**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Expressão heteróloga de celulasas por biblioteca metagenômica do
solo da Caatinga**

Mírian Lobo Sáber

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Mírian Lobo Sáber
Mestra em Ciências

**Expressão heteróloga de celulasas por biblioteca metagenômica do solo da
Caatinga**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Sáber, Mirian Lobo

Expressão heteróloga de celulasas por biblioteca metagenômica do solo da Caatinga /
Mirian Lobo Sáber. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. --
Piracicaba, 2015.
109 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Complexo enzimático 2. Enzimas celulolíticas 3. Metagenoma 4. Termoestabilidade
5. Semiárido I. Título

CDD 631.46
S115e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedicatória

*Aos meus pais **Angela Maria Pereira Sáber** e **Francisco de Fátima Sáber**, pelo amor incondicional, apoio, compreensão, pela minha formação e por serem meus exemplos de vida.*

Ofereço

*Aos meus avôs **José Sáber** e **Sebastião Pereira**, pelos anos de muito amor e que com certeza estão orando por mim em algum lugar. Saudades!*

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento de qualquer trabalho sempre necessitará do auxílio de outras pessoas, seja direta ou indiretamente. E este auxílio é sempre essencial para o sucesso e para o crescimento de quem está sendo ajudado. Diante disso, utilizo deste pequeno espaço para agradecer de coração as pessoas que me ajudaram a realizar o presente trabalho:

- Ao **Prof. Dr. Itamar Soares de Melo**, pela orientação, apoio, ensinamentos e pelo privilégio de fazer parte da sua equipe de pesquisa;
- À **Prof. Dra. Valéria Maia, Daniela Domingos** e a todos do **CPQBA** pelo suporte e colaboração na montagem da Biblioteca.
- Aos meus pais **Angela e Francisco**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e acreditando no meu potencial, minhas irmãs **Gisselly e Fernanda**, e meus amados sobrinhos **Isabella, Caíque, Caio, Mateus e Arthur**. Obrigada por fazerem parte da minha vida!
- Aos queridos amigos que estão ou que já passaram pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente (LMA);
- Aos técnicos do LMA: **João Luiz da Silva, Roseli S. Nascimento, Márcia Maria Parma, Elke S. D. Vilela**, pela ajuda durante todo o trabalho e pelas análises realizadas.
- À **EMBRAPA Meio Ambiente** pelo suporte para a realização do meu trabalho
- À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro.

A **todos** aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

"O conhecimento amplia a vida. Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede desfrutar".

(Carlos Bernardo González Pecotche)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Enzimas Celulolíticas e Aplicação Biotecnológica.....	25
2.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose.....	29
2.2.1 Efeito do pH.....	30
2.2.2 Efeito da Temperatura.....	31
2.2.3 Termoestabilidade Enzimática	31
2.3 O Uso da Biomassa como Fonte de Energia Renovável	33
2.4 O Bioma Caatinga: fonte de extremófilos.....	35
2.5 Metagenômica Microbiana	38
2.5.1 Análise baseada em sequências.....	40
2.5.2 Análise baseada em função	40
2.6 Produção de Enzimas Recombinantes em Escherichia coli.....	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Coleta de solo da Caatinga	45
4.2 Extração de DNA de alto peso molecular do solo	46
4.2.1. Extração por Freeze-Thaw.....	46
4.2.2 Extração pelo kit PowerMax® Soil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.).	46
4.2.3 Extração pelo método CTAB-SDS	46
4.3 Purificação do DNA com Cloreto de Césio.....	47
4.4 Eletroforese em gel de agarose	47
4.5 Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).....	48
4.6 Purificação com Gelase.....	48
4.7 Reação de End-Repair	48
4.8 Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo	49

