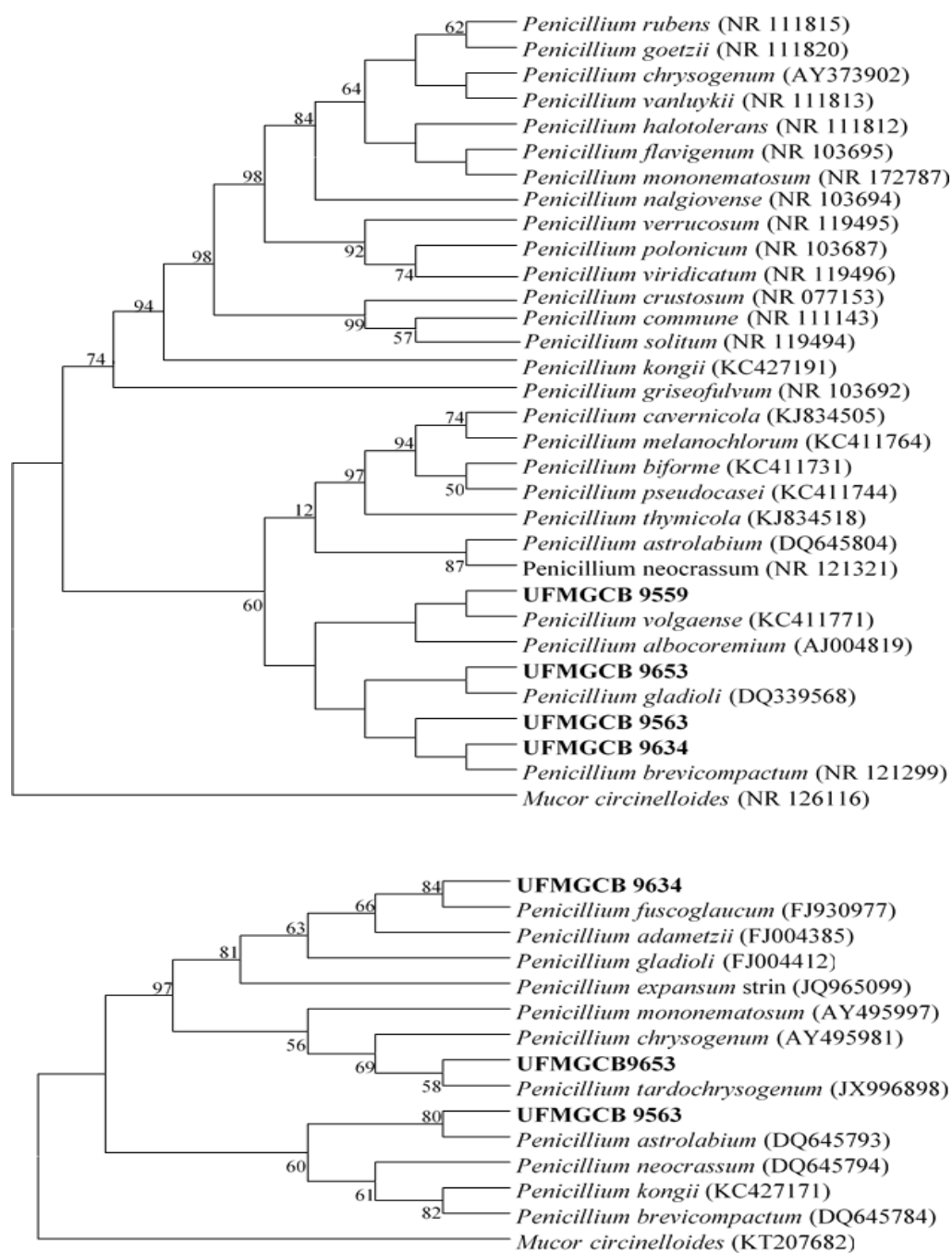


Figura 9 Árvores filogenéticas geradas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) (a) e do gene da β -tubulina (b) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank para as espécies do gênero *Penicillium*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR 126116) foi utilizada como grupo externo.

5.2 Isolamento e identificação dos fungos algícolas antárticos

Em continuidade aos trabalhos de Loque et al. (2010), Godinho et al. (2013) e Furbino et al. (2014), o presente estudo amplia o conhecimento sobre a comunidade de fungos associados às macroalgas antárticas. A partir das macroalgas antárticas foram obtidos 19 isolados de fungos filamentosos e 35 leveduras (**Tabela 3**), distribuídos em 13 UTD sendo nove pertencentes aos filos *Ascomycota* e quatro à *Basidiomycota*. A classe *Saccharomycetes* foi predominante com 55% dos isolados identificados. Dos 54 isolados obtidos das macroalgas antárticas não foi possível identificar quatro táxons. A abundância das leveduras associadas às macroalgas antárticas deste trabalho, e em trabalhos já realizados anteriormente (Loque et al. 2010; Godinho et al. 2013; Furbino et al. 2014), reforçam a hipótese de que as leveduras constituem um grupo abundante na comunidade de fungos associados à estes organismos.

Tabela 3 Número de isolados fúngicos obtidos das espécies de macroalgas amostradas.

Macroalgas hospedeiras	Leveduras	Fungos filamentosos
<i>Ascoseira mirabilis</i>	13	7
<i>Curdiea racovitzae</i>	2	0
<i>Georgiella confluens</i>	7	4
<i>Gigartina skottsbergii</i>	3	3
<i>Iridaea cordata</i>	6	4
<i>Palmaria decipiens</i>	4	1
Total	35	19

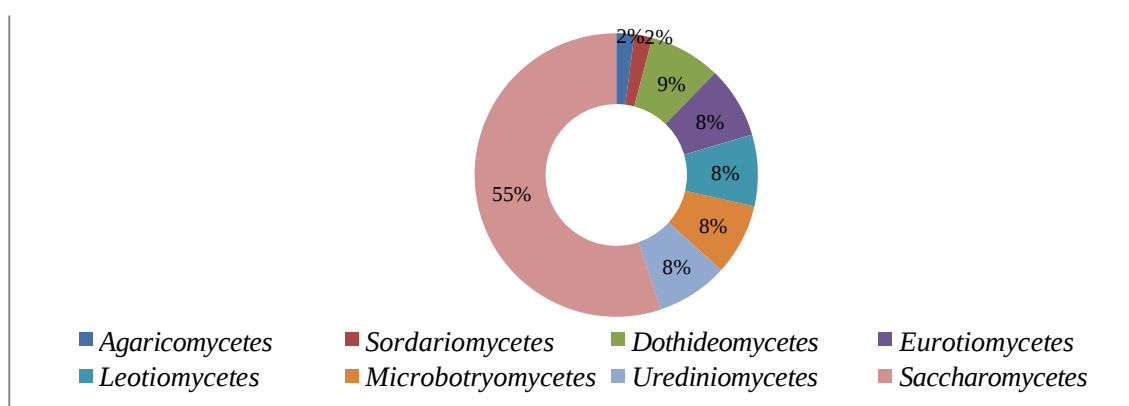


Figura 10 Porcentagem de fungos algícolas associados à macroalgas antárticas distribuídos por classe.

Os fungos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Antarctomyces*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Coprinellus*, *Doratomyces*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus* e *Rhodothorula* (**Tabela 4**). A espécie mais frequente foi a levedura

Metschnikowia australis, a qual é endêmica da Antártica. Esta levedura já foi encontrada na água do mar (Fell et al. 1968), sedimento marinho (Vaz et al. 2011), associada ao estômago do krill antártico *Euphausia superba* (Donachie & Zdanowski 1998) e também aos talos das macroalgas *Acrosiphonia arcta*, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia mensiezii*, *Monostroma hariotti*, *Palmaria decipiens* e *Pyropia endiviifolia* (Loque et al. 2010; Godinho et al. 2013; Furbino et al. 2014). A abundância de *M. australis* presente nos talos de diferentes macroalgas da Antártica reforça a hipótese de que estas algas representam um reservatório natural desta espécie de levedura (Loque et al. 2010).