4.9 Reação de Ligação	49
4.10 Reação de Empacotamento	50
4.11 Transfecção	50
4.12 Seleção, cultivo e estoque dos clones	50
4.13 Extração de Fosmídios	50
4.14 Teste Bioquímico para produção de Celulase em placa de petri.....	51
4.15 Quantificação de Enzimas Celulolíticas	51
4.15.1 Celulase Total	52
4.15.2 Endoglicanase	52
4.15.3 β -glicosidase	53
4.16 Efeito da temperatura, pH e Termoestabilidade sobre a atividade de hidrólise das Enzimas Celulolíticas	54
4.17 Extração e sequenciamento do DNA fosmidial	54
4.18 Montagem dos contigs e anotação dos genes.....	55
4.19 Análise de proteínas em gel desnaturante de Poliacrilamida – SDS PAGE ...	55
4.19.1 Procedimentos	56
4.19.2 Corrida eletroforética	56
4.19.3 Coloração com azul de Coomassie	56
4.20 Cromatografia de troca aniônica	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Extração de DNA de alto peso molecular	59
5.3 Reação de Ligação	60
5.4 Empacotamento e Transfecção	60
5.5 Extração de Fosmídios	61
5.6 Teste Bioquímico para Produção de Celulases em Placa de Petri.....	61
5.7 Quantificação de Enzimas Celulolíticas	63
5.7.1 Pré-seleção dos clones positivos.....	63
5.7.2 Cinética Enzimática	65
5.7.3 Dosagem das enzimas: celulase total, endoglicanase e β -glicosidase.....	65
5.8 Determinação da produção de celulases em diferentes substratos.....	69
5.9 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto	70

5.9.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de hidrólise das Enzimas Celulolíticas	70
5.9.2 Termoestabilidade das Enzimas Celulolíticas	74
5.10 Características Gerais dos Fosmídios.....	76
5.10.1 Montagem das sequências.....	76
5.10.2 Características gerais dos fosmídios.....	76
5.11 Anotação do Fosmídio E11	78
5.12 Anotação do Fosmídio A8	82
5.13 Caracterização do Perfil Enzimático.....	86
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS.....	95

RESUMO

Expressão heteróloga de celulases por biblioteca metagenômica do solo da Caatinga

Os micro-organismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas. Uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares, que ajudam na degradação da matéria orgânica e são cada vez mais procuradas e exploradas pela indústria. Essa propriedade aumenta a busca por enzimas que possam ser utilizadas nos diversos setores industriais com maior aproveitamento e baixo custo. A celulase pertence a essa classe de enzimas e é formada por um complexo multienzimático capaz de hidrolisar celulose por meio da quebra da ligação β ,1-4. A partir dessa característica da celulase, foi realizada uma expressão heteróloga relacionada com a hidrólise da celulose em biblioteca metagenômica de solo da Caatinga. Foram realizados testes de produção enzimática por meio dos quais selecionamos os clones 283/A8 e 307/E11 como melhores produtores de endoglicanases. Com o objetivo de analisar a cinética de produção de celulases pelos clones, estes foram inoculados em diferentes fontes de celulose, pH e temperatura. A faixa ideal de pH foi 5,0 e de temperatura, 50° C, verificada para as enzimas Celulase Total, Endoglicanase e β -glicosidase. Quanto à termoestabilidade, as enzimas presentes mantiveram mais de 60% da atividade inicial após 2 horas de incubação a 50° C. O perfil de proteínas analisado por SDS-PAGE demonstrou que os clones secretam um conjunto de enzimas celulolíticas com 25 a 100 KDa, quando cultivado em farelo de trigo, e 30 a 60 KDa, quando cultivados em CMC. No ensaio de cromatografia para o clone 307/E11, foram selecionadas 5 frações que obtiveram melhores resultados na dosagem enzimática e testados frente ao pH e à temperatura. O resultado obtido foi que o complexo enzimático bruto, extraído do sobrenadante produzido pelo clone, possui melhor atividade frente ao pH e à temperatura do que as frações parcialmente purificadas.

Palavras-chave: Complexo enzimático; Enzimas celulolíticas; Metagenoma; Termoestabilidade; Semiárido

ABSTRACT

Cellulase heterologus expression from metagenomic library of the soil of Caatinga

Microorganisms are distinguished by a wide genetic diversity and they perform unique and crucial functions concerning the maintenance of ecosystems. One of those functions is the production of extracellular enzymes, which help in the degradation of organic matter and which are increasingly wanted and explored by industry. Such feature boosts the search of enzymes that can be exploited in several industrial sectors with improved full use and low cost. Cellulase belongs to such class of enzymes and it is composed of a multi-enzymatic complex which is able to hydrolyse cellulose through the breaking of the chemical bond β ,1-4. Considering such attribute of the cellulase, a heterologous expression, related to cellulose hydrolysis in a metagenomic inventory of the soil of Caatinga, was realized. Tests of enzymatic production were performed, and through them, we could elect the clones 283/A8 and 307/E11 as the best endoglycanase producers. Those clones were inoculated in different cellulose sources, pH and temperature, so that we could analyse the kinetic of cellulase production between them. The ideal pH range was 5.0 and the ideal temperature range was 50° C (122° F), verified for the enzymes Total Cellulase, Endoglycanase and β -glucosidase. With regard to thermostability, the present enzymes kept more than 60% of the initial activity after 2 hours of incubation at 50° C (122° F). The proteins profile analysed with the help of SDS-PAGE proved that the clones secrete a group of cellulolytic enzymes with a weight average of 25 to 100 KDa, when cultivated in wheat bran, and of 30 to 60 KDa, when cultivated in CMC. Five fractions with the best results, regarding enzymatic dosage and tested before pH and temperature, were chosen by the chromatography research for the clone 307/E11. The achieved result proved that the raw enzymatic complex, extracted from the supernatant produced by the clone, develops a better activity before pH and temperature than the fractions partially purified.

Keywords: Enzymatic complex; Cellulolytic enzymes; Metagenomics; Thermostability; Semiarid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediada por CBMs (ARANTES; SADDLER, 2010).....26
- Figura 2 – Modelo de sinergia das endoglicanases e celobiohidrolases durante a hidrólise da celulose. Neste modelo, as endoglicanases fazem cortes internos na parte amorfa das microfibrilas de celulose e, assim, fornecem novas cadeias terminais para as exoglicanases hidrolisarem a celulose (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988)..... 27
- Figura 3 – Representação esquemática adaptada da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose (Adaptado de TÉBEKA et al., 2009)..... 29
- Figura 4 – Esquema da atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da celulose. Fonte: (adaptado de CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).....30
- Figura 5 – Mapa da América do Sul, com representação dos biomas brasileiros. Demonstrando os limites do bioma Caatinga. Fonte: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>.....36
- Figura 6 - Modelo esquemático de um estudo com abordagem metagenômica (Adaptado de HANDELSMAN, 2004)39
- Figura 7 – Ponto de coleta de solo. Os círculos vermelhos representam os cinco pontos de coleta dentro de uma área demarcada de 1m². - As cinco amostras foram misturadas e homogeneizadas para posterior extração do DNA metagenômico.....45
- Figura 8 – Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pCC2FOS™ (Epicentre)49
- Figura 9 – Gel de eletroforese 0,8%. 1. DNA do fago λ 50 ng; 2. λ 100 ng; 3. DNA obtido do solo da Caatinga, (Ponto 2 - Serra da Capivara) pelo método *Freeze-Thaw*, e 4. DNA obtido do solo da Caatinga, (Ponto 2 - Serra da Capivara) através do método *CTAB-SDS*.....59
- Figura 10 - Gel de eletroforese 0,8%. 1. DNA do fago λ 50 ng; 2. λ 100 ng; 3. DNA obtido do solo da Caatinga (Ponto 2- Serra da Capivara) pelo kit PowerMax® Soil, (MoBio – Laboratories, Inc.)60