Tabela 4 Identificação molecular de fungos algícolas associados à macroalgas antárticas.

Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Resultado Top BLAST (nº de acc. GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto ^e
UFMGAlg8	27	<i>Metschnikowia australis</i> (KF419301) ^d	99	99	495	<i>Metschnikowia australis</i>
10061	4	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (FJ911878) ^b	96	99	557	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>
UFMGAlg1	4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF070432) ^d	100	99	504	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
UFMGAlg6	3	<i>Leucosporidiella fragaria</i> (AF070428) ^d	100	99	608	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
10051	2	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i> (NR119730) ^b	79	99	660	<i>Cladosporium</i> sp. 1
		<i>Cladosporium psychrotolerans</i> (KJ596614) ^c	88	89	456	
10066	2	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145) ^b	86	99	662	<i>Penicillium chrysogenum</i>
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JF909955) ^c	100	100	361	
10052	2	<i>Penicillium citrinum</i> (NR121224) ^b	96	99	510	<i>Penicillium citrinum</i>
		<i>Penicillium citrinum</i> (GU944545) ^c	76	99	579	
	1	<i>Beauveria bassiana</i> ((NR111594)	100	100	476	<i>Beauveria bassiana</i>
10059	1	<i>Cladosporium colombiae</i> (NR119729) ^b	80	99	660	<i>Cladosporium</i> sp. 2
10058	1	<i>Coprinellus radians</i> (JN675349) ^b	99	99	527	<i>Coprinellus radians</i>
10055	1	<i>Doratomyces verrucisporus</i> (FJ914680) ^b	99	97	612	<i>Doratomyces</i> sp.
UFMGAlg17	1	<i>Leucosporidiella muscorum</i> (AF070433) ^d	100	99	606	<i>Leucosporidiella muscorum</i>
10067	1	<i>Penicillium fusicum</i> (NR077159) ^b	85	99	675	<i>Penicillium fusicum</i>
		<i>Penicillium fusicum</i> (KF769400) ^c	97	97	443	
10054	1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (KF039893) ^b	83	99	594	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.

^aUFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Sequenciamento das regiões ^bITS, ^cβ-tubulina. ^dD1/D2, ^ePosição taxonômica sugerida. Sequências depositadas: ^fITS, ^gβ-tubulina.

Quatro isolados de *Antarctomyces psychrotrophicus* foram obtidos a partir da macroalga *Ascoseira mirabilis*. Esta espécie de fungo é endêmica da Antártica e já foi isolada a partir de solos da Antártica marítima e continental (Stchigel et al. 2001), da gramínea *Deschampsia antarctica* (Rosa et al. 2009), de água de lagos antárticos (Gonçalves et al. 2012), diferentes macroalgas (Loque et al. 2010; Godinho et al. 2013; Furbino et al. 2014) e do talo de líquens (Santiago et al. 2015).

Neste trabalho apenas um isolado do gênero *Pseudogymnoascus* foi obtido. Espécies de *Pseudogymnoascus* (também identificadas como anamorfo do gênero *Geomyces*) têm sido frequentemente isoladas na Antártica, com uma distribuição ubíqua e a partir de diferentes substratos, tais como solos (Mercantini et al. 1989; Arenz & Blanchette 2011; Godinho et al. 2016), musgos (Tosi et al. 2002), folhas de *Colobanthus quitensis* (Rosa et al. 2010), lagos de água continental (Gonçalves et al. 2012), líquens (Santiago et al. 2015) e também nos talos de macroalgas (Loque et al. 2010; Furbino et al. 2014).

Neste trabalho também foram obtidas espécies dos gêneros *Cladosporium*, *Coprinellus*, *Doratomyces* e *Penicillium*. Estes gêneros incluem táxons conhecidos como sapróbios terrestres capazes de produzir diferentes tipos de enzimas (Redhead et al. 2001; Kirk et al. 2008; Bensch et al. 2010). *Penicillium* tem sido descrito como o gênero fúngico mais comum nos ecossistemas antárticos (McRae et al. 1999). Os estudos de Block (1994) e Rudolph & Benninghoff (1977) apontaram que as espécies de *Penicillium* são os principais decompositores e representam um elemento importante na ciclagem de nutrientes na Antártica. *Coprinellus* (Psathyrellaceae) é um gênero dos basidiomicetos e inclui mais de 40 espécies definidas (Redhead et al. 2001). Algumas espécies *Coprinellus* foram obtidas como endófitos de *Theobroma cacao* na Costa Rica e Equador (Márquez et al. 2008; Thomas et al. 2008) e *Solanum cernuum*, no Brasil (Vieira et al. 2011). *Doratomyces* é um gênero amplamente distribuído (Kirk et al. 2008) e algumas das espécies (como *D. microspores*) são capazes de produzir queratinase (Gradisar et al. 2000).

Neste estudo, dos fungos associados às macroalgas da Antártica apenas a levedura *Metschnikowia australis* foi dominante. Segundo Godinho et al. (2016), táxons dominantes podem apresentar características bioquímicas as quais permitem a sobrevivência nas condições extremas antárticas. Sendo assim, podem auxiliar na compreensão de sobrevivência dos eucariotos neste ambiente. Estudar a diversidade e distribuição dos fungos associados permite também aproveitar o potencial biotecnológico destes micro-organismos cuja síntese de biomoléculas pode ser única, sem precedentes.

5.3 Seleção dos fungos produtores de carragenases

Levando-se em consideração que a salinidade e o pH são fatores que podem influenciar a produção de enzimas e a atividade enzimática (Treichel et al. 2010) é esperado que fungos derivados do ambiente marinho apresentem uma vantagem adaptativa natural (quando comparados aos homólogos terrestres) ao serem utilizados em processos com alta concentração de sal, como no caso da conversão da biomassa algal em etanol.

Para avaliar a atividade carragenolítica, todos os fungos algícolas obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio CM suplementado com 1,5% de carragenana. A detecção de halo hipocrômico, evidenciado pela coloração por lugol, foi utilizada como indicativo da presença de atividade (**Figura 11**). Ao final do processo de triagem dos 153 isolados testados, 86 (55%) apresentaram halo indicativo de atividade carragenolítica. Nenhuma levedura foi capaz de formar o halo hipocrômico. Micro-organismos associados a algas, por meio de inúmeras interações complexas com o hospedeiro, constituem uma fonte imensa e atrativa de compostos bioativos e polissacaridases específicas (Martin et al. 2014). É geralmente aceito que os micro-organismos se beneficiam das fontes de carbono disponíveis produzidas pela alga hospedeira (Martin et al. 2014). Cerca de dez polissacarídeos diferentes (por exemplo, ágar, carragenana, alginato e ulvana) são encontrados nos três grupos de alga (Jung et al. 2013). Deste modo, paralelamente à estes polissacarídeos, enzimas específicas são encontradas nos micro-organismos que vivem nas algas (Jung et al. 2013).



Figura 11 Halo indicativo da atividade carragenolítica de fungos algícolas.

Uma proporção significativa de fungos filamentosos provenientes de *K. alvarezii* (75,7%) (**Tabela 5**) foi positiva no teste colorimétrico em placa de Petri quanto à capacidade de degradar a carragenana, o principal componente da parede celular das rodófitas, o que pode sugerir que estes fungos sejam importantes na decomposição e ciclagem de nutrientes das rodófitas no ambiente marinho. A abundância de fungos associados aos talos de *K. alvarezii*, bem como sua capacidade em

degradar componentes da parede celular desta alga e utilizá-los como fonte de carbono os sugerem como potenciais agentes causadores da doença *ice-ice*, comumente causada por bactérias em algas cultivadas (Solis et al. 2010). A doença *ice-ice* induz o branqueamento e amolecimento dos tecidos das algas, acarretando grandes perdas econômicas para os produtores, pois há uma redução significativa no rendimento e qualidade da carragenana (Solis et al. 2010).

Tabela 5 Medida dos halos hipocrômicos dos fungos carragenolíticos associados à *Kappaphycus alvarezii*.