Figura 11 - Gel de PFGE 1%. 1. High MW DNA Markers (Invitrogen™); 2. Extração de DNA obtido do solo da Caatinga (Ponto 2 – Serra da Capivara) pelo kit PowerMax® Soil, (MoBio – Laboratories, Inc.).....	60
Figura 12 – Placa de petri contendo os clones obtidos após a transfecção.....	60
Figura 13 - Análise do perfil dos fasmídios em gel PFGE 1%. 1- Fasmídio; 2-14 – amostragem dos clones.....	61
Figura 14 – Teste de produção de celulase. Os halos “amarelos” ao redor dos clones indicam que os mesmos produziram celulase. Os clones foram testados em triplicata.....	62
Figura 15 – Curva de crescimento dos clones 249/G12, 259/D2, 283/A8, 307/E11..	64
Figura 16 – Atividade enzimática dos clones 249/G12, 259/D2, 283/A8, 307/E11 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....	64
Figura 17 – Atividade de Celulase Total produzida pelo clone 307/E11 utilizando papel de filtro como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....	65
Figura 18 – Atividade de Celulase Total produzida pelo clone 283/A8 utilizando papel de filtro como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....	66
Figura 19 - Atividade de Endoglicanase produzida pelo clone 307-E11 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....	66
Figura 20 - Atividade de Endoglicanase produzida pelo clone 283/A8 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....	67
Figura 21 - Atividade de β -glicosidase produzida pelo clone 307/E11 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....	67

- Figura 22 - Atividade de β -glicosidase produzida pelo clone 283/A8 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$).....68
- Figura 23 – Produção enzimática do clone 307/E11 de acordo com a variação do pH. Cada quantificação representa a média das triplicadas.....71
- Figura 24 – Produção enzimática do clone 283/A8 de acordo com a variação do pH. Cada quantificação representa a média das triplicadas.....71
- Figura 25 – Efeito da temperatura sobre atividade das enzimas do clone 307/E11. A atividade foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas seguidas do ensaio enzimático. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade relativa das enzimas.....72
- Figura 26– Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas do clone 283/A8. A atividade foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas seguidas do ensaio enzimático. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade relativa das enzimas.....72
- Figura 27 – Termoestabilidade das enzimas produzidas pelo clone 307/E11.....74
- Figura 28 – Termoestabilidade das enzimas produzidas pelo clone 283/A8.....75
- Figura 29 – Representação esquemática do inserto totalmente sequenciado do fosmídio E11 derivado da biblioteca metagenômica.....79
- Figura 30 - Representação esquemática do inserto totalmente sequenciado do fosmídio A8 derivado da biblioteca metagenômica.....82
- Figura 31 - Análise eletroforética do sobrenadante da cultura dos clones 307/E11 e 283/A8 em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado com Comassie Blue Coloidal. Em M, o marcador de peso molecular Unstained Protein Marker da Fermentas®, com o tamanho de suas bandas indicados à esquerda. EM A e B, o sobrenadante da cultura em farelo de trigo, sendo os clones 283/A8 e 307/E11 respectivamente. Em C e D, o sobrenadante da cultura em CMC, sendo os clones 283/A8 e 307/E11 respectivamente.....87
- Figura 32 – Cromatografia de troca iônica das proteínas do clone 307/E11. A amostra foi concentrada com sulfato de amônio e separada em resina trocadora aniônica High-Q (Bio-Rad) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e eluída no mesmo tampão com NaCl 0,5 M.