Código UFMGCB^a	Espécie ou grupo taxonômico proposto	Diâmetro (cm) do halo hipocrômico
9568	<i>Acremonium</i> sp.	0,15 ± 0,07
9644	<i>Alfaria</i> sp.	1,3 ± 0,14
9635	<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	0,55 ± 0,07
9620	<i>Arthrinium rasikravindrii</i>	ND
9621	<i>A. rasikravindrii</i>	ND
9612	<i>Aspergillus puniceus</i>	0,75 ± 0,07
9615	<i>A. puniceus</i>	0,45 ± 0,07
9613	<i>Aspergillus</i> sp.	1,15 ± 0,07
9614	<i>Aspergillus</i> sp.	1,15 ± 0,21
9579	<i>Biscogniauxia</i> sp.	ND
9643	<i>Biscogniauxia</i> sp.	ND
9588	<i>Cladosporium</i> cf. <i>exile</i>	0,2 ± 0
9624	<i>C. cf. subuliforme</i>	0,35 ± 0,07
9648	<i>C. colocasiae</i>	1 ± 0
9586	<i>C. colocasiae</i>	0,9 ± 0
9583	<i>C. colocasiae</i>	0,6 ± 0,14
9587	<i>C. colocasiae</i>	0,7 ± 0,14
9599	<i>C. colocasiae</i>	0,65 ± 0,21
9605	<i>C. colocasiae</i>	0,85 ± 0,21
9650	<i>C. colocasiae</i>	0,75 ± 0,21
9589	<i>C. colocasiae</i>	0,7 ± 0,28
9608	<i>C. halotolerans</i>	0,65 ± 0,07
9592	<i>C. oxysporum</i>	1,05 ± 0,21
9607	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,2 ± 0
9578	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,55 ± 0,07
9582	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,35 ± 0,07
9593	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,25 ± 0,07
9594	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,25 ± 0,07
9600	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,45 ± 0,07
9626	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,5 ± 0,14
9601	<i>Cladosporium</i> sp. 1	0,55 ± 0,21
9585	<i>Cladosporium</i> sp. 2	0,2 ± 0
9591	<i>Cladosporium</i> sp. 2	0,15 ± 0,07

9627	<i>Cladosporium</i> sp. 2	0,7 ± 0
9642	<i>Cladosporium</i> sp. 2	1,05 ± 0,07
9649	<i>Cladosporium</i> sp. 2	0,7 ± 0
9575	<i>Curvularia affinis</i>	0,55 ± 0,07
9569	<i>Diaporthe</i> sp.	0,4 ± 0,14
9571	<i>Epicoccum brasiliense</i>	1 ± 0
9655	<i>Fusarium</i> sp.	ND
9570	<i>Lecanicillium</i> sp.	0,2 ± 0
9577	<i>Letendraea</i> sp.	1,65 ± 0,07
9654	<i>Massarina</i> sp.	1,25 ± 0,2
9630	Não identificado	ND
9639	Não identificado	ND
9576	Não identificado	1,95 ± 0,07
9631	Não identificado	1,05 ± 0,07
9632	Não identificado	0,85 ± 0,07
9597	Não identificado	0,65 ± 0,21
9560	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	1,05 ± 0,07
9574	<i>P. thysanolaenae</i>	0,45 ± 0,07
9572	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	0,7 ± 0
9646	<i>Pencillium tardochrysogenum</i>	1,2 ± 0,14
9634	<i>P. fuscoglaucum</i>	1,25 ± 0,64
9651	<i>P. volgaense</i>	ND
9633	<i>P. volgaense</i>	ND
9561	<i>P. volgaense</i>	0,25 ± 0,07
9563	<i>P. volgaense</i>	1,35 ± 0,07
9636	<i>P. volgaense</i>	0,45 ± 0,07
9653	<i>P. volgaense</i>	1,3 ± 0
9580	<i>P. volgaense</i>	0,6 ± 0,14
9562	<i>P. volgaense</i>	1,35 ± 0,21
9559	<i>P. volgaense</i>	0,3 ± 0,28
9641	<i>Periconia</i> sp.	1 ± 0
9640	<i>Periconia</i> sp.	1,3 ± 0,42
9566	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1 ± 0
9564	<i>P. microspora</i>	1,25 ± 0,35
9637	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1,65 ± 0,07
9638	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1,25 ± 0,35
9567	<i>Phaeosphaeropsis</i> sp.	0,5 ± 0
9617	<i>Phaeosphaeropsis</i> sp.	0,6 ± 0,14
9623	<i>Pleosporales</i> sp.	1,45 ± 0,21
9619	<i>S. commune</i>	0,85 ± 0,07
9565	<i>S. commune</i>	1,3 ± 0,14
9598	<i>S. commune</i>	0,4 ± 0,28

^aUFMGCB = Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células de Minas Gerais; ND = não definido.

Apesar das leveduras obtidas das macroalgas da Antártica terem sido o grupo mais abundante, nenhum táxon exibiu halo indicativo de atividade enzimática. No entanto, nove dos 19 (47,4%) fungos filamentosos foram capazes de produzir halos hipocrômicos (**Tabela 6**). Dos 10 fungos filamentosos que não foram ativos, cinco foram isolados a partir da macroalga parda *Ascoseira mirabilis*, o que reforça a importância da realização de uma seleção já ser iniciada na coleta por meio da escolha apropriada do substrato e adição de nutrientes específicos ao meio de cultura para selecionar micro-organismos capazes de produzir a enzima alvo.

Tabela 6 Medida dos halos hipocrômicos dos fungos carragenolíticos associados às macroalgas da Antártica.

UFMGCB ^a	Macroalga hospedeira	Espécie ou grupo taxonômico proposto	Diâmetro do halo hipocrômico (cm)
10064	<i>Ascoseira mirabilis</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	0,85 ± 0,21
10059	<i>Georgiella confluens</i>	<i>Cladosporium</i> sp. 2	ND
10055	<i>Iridaea cordata</i>	<i>Doratomyces</i> sp.	1,1 ± 0
10053	<i>A. mirabilis</i>	<i>P. chrysogenum</i>	1,2 ± 0,14
10066	<i>I. cordata</i>	<i>P. chrysogenum</i>	1,1 ± 0
10056	<i>G.confluens</i>	<i>P. citrinum</i>	1,3 ± 0
10052	<i>Gigartina skottsbergii</i>	<i>P. citrinum</i>	1,7 ± 0
10067	<i>Palmaria decipiens</i>	<i>P. fusisporum</i>	0,35 ± 0,07
10054	<i>I. cordata</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	1 ± 0

^aUFMGCB = Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células de Minas Gerais; ND=não definido.

As três classes de carragenases conhecidas (kappa, iota e lambda) obtidas a partir de bactérias marinhas são bem caracterizadas. Essas bactérias pertencem a dois filos de parentesco distante, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, embora a maioria dos isolados pertença ao primeiro grupo. Os gêneros de bactérias produtores de carragenases são: *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (Ruiter and Ruldoph 1997; Liu et al. 2013; Ma et al. 2013; Yao et al. 2013), sendo *Pseudoalteromonas carrageenovora* o micro-organismo mais estudado.

Entretanto, até o momento, apenas Solis et al. (2010) relataram fungos capazes de produzir carragenases obtidos de espécimes saudáveis e doentes de *K. alvarezii* e *K. striatum*, os quais foram avaliados quanto a capacidade em degradar os componentes constituintes das algas, dentre eles a carragenana. As espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus* e *Phoma* sp. foram relatadas como possíveis produtoras de carragenases.

5.3.1 Determinação da atividade volumétrica carragenolítica

A atividade volumétrica carragenolítica dos fungos foi avaliada por meio da quantificação da D-galactose (μg) liberada por minuto por mL a partir da reação de hidrólise da carragenana (**Tabela 7**). Dezenove dos 75 fungos obtidos de *K. alvarezii* não puderam ser testados pois cessaram seus crescimentos.

Tabela 7 Determinação da atividade volumétrica carragenolítica (U) dos fungos associados às macroalgas por meio da quantificação de D-galactose (μg) liberada por minuto por mL.

Código UFMGCB	Identificação proposta	U/mL
10066	<i>Penicillium chrysogenum</i>	17,49 $\pm$ 3,21
9594	<i>Cladosporium</i> sp. 1	11,7 $\pm$ 0,21
9605	<i>Cladosporium colocasiae</i>	10,43 $\pm$ 0,44
9589	<i>Cladosporium</i> sp. 1	9,76 $\pm$ 0,45
9601	<i>Cladosporium colocasiae</i>	9,75 $\pm$ 0,54
9571	<i>Epicoccum brasiliense</i>	9,73 $\pm$ 1,81
9583	<i>Cladosporium colocasiae</i>	9,6 $\pm$ 0,33
9598	<i>Schizophyllum commune</i>	9,43 $\pm$ 1,14
9620	<i>Arthrimum rasikravindrii</i>	9,14 $\pm$ 0,03
9559	<i>Penicillium volgaense</i>	9,1 $\pm$ 1,04
9621	<i>Arthrimum rasikravindrii</i>	8,96 $\pm$ 0,18
9612	Não identificado	8,95 $\pm$ 0,26
9632	<i>Aspergillus puniceus</i>	8,95 $\pm$ 0,08
9582	<i>Cladosporium</i> sp. 1	8,89 $\pm$ 0,35
10054	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	8,82 $\pm$ 0,44
9638	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8,65 $\pm$ 0,82
9634	<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	8,6 $\pm$ 0,85
9651	<i>Penicillium volgaense</i>	8,55 $\pm$ 0,17
10055	<i>Doratomyces</i> sp.	8,51 $\pm$ 0,19
9575	<i>Curvularia affinis</i>	8,44 $\pm$ 0,89
9637	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8,41 $\pm$ 1,19
9587	<i>Cladosporium colocasiae</i>	8,21 $\pm$ 2,15
9646	<i>Penicillium tardochrysogenum</i>	8,19 $\pm$ 0,96
9599	<i>Cladosporium colocasiae</i>	8,17 $\pm$ 1,89
10056	<i>Penicillium citrinum</i>	7,91 $\pm$ 1,07
9613	<i>Lecanicillium</i> sp.	7,88 $\pm$ 0,64
9570	<i>Aspergillus</i> sp.	7,87 $\pm$ 0,49
10052	<i>Penicillium citrinum</i>	7,85 $\pm$ 1,25
9633	<i>Penicillium tardochrysogenum</i>	7,83 $\pm$ 0,79
10053	<i>Penicillium chrysogenum</i>	7,76 $\pm$ 0,49
9569	<i>Diaporthe</i> cf <i>heveae</i>	7,72 $\pm$ 0,6
9586	<i>Cladosporium colocasiae</i>	7,64 $\pm$ 0,72
9650	<i>Cladosporium colocasiae</i>	7,6 $\pm$ 0,16
9607	<i>Cladosporium</i> sp. 2	7,58 $\pm$ 1,3
9627	<i>Cladosporium</i> sp. 1	7,57 $\pm$ 0,32

9624	<i>Cladosporium</i> cf. <i>subuliforme</i>	7,49 ± 0,17
9619	<i>Schizophyllum commune</i>	7,48 ± 0,12
9614	<i>Aspergillus</i> sp.	7,45 ± 0,15
10057	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	7,07 ± 0,07
9626	<i>Cladosporium</i> cf. <i>subuliforme</i>	7,01 ± 0,41
9640	<i>Periconia</i> sp.	6,96 ± 0,45
9642	<i>Cladosporium</i> sp. 2	6,79 ± 0,48
9585	<i>Cladosporium</i> sp. 2	6,72 ± 0,27
9630	Não identificado	6,7 ± 0,21
9578	<i>Cladosporium</i> sp. 1	6,66 ± 0,39
10064	<i>Beauveria bassiana</i>	6,54 ± 1,53
9600	<i>Cladosporium</i> sp. 1	6,5 ± 0,18
9653	<i>Penicillium tardochrysogenum</i>	6,32 ± 1,04
9648	<i>Cladosporium colocasiae</i>	6,25 ± 2,03
9655	<i>Fusarium</i> sp.	6,17 ± 0,04
9588	<i>Cladosporium</i> cf. <i>exile</i>	6,14 ± 0,68
9592	<i>Cladosporium oxysporum</i>	6,1 ± 0
10067	<i>Penicillium fusisporum</i>	6,02 ± 0,55
9591	<i>Cladosporium</i> sp. 2	4,88 ± 0,81
9641	<i>Periconia</i> sp.	4,75 ± 0,03
9623	<i>Pleosporales</i> sp.	4,55 ± 1,13

^aUFMGCB = Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células de Minas Gerais.

Na literatura são reportados diferentes trabalhos de enzimas com atividades carragenolíticas bacterianas. Yao et al. (2013) avaliaram a produção de carragenase pela bactériamarinha *Cellulophaga lytica* N5-2 e após a purificação, a atividade específica da enzima foi de 1170 U/mg. Ma et al. (2013) clonou e expressou um novo gene de iota-carragenase de *Cellulophaga* sp. QY3, CgiB_Ce e obtiveram uma atividade específica de 1870 U/mg a 45 °C e pH 6,5. Já Liu et al. (2013) clonou e expressou um gene de kappa-carragenase obtido a partir de *Zobellia* sp. ZM-2 e o extrato bruto apresentou uma atividade específica de 3,17 U/mg a 45 °C e pH 6,5. A atividades específicas da enzima, número de unidade de enzima por miligrama de proteína, não foi determinada neste trabalho pois o meio de suplementação utilizado, Zobell Marine Broth/Himedia, contém 5 g/L de peptona na constituição e provavelmente superestimaria a quantidade de proteínas no extrato.

A comparação da atividade enzimática com dados da literatura, mesmo quando os resultados são apresentados em µmol ou µg de produto formado, é de extrema dificuldade, pois as definições das condições experimentais variam bastante e geralmente são definidas pelo experimentador. Nem sempre é imediato comparar atividades enzimática de diferentes ensaios (Pinto & de Menezes 2009). Sendo assim, como não há relatos de fungos produtores de carragenase e a maior parte dos trabalhos realizados com bactérias utilizam enzimas purificadas, testadas e produzidas em diferentes condições não é prudente comparar os dados obtidos com os dados das literaturas existentes.

5.4 Produção de carragenase por *Penicillium chrysogenum*

O fungo *P. chrysogenum* é extensivamente utilizado na produção do antibiótico penicilina (Ferrer et al. 2000). Além disso tem sido utilizado também na produção de diferentes enzimas tais como: lipases (Ferrer et al. 2000), amilases (Balkan & Ertan, 2007), pectinases (Banu et al. 2010), arabinase (Sakamoto et al. 2003), entre outras. Neste estudo o isolado *P. chrysogenum* UFMGCB 10066, melhor produtor dentre os isolados testados, foi escolhido para otimização das condições de reação e cultivo.

5.4.1 Efeito do pH e temperatura na reação enzimática

Para avaliar o pH ótimo da reação enzimática, a atividade carragenolítica do extrato enzimático do fungo *P. chrysogenum* UFMGCB 10066 foi primeiramente determinada nos pHs 4; 5; 6 e 6,5, a 40 °C. Posteriormente, ao encontrar o pH 6,5 como o melhor, a reação foi testada nas temperaturas 30, 40 e 50 °C. A 50 °C foi obtido a melhor atividade volumétrica.