A amostra foi aplicada em fluxo de 1 mL min⁻¹ (1 a 10 min) e a eluição foi efetuada a 2 mL min⁻¹ (10 a 8 min). A atividade de endoglicanase está representada como glicose liberada.....88

Figura 33 - Atividade enzimática as frações do clone 307/E11 de acordo com a variação do pH. Cada quantificação representa a média das triplicadas.....89

Figura 34 - Efeito da temperatura sobre atividade enzimática das frações do clone 307/E11. A atividade foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas seguidas do ensaio enzimático. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade relativa das enzimas.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade enzimática ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$), relativa a cada enzima, dos clones 307/E11 e 283/A8.....	69
Tabela 2 – Resumo das características gerais dos dois fosmídios analisados.....	76
Tabela 3 – Resumo do número total de ORFs encontradas para cada fosmídio atribuídas em categorias COG estabelecidas.....	77
Tabela 4 – ORFs anotadas do fosmídio E11 proveniente da biblioteca metagenômica.....	80
Tabela 5 – ORFs anotadas do fosmídio A8 proveniente da biblioteca metagenômica.....	83
Tabela 6 – Atividade enzimática das frações obtidas do clone 307/E11 por cromatografia.....	88

1 INTRODUÇÃO

O uso de micro-organismos e enzimas microbianas no processamento de materiais naturais tem uma longa tradição. Esta capacidade de exploração de biossintéticos microbianos, de qualquer modo, foi inconsciente e facilitada pela ubiquidade dos micro-organismos. Consequentemente, hoje em dia, as enzimas são usadas como “chaves” de ativação de componentes detergentes, em vários alimentos industrializados, manufatura de papel e produção de bioetanol (SARANRAJ et al., 2012).

Para acessar o recurso genético da vasta maioria das espécies microbianas que há muito tempo têm escapado dos exames minuciosos científicos, uma nova abordagem denominada metagenômica começou a ser usada (HANDELSMAN et al., 1998). Esta estratégia abrange a extração direta do DNA genômico de amostras do ambiente. Os resultados são bibliotecas metagenômicas, que servem como uma base para examinar vias metabólicas; analisar a diversidade microbiana; e identificar genes codificadores de proteínas de interesse biotecnológicos (RONDON et al., 2000).

A diversidade microbiana representa o mais vasto repertório genético do planeta. Entretanto, apenas uma pequena fração dessa diversidade é conhecida. Os micro-organismos direcionam os principais ciclos biogeoquímicos e por isso desempenham funções ecológicas indispensáveis no ambiente, como o ciclo do carbono. A microbiologia ambiental foi revolucionada na década de 90 pelo avanço das técnicas moleculares que proporcionaram a identificação de uma maioria microbiana até então não identificada pelos métodos de cultivo tradicionais. O sequenciamento massivo tem proporcionado a caracterização de organismos não cultivados que compõem as comunidades microbianas.

A caracterização dos micro-organismos não-cultiváveis, utilizando-se de métodos moleculares e análises filogenéticas a partir de sequências de DNA é, portanto, uma nova abordagem para identificar e conhecer suas distribuições e funções no meio ambiente. Esses novos métodos de detecção de micro-organismos, sem necessidade de cultivá-los estão contribuindo e contribuirão ainda mais para interferências inéditas sobre o significado dos mesmos nos solos (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

Prévios estudos têm demonstrado que a análise metagenômica oferece uma combinação quase ilimitada para encontrar novos genes codificadores de produtos gênicos relevantes, onde o comércio global das indústrias de enzimas está estimado em 2,3 bilhões de dólares (LORENZ; ECK, 2005).

Ainda com o interesse industrial milhares de toneladas de resíduos agrícolas são geradas no processamento de matérias-primas de diversas culturas e parte desses materiais não tem aplicação específica e gera problemas ambientais de contaminação provenientes de práticas como queima a céu aberto, abandono ou enterro desses resíduos pelos agricultores.

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma fonte de matéria prima praticamente sub-explorada em processos biotecnológicos, onde a conversão destes materiais em açúcares fermentescíveis para produção de combustíveis vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol visando atender à demanda mundial (SANTOS et al., 2011).