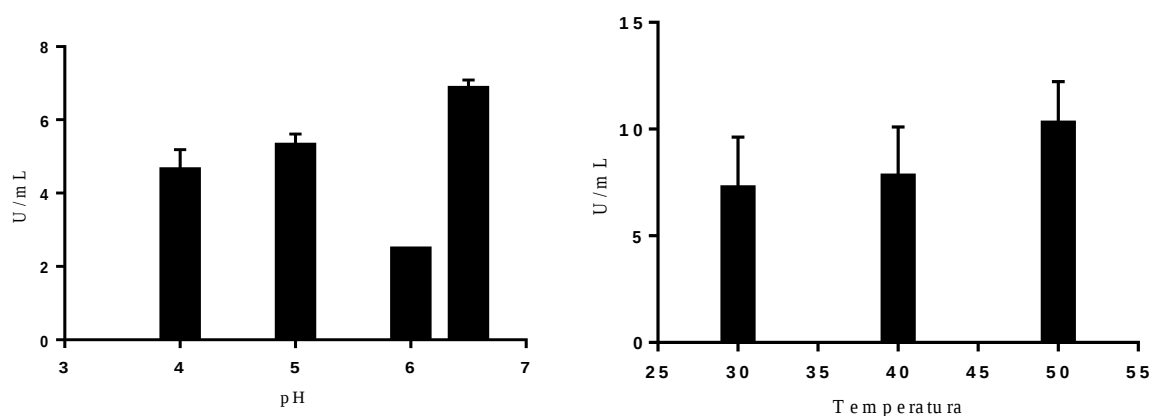


Figura 12 Efeito do pH e temperatura na hidrólise enzimática da carragenana. Atividade expressa em U/mL.

As carragenases bacterianas atuam numa ampla faixa de temperatura (28-75 °C). A maioria delas tem temperatura ótima entre 30-40 °C (Chauhan & Saxena 2016, Zhu & Ning 2016). O pH ótimo de atividade varia 5,6-8 (Chauhan & Saxena 2016). A **Tabela 8** apresenta alguns importantes trabalhos publicados nos últimos anos sobre as carragenases bacterianas e mostra os pHs e temperaturas ótimos da reação.

Tabela 8 Temperatura e pH ótimos de carrageenases bacterianas de diferentes micro-organismos.

Micro-organismo	Temperatura ótima de atividade (°C)	pH ótimo de atividade	Referência
<i>Bacillus</i> sp. Lc50-1	75	8	Li et al. 2014
<i>Cellulophaga lytica</i> strain N5-2	35	7	Yao et al. 2013
<i>Cellulophaga</i> sp. QY3	50	7	Ma et al. 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ZSL-2	28	8	Ziayoddin et al. 2014
<i>Pseudoalteromonas porphyrae</i> LL-1	55	8	Liu et al. 2011
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AJ5-13	55	8	Ma et al. 2010
<i>Pseudomonas carrageenovora</i> NCMB	40	8	Ostgaard et al. 1993

5.4.2 Otimização das condições de cultivo de *P. chrysogenum* UFMGCB 10066 para produção do extrato enzimático bruto da carragenase

A produção das carragenases é influenciada diretamente pelas condições de cultivo, por fatores nutricionais e físico-químicos, tais como tempo de cultivo, temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos, agitação e concentração oxigênio dissolvido (Ziayoddin et al. 2012). Uma alternativa para otimizar a produção de enzimas e tornar a produção industrialmente viável e comercialmente competitiva é utilizar o planejamento experimental e as análises estatísticas (Levin et al. 2008; Bonugli-Santos et al. 2016). O planejamento experimental reduz o número de experimentos e melhora a qualidade da informação obtida, resultando numa sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final (Rodrigues & Iemma, 2014). Desta forma, neste trabalho foi utilizado um planejamento composto central para a investigação de como a as condições de cultivo para a produção da carragenase depende do tempo (variável x_1 , em horas), temperatura (variável x_2 , em °C) e umidade (variável x_3 , em %), em que a variável resposta é a atividade enzimática em U.mL⁻¹).

A equação dos modelos ajustados é dada por: $\hat{Y} = 4,82 - 0,52 x_1 + 1,76 x_2 + 0,44 x_3 - 0,44 x_1 x_2 + 1,23 x_1 x_3 + 0,29 x_2 x_3 - 0,57 x_1^2 + 0,43 x_2^2 - 0,92 x_3^2$, onde $\hat{Y}$ é a resposta predita e x_1 , x_2 e x_3 os valores codificados.

A análise de variância deste modelo apresentou valor de $p < 0,05$, indicando que o modelo foi significativo. O valor de 89,04% (R^2) da variação foi explicada pelo modelo. Assim, a variação considerada pelo modelo é significativamente maior do que possíveis variações ao acaso. Logo, o modelo é confiável e adequado para a representação dos efeitos, relações e interações entre temperatura, tempo de cultivo e umidade, bem como para estimar a resposta em função destes fatores no intervalo estudado.

Analizando os gráficos de contorno (**Figura 13**) gerados a partir dos dados ajustados aos modelos preditivos, verifica-se que quanto maior a temperatura (x_2) e umidade (x_3) são obtida as maiores atividades. Outro aspecto interessante é a relação inversa entre temperatura (x_2) e tempo (x_1),

assim, rendimentos mais otimizados são obtidos com temperaturas mais elevadas e em menos tempo. Por fim, quando os fatores são decompostos, com a associação entre os fatores umidade (x3) e tempo (x1) (coluna do meio) não alcançamos o ponto máximo. Logo, a temperatura parece ser o fator mais importante (mas, não exclusivo) para aumentar a atividade enzimática.

O ponto de ótimo do modelo ajustado para todos os preditores foi de aproximadamente 9 dias; 10,8 °C e 77,8% de umidade. A produtividade enzimática da fermentação em estado sólido (FES), como todo processo biotecnológico, é definida pelo micro-organismo e as condições de cultivo (Castro & Pereira Júnior 2010), sendo que cada micro-organismo requer diferente tempo de incubação para a produção máxima de enzimas (Chauhan & Saxena 2016). Ziauddin et al. (2012) avaliaram a produção de carragenase por *Pseudomonas aeruginosa* ZSL-2, uma bactéria marinha, otimizando as condições da FES. A produção máxima de carragenase foi atingida no tempo de 48 h; após esse tempo de cultivo houve decréscimo da atividade. De maneira geral, o período de incubação para produção de enzimas varia de 48 h para bactérias e 5-14 dias para os fungos (Puri et al. 2002). Trivedi et al. (2015) estudaram o potencial do fungo marinho *Cladosporium sphaerospermum* na sacarificação da macroalga *Ulva fasciata* por meio da FES e encontraram uma atividade máxima de celulase com o teor de umidade em 60%. Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, consequentemente, à ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (Hölker et al. 2004). Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30 -85% (Castro & Pereira Júnior 2010; Zúniga et al. 2011).

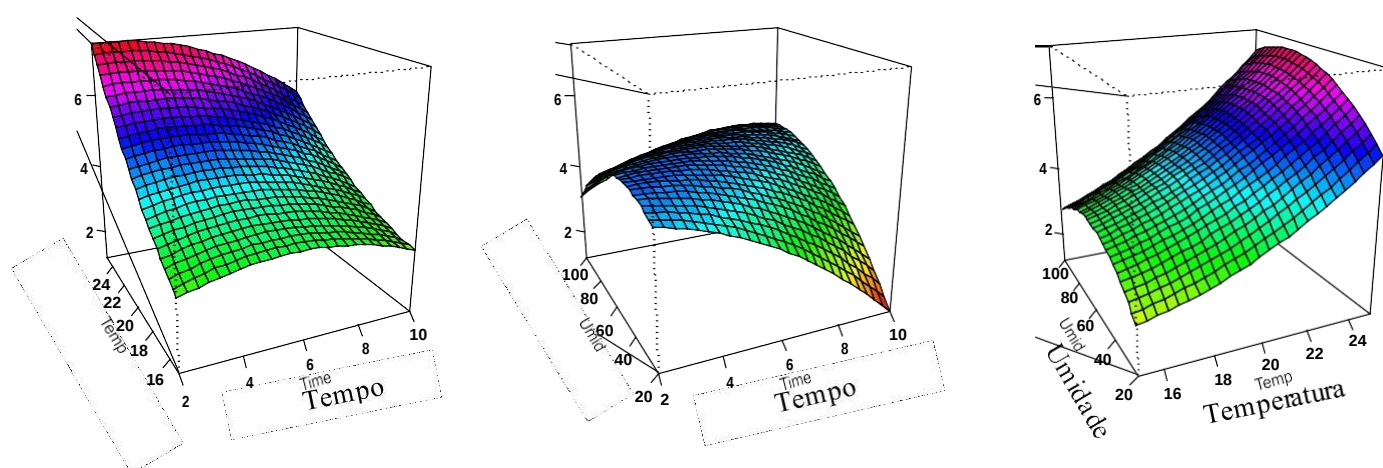


Figura 13 Gráficos de superfície de resposta gerados a partir dos dados ajustados ao modelo preditivo.

A matriz dos ensaios com os valores reais e codificados das variáveis estudadas bem como as respostas obtidas e previstas para a atividade volumétrica carragenolítica da carragenase (U) foram representados na **Tabela 9**.

Tabela 9 Matriz do delineamento experimental com os valores reais e previstos para a atividade volumétrica carragenolítica (U/mL).

	Tempo de cultivo (X ₁)	Temperatura em °C (X ₂)	Umidade % (X ₃)	Atividade real U/mL (Y ₁)	Atividade prevista U/mL
1	0 (6)	0 (20)	0 (60)	4,2	4,85
2	0 (6)	0 (20)	1,68 (100)	4,1	4,37
3	-1 (4)	1 (25)	1 (80)	6,93	7,21
4	-1,68 (2)	0 (20)	0 (60)	4,51	4,8
5	1 (8)	-1 (15)	1 (80)	2,94	3,49
6	1 (8)	1 (25)	-1 (40)	4,7	5,52
7	0 (6)	0 (20)	0 (60)	4,79	4,85
8	-1 (4)	-1 (15)	-1 (40)	2,88	3,42
9	1 (8)	-1 (15)	-1 (40)	2,96	2,73
10	1 (8)	1 (25)	1 (80)	7,36	6,86
12	-1 (4)	-1 (15)	1 (80)	3,74	2,96
13	-1 (4)	1 (25)	-1 (40)	7,61	7,09
14	1,68 (10)	0 (20)	0 (60)	4,02	3,76
15	0 (6)	0 (20)	0 (60)	5,52	4,85
16	0 (6)	0 (20)	-1,68 (20)	3,74	3,49

Neste trabalho, a fermentação submersa (FSm) da carragenana comercial resultou em uma atividade volumétrica carragenolítica de 17 U/mL, enquanto a atividade máxima obtida a partir da FES foi de 7,61 U/mL (**Tabela 9**). As carragenases têm sido produzidas por FSm na maioria dos estudos (Chauhan & Saxena 2016) assim como aproximadamente 90% dos preparados enzimáticos industriais (Castro & Pereira Júnior 2010; Singhania et al. 2010). Uma menor atividade pode ter sido obtida a partir do extrato do fungo *P. chrysoneum* UFMGCB 10066 a partir da FES pois a maior pureza da carragenana comercial pode ter favorecido a produção enzimática. Contudo, a FES ainda é vantajosa, pois, geralmente apresenta maior produtividade enzimática e um produto de melhor qualidade, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH. Desta forma, a FES é um processo relativamente simples e ambientalmente amigável (Pandey et al. 2001; Singhania et al. 2010).

5.4.3 Pré-tratamento com ácido cítrico e hidrólise enzimática

Para aumentar a sacarificação dos carboidratos das macroalgas vermelhas, processo que transforma os açúcares complexos em açúcares fermentáveis, o pré-tratamento da biomassa é essencialmente necessário pois aumenta a acessibilidade das enzimas e a solubilidade do substrato na água (Sambusiti et al. 2015). O pré-tratamento hidrotérmico ácido com ácido cítrico é simples, menos oneroso e ecologicamente amigável, pois não utiliza produtos químicos perigosos e gera poucos subprodutos tóxicos quando comparados aos ácidos fortes (Kwon et al. 2016), o que justifica a escolha desse tratamento neste trabalho. A **Tabela 10** mostra os açúcares redutores totais (g/L) obtidos a partir do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática.

Tabela 10 Açúcares redutores totais produzidos após pré-tratamento com ácido cítrico e hidrólise enzimática.

	Tempo de reação (h)	Temperatura (°C)	Açúcares redutores(g/L)
Pré-tratamento	1	120	4,1 ± 0,2
Hidrólise enzimática	24	50	5,8 ± 0,2
Total	-	-	9,9

Como observado na **Tabela 10**, foi obtido 4,1 g/L de açúcares redutores totais após a hidrólise ácida e 5,8 g/L após a hidrólise enzimática, totalizando-se 9,9 g/L ao final do do processo. Meinita et al. (2012) obtiveram 30,5 g/L de açúcares redutores totais utilizando H₂SO₄ 0,2 M por 15 minutos a 60 °C e 100 g/L de *K. alvarezii*. O aumento do tempo de hidrólise em 15 minutos resultou na diminuição da produção de açúcares redutores e galactose, sugerindo que tempos mais longos de reação resultam na degradação dos açúcares e consequentemente na produção de mais subprodutos inibidores tais como o ácido 5-hidroxi-metil-furfural e ácido levulínico. Khambhaty et al. (2012) alcançaram uma concentração de aproximadamente 15 g/L de açúcares de redutores, utilizando H₂SO₄ 0,9 M por 60 minutos a 100 °C e 50 g/L de *K. alvarezii*. Abd-Hahim et al (2014) obtiveram 34,28 g/L de açúcares redutores a partir de 80 g/L de *K. alvarezii* utilizando solução ácida H₂SO₄ 0,2 M a 110 °C por 90 minutos.

Tendo uma visão geral do processo, é possível perceber que o pré-tratamento com ácido cítrico e subsequente hidrólise enzimática não se mostrou eficiente quando comparado aos demais trabalhos. A utilização de um ácido orgânico fraco tal como o ácido cítrico não foi eficiente diante da grande complexidade estrutural da carragenana e pode não ter promovido a hidrólise das ligações glicosídicas (α -1,3). A utilização de um ácido forte tal como H₂SO₄, e alterações nas condições do pré-tratamento poderia otimizar o rendimento final.

6 Conclusões

O uso de macroalgas para produção de bioetanol enfrenta desafios técnicos e econômicos significativos e seu sucesso depende do desenvolvimento de métodos de pré-tratamento ambientalmente amigáveis, sistemas de enzimas eficazes e micro-organismos eficientes para converter açúcares fermentáveis a etanol. Com o intuito de contribuir para a viabilidade do processo de produção de bioetanol de terceira geração e ampliar o conhecimento sobre a diversidade, distribuição e a ecologia dos fungos algícolas, pode-se concluir, a partir deste trabalho, que:

As macroalgas são importantes reservatórios de fungos nos oceanos. Quarenta UTD foram obtidas a partir de *K. alvarezii* e 13 a partir das macroalgas antárticas, os quais pertencem majoritariamente ao filo Ascomycota. O gênero *Metschnikowia* foi predominante dentre os identificados nas macroalgas antárticas, por outro lado *Cladosporium* foi predominante em *K. alvarezii*.

As algas são fonte de uma elevada diversidade de fungos capazes de hidrolisar os constituintes das paredes das rodófitas. O teste colorimétrico em placa de Petri e o de atividade volumétrica demonstrou que uma proporção significativa de fungos foi capaz de hidrolisar a carragenana o que sugere que estes fungos possam desempenhar um importante papel ecológico na decomposição de matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes das macroalgas no ambiente marinho, base para utilização em processos biotecnológicos para obtenção de bioetanol de terceira geração.

O planejamento composto central foi útil na otimização das condições de cultivo para produção de carragenase. A partir do delineamento composto central foi possível determinar uma faixa ótima de produção e permitiu concluir que a temperatura é o fator que exerce maior influência na produção de carragenase. Várias combinações dos fatores podem ser utilizadas de modo a fornecer melhores resultados, o que permite a escolha de níveis mais econômicos dos fatores de interesse.