Recentemente, muita atenção tem sido dada à bioprocessos termofílicos de biomassa celulósica para os biocombustíveis que, devido ao uso de temperaturas elevadas, oferece várias vantagens potenciais, tais como (i) uma melhor hidrólise de substratos celulósicos, (ii) maior taxa de transferência de massa que levam a melhor solubilidade do substrato, (iii) reduz o risco de contaminação potencial, e (iv) aumento da flexibilidade no que diz respeito à concepção do processo, melhorando assim a economia global. No entanto, a celulose recalcitrante à biodegradação coloca vários dos principais estrangulamentos da digestão termofílica da biomassa com uma sendo a falta de celulasas robustas que podem funcionar de forma eficiente a elevadas temperaturas. Assim, as bactérias termofílicas que degradam a celulose têm um grande potencial para o desenvolvimento de viáveis tecnologias para a produção de combustíveis alternativos a partir da agricultura, silvicultura e resíduos celulósicos (BOUZAS et al., 2006).

Atualmente a descoberta de novas enzimas termoestáveis e de baixo custo é um dos maiores obstáculos na comercialização de novas enzimas. Sendo assim, a produção enzimática a partir de fontes diversificadas, como os resíduos agroindustriais, pode reduzir os custos de produção. Dessa forma, o enfoque principal deste estudo está baseado na produção de celulasas termofílicas e termoestáveis através da biblioteca metagenômica do solo da Caatinga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas Celulolíticas e Aplicações Biotecnológicas

As celulasas constituem o grupo de enzimas capazes de degradar a estrutura da celulose, o biopolímero mais abundante do ambiente terrestre (LESCHINE, 1995), sendo este o segundo maior grupo de carboidrases explorado comercialmente, isto principalmente devido à grande especificidade e eficiência catalítica encontradas neste grupo de enzimas (ANGELO, 2004). De modo geral, a degradação da celulose ocorre pela indução de três tipos de enzimas: endo-1,4- β -D-glicanase, exo-1,4- β -D-glicanase e β -glicosidase (ou celobiose) (HAMADA et al., 1999). Este complexo enzimático tem grande importância no funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo essencial em processos como a ciclagem de matéria orgânica.

As enzimas celulolíticas são compostas por pelo menos dois domínios distintos: um domínio catalítico e um domínio de ligação ao carboidrato (CBM). O CBM é o responsável pela adesão das enzimas na fibra de celulose entre outras funções como: concentração de enzima na superfície do substrato; direcionar e identificar/selecionar o substrato; e o desmembramento do substrato cristalino não hidrolisável (Figura 1) (JORGENSEN et al., 2005).

Figura 1 – Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediada por CBMs (ARANTES; SADDLER, 2010)

Este complexo enzimático é um sistema baseado em enzimas celulolíticas “livres”, que agem sinergicamente para completar a degradação da celulose. Este sistema de enzimas é constituído por endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) responsável pela hidrólise glicosídica (Figura 2) (BÉGUIN, 1990; DEMAINE et al., 2005; FENG et al., 2007).

Figura 2 – Modelo de sinergia das endoglicanases e celobiohidrolases durante a hidrólise da celulose. Neste modelo, as endoglicanases fazem cortes internos na parte amorfa das microfibrilas de celulose e, assim, fornecem novas cadeias terminais para as exoglicanases hidrolisarem a celulose (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988)

A endoglicanase (EG) hidrolisa aleatoriamente as regiões amorfas da cadeia polissacarídica da celulose, gerando novos oligossacarídeos de tamanhos variados. A exoglucanase (CBH) atua nas regiões redutoras e não redutoras, liberando glicose ou celobiose, sua atuação pode ainda acarretar um desgaste da estrutura microcristalina da celulose. Já a β -glucosidase, hidrolisa os oligossacarídeos e celobioses em glicose (LYND et al., 2002).

Em um ecossistema tipicamente degradador de celulose como o solo, uma variedade de micro-organismos trabalha em conjunto para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis, principalmente celobiose