O pré-tratamento com ácido cítrico e subsequente hidrólise enzimática de K. alvarezii. O rendimento em açúcar redutor ao final do processo foi de 9,9 g/L, o qual não se mostrou eficiente quando comparado com outros trabalhos reportados na literatura. Este resultado mostra que seriam necessários a otimização de outros parâmetros para uma melhor hidrólise enzimática da biomassa.

Este é o primeiro relato de uma carragenase fúngica obtida a partir do fungo Penicillium chrysogenum por meio de uma fermentação em estado sólido de K. alvarezii. O fato da descoberta de fungos filamentosos capazes de secretar carragenase abre uma nova perspectiva para aplicação desses fungos na produção de etanol de terceira geração.

Por fim, mesmo que preliminar, este estudo demonstra que as algas são fonte de uma ampladiversidade de fungos capazes de hidrolisar os constituintes das paredes das macroalgas. As características bioquímicas únicas e específicas das enzimas marinhas, bem como o crescente interesse em aplicações biotecnológicas, especialmente nas indústrias de biocombustível e farmacêutica, evidencia o enorme potencial dos fungos associados às algas.

7 Referências bibliográficas

- ABD-RAHIM, F. et al. Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 309–315, 2014.
- ADAMS, J. M. et al. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 569–574, 2008.
- ADSUL, M. G. et al. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 1, p. 6–10, 2005.
- ARENZ, B. E. et al. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3057–3064, 2006.
- ARENZ, B. E. et al. Fungal diversity in Antarctic soils. In: **Antarctic Terrestrial Microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 35–53, 2014.
- ASK, E. I. et al. Three decades of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) introduction to non-endemic locations. **Proceedings International Seaweed Symposium**, v. 17, p. 49–57, 2003.
- ATEWEBERHAN, M. et al. Influence of environmental factors and farming technique on growth and health of farmed *Kappaphycus alvarezii* (cottonii) in south-west Madagascar. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 923–934, 2015.
- BEISNER, B.E et al. The Role of Environmental and Spatial Processes in Structuring Lake Communities from Bacteria to Fish. **Ecology**, v.87, p. 2985–2991, 2006.
- BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1–94, 2010.
- BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, n. 1, p. 1–401, 2012.
- BLOCK, William. Terrestrial ecosystems: Antarctica. **Polar Biology**, v. 14, n. 5, p. 293–300, 1994.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.
- BRENNAN, L. and OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRO, C. et al. Improvement of galactose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of phosphoglucomutase: example of transcript analysis as a tool in inverse metabolic engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6465–6472, 2005.
- BRUNATI, M. et al. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine genomics**, v. 2, n. 1, p. 43–50, 2009.
- CADETE, R. M. et al. Novel Yeast Strains from Brazilian Biodiversity: Biotechnological Applications in Lignocellulose Conversion into Biofuels. In: **Biofuels in Brazil**. Springer International Publishing, p. 255–279, 2014.
- CASTRO, A. M. and PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p.181–188, 2010.
- CHO, Y. et al. Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 6, p. 713–719, 2013.
- DHALIWAL, S. S. et al. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5968–5975, 2011.
- DE AQUINO, A. F. et al. O etanol da cana de açúcar: possibilidades energéticas da região de Ceará-Mirim-RN. **Holos**, v. 1, p. 105–125, 2014.

- DE FARIA, G. S. M. et al. Effect of drying temperature on carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) cultivated in Brazil. **Journal of Applied Phycology**, p. 917–922, 2013.
- DEAN, R. A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 980–986, 2005.
- DRAGONE, G. et al. Third generation biofuels from microalgae. **Applied Microbiology**, v. 2, p. 1355–1366, 2010.
- FARINAS, C. S. et al. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 810–815, 2010.
- FELL, J.W. and HUNTER, I. L. Isolation of heterothallic yeast strains of *Metschnikowia kamienski* and their mating reactions with *Chlamydozoma wickerham* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 34, n. 1, p. 365–376, 1968.
- FENG, Z. and LI, M. Purification and characterization of agarase from *Rhodococcus* sp. Q5, a novel agarolytic bacterium isolated from printing and dyeing wastewater. **Aquaculture**, v. 372, p. 74–79, 2013.
- FERREIRA et al. O Sistema do Tratado da Antártica: evolução do regime e seu impacto na política externa brasileira. **FUNAG**, 2009.
- FURBINO, L. E. et al. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 4, p. 1–13, 2014.
- GASPARATOS, A. et al. Sustainability impacts of first-generation biofuels. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 2, p. 12–26, 2013.
- GE, L. et al. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. **Renewable energy**, v. 36, n. 1, p. 84–89, 2011.
- GLASS, N. L. and DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.
- GODINHO, V. M. et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME journal**, v. 7, n. 7, p. 1434–51, 2013.
- GODINHO, V.M. et al. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, n. 3, p. 585–596, 2015.
- GOETTEL, M.S. et al. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 256–261, 2008.
- GOH, C. S. and LEE, K. T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and 10 sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 842–848, 2010.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808–810, 2007.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 15 p. 6, 2008.
- GOMES, R. R. et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, n. 1, p. 1–41, 2013.
- GONÇALVES, V. N. et al. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 459–471, 2012.
- GOH, C. S. and LEE, K. T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and 10 sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 842–848, 2010.
- GRADIŠAR, H. et al. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 196–200, 2000.

- HARGREAVES, P. I. et al. Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: evaluation of different process strategies. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 257–63, 2013.
- HARUN, R. et al. Algal biomass conversion to bioethanol - a step-by-step assessment. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 1, p. 73–86, 2014.
- HAYASHI, L. et al. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiales) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 337–343, 2010.
- HENARES, B. M. et al. Iota-carrageenan hydrolysis by *Pseudoalteromonas carrageenovora* IFO12985. **Philippine Journal of Science**, v. 139, p. 131–138, 2010.
- HÖLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175–186, 2004.
- HÖÖK, M. and TANG, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. **Energy Policy**, v. 52, p. 797–809, 2013.
- HYDE, K. D. et al. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodiversity & Conservation**, v. 7, n. 9, p. 1147–1161, 1998.
- JANG, S. et al. Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1953–1963, 2012.
- JENSEN, P. R. et al. Fungi in marine environments. **Fungal diversity**, v. 7, p. 293–315, 2002.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- JOUANNEAU, D. et al. Enzymatic degradation of hybrid iota-/nu-carrageenan by *Alteromonas fortis* iota-carrageenase. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 7, p. 934–940, 2010.
- JANG, Ji-Suk et al. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 1–2, p. 11–18, 2012.
- JUNG, K. A et al. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 182–90, 2013.
- KELLY, P. and JACK, C. Geopolítica, integración y conflicto en el Cono Sur y la Antártida. **Geopolítica del Cono Sur y la Antártida, Buenos Aires: Pleamar**, 1990.
- KHAMBHATY, Y. et al. *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 180–185, 2012.
- KIM, T. H. et al. Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulfuric acid-assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource technology**, v. 130, p. 306–313, 2013.
- KIRK, P. M. et al. Dictionary of the Fungi. 10^a. **Wallingford, UK**, 2008.
- KOHLMEYER, J. and KOHLMEYER, E. Marine Mycology. The Higher Fungi. 1979.
- KWON, O. M. et al. Production of sugars from macro-algae *Gracilaria verrucosa* using combined process of citric acid-catalyzed pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Algal Research**, v. 13, p. 293–297, 2016.
- LACHANCE, M. A. et al. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 2, p. 172–177, 1999.
- LEE, J. Y. et al. Pretreatment of *Laminaria japonica* for bioethanol production with extremely low acid concentration. **Renewable Energy**, v. 54, p. 196–200, 2013.
- LEE, K. et al. Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 3, p. 621–631, 2011.
- LEE, R. A. and LAVOIE, J. M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 2, p. 6–11, 2013.

- LEVIN, L. et al. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 207–214, 2008.
- LI, J. Y. et al. The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 259–264, 1998.
- LIECKFELDT, E. et al. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of basic microbiology**, v. 33, n. 6, p. 413–425, 1993.
- LIU, Z. et al. Molecular cloning, characterization, and heterologous expression of a new κ -carrageenase gene from marine bacterium *Zobellia* sp. ZM-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10057–10067, 2013.
- LOQUE, C. P. et al. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 641–648, 2010.
- MCRAE, C. F. et al. *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. **Polar Biology**, v. 21, n. 2, p. 97–111, 1999.
- MÁRQUEZ, S. S. et al. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. **Fungal diversity**, v. 33, p. 87–100, 2008.
- MAZARIS A.D. et al. Biogeographical patterns of freshwater microand macroorganisms: a comparison between phytoplankton, zooplankton and fish in the Eastern Mediterranean. **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 1341–1351, 2010.
- MEINITA, M. D. N. et al. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 20 4, p. 857–862, 2012.
- MEINITA, M. D. N. et al. Comparison of agarophytes (*Gelidium*, *Gracilaria*, and *Gracilariopsis*) as potential resources for bioethanol production. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 6, p. 1957–1961, 2013.
- MENEZES, C. B. A et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 2010.
- MEYER, G. H. et al. Bacteria, fungi and other biota in the vicinity of Mirny Observatory. **Antarct. JUS**, v. 2, p. 248–251, 1967.
- MERCANTINI, R. et al. Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil. **Mycopathologia**, v. 106, n. 1, p. 47–52, 1989.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOHR, A. and RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second-generation biofuels. **Energy policy**, v. 63, p. 114–122, 2013.
- MUTRIPAH, S. et al. Bioethanol production from the hydrolysate of *Palmaria palmata* using sulfuric acid and fermentation with brewer's yeast. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 687–693, 2013.
- NAIK, S. N. et al. Production of first and second-generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010.
- NEORI, A. et al. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. **Aquaculture**, v. 231, n. 1, p. 361–391, 2004.
- NILSSON, R. H. et al. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, p. 97–101, 2009.
- NUGENT, L. K. et al. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. **Mycologist**, v. 19, n. 1, p. 40–43, 2005.
- OGBONNA, J. C. et al. Scale up of fuel ethanol production from 10 sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 1–8, 2001.

- OGÓREK, R. et al. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. **Mikologia Lekarska**, v. 19, n. 2, p. 80–85, 2012.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **Asiatech Publishers**, New Delhi, India, 2001.
- PAULA, E. J. and PEREIRA, R. T. L. Da "marinomia" a maricultura da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* para produção de carragenanas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 8, p. 10–15, 1998.
- PELLIZZARI, F. and REIS, R. P. Seaweed cultivation on the southern and southeastern Brazilian coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 305–312, 2011.
- PINTO, G. F. and DE MENEZES, R. R. **Cinética enzimática**. Editora E-papers, 2009.
- PURI, S. et al. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, v. 44, p. 286–290, 2002.
- RAGAN, M. A et al. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 15, p. 7276–80, 1994.
- REDHEAD, S. A. et al. *Coprinus* Pers. and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. **Taxon**, p. 203–241, 2001.
- RODRIGUES, M. G. Energia e sustentabilidade no século XXI: O caso do brasil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 79, p. 60–79, 2012.
- RODRIGUES, M. I. and IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 3ª. **Campinas**, 2014.
- ROSA, L. H. et al. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 1, p. 178–189, 2010.
- RUDOLPH, E. D. and BENNINGHOFF, W. S. Competitive and adaptive responses of invading versus indigenous biotas in Antarctica ± a plea for organized monitoring. **Adaptations within Antarctic ecosystems, Smithsonian Institute, Washington DC**, p. 1211–1225, 1977.
- RUISE, S. et al. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1–3, p. 127–141, 2007.
- SAMBUSITI, C. et al. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 20–36, 2015.
- SCHULTZ-JENSEN, N. et al. Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol - comparison of five pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 140, p. 36–42, 2013.
- SEARCHINGER, T. et al. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1238–1240, 2008.
- SHIVAJI, S. and PRASAD, G. S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: **Yeast biotechnology: Diversity and applications**. Springer Netherlands, p. 3–18, 2009.
- SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541–549, 2010.
- SOLIS, M. J. L. et al. Marine-derived fungi from *Kappaphycusalvarezii* and *K. striatum* as potential causative agents of ice-ice disease in farmed seaweeds. **Botanica Marina**, v. 53, n. 6, p. 587–594, 2010.
- SOMMA, D. et al. Growing America's fuel: an analysis of corn and cellulosic ethanol feasibility in the United States. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 12, n. 4, p. 373–380, 2009.
- STCHIGEL, A. M. et al. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycological Research**, v. 105, n. 3, p. 377–382, 2001.

- STROBEL, G. et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v. 142, n. 2, p. 435–440, 1996.
- SURYANARAYANAN, T. S. Fungal endosymbionts of seaweeds. In: **Biology of Marine Fungi**. Springer Berlin Heidelbergp. 53–69, 2012.
- SURYANARAYANAN, T. S. et al. Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: Distribution, diversity and biotechnological potential. **Botanica Marina**, v. 53, n. 5, p. 457–468, 2010.
- SUTHERLAND, G. et al. New marine fungi on *Pelvetia*. **New Phytologist**, v. 14, n. 2-3, p. 33–42, 1915.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TAN, I. S. and LEE, K. T. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study. **Energy**, v. 78, p. 53–62, 2014.
- TAYCO, C. C. et al. Characterization of a κ -Carrageenase producing Marine Bacterium, Isolate ALAB-001 Bacterial isolate. **Philippine Journal of Science**, v. 142, p. 45–54, 2013.
- TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4406–4409, 2008.
- TERADA, R. et al. The effect of irradiance and temperature on the photosynthesis and growth of a cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae) from Vietnam based on in situ and in vitro measurements. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–11, 2015.
- THOMAS, S. E. et al. Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. **Mycological research**, v. 112, n. 7, p. 852–860, 2008.
- TOSI, S. et al. Fungi isolated from Antarctic mosses. **Polar Biology**, v. 25, n. 4, p. 262–268, 2002.
- TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182–196, 2010.
- TRIVEDI, N. et al. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. **Algal Research**, v. 9, p. 48–54, 2015.
- USOV, A. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 301–308, 1998.
- VAZ, A. B. M. et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 937–947, 2011.
- VÁZQUEZ-DELFIN, E. et al. Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). **Journal of applied phycology**, v. 26, n. 2, p. 901–907, 2014.
- VIEIRA, M. L. A et al. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell.(Solanaceae). **Canadian journal of microbiology**, v. 58, n. 1, p. 54–66, 2011.
- WEI, N. et al. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 70–7, 2013.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315–322, 1990.
- WI, S. G. et al. The potential value of the seaweed *Ceylon moss* (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6658–60, 2009.
- WORAPATTAMASRI, J. et al. Anamorphs of *Cochliobolus* on disease plants in Southern Thailand. **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 1, p. 143–155, 2009.
- WU, F. et al. Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from *Gracilaria* biomass. **Bioresource technology**, v. 156, p. 123–131, 2014.

- YAO, Z. et al. Characterization of a κ -carrageenase from marine *Cellulophaga lytica* strain N5-2 and analysis of its degradation products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 24592–24602, 2013.
- YUN, E. J. et al. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. **Bioresource technology**, v. 199, p. 311–318, 2016.
- YUN, E. J. et al. The novel catabolic pathway of 3, 6-anhydro-L-galactose, the main component of red macroalgae, in a marine bacterium. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 5, p. 1677–1688, 2015.
- ZHU, B. and NING, L. Purification and Characterization of a New κ -Carrageenase from the Marine Bacterium *Vibrio* sp. NJ-2. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 255–262, 2016.
- ZIAYODDIN, M. et al. Orthogonal Array Approach for Optimization of Carrageenase Production by Solid State Fermentation of *Pseudomonas aeruginosa* ZSL-2. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 4, p. 96–102, 2012.
- ZUCCARO, A. et al. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 4, p. 931–941, 2008.
- ZÚNIGA, U. R. et al. Produção de celulases por *aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 912–919, 2011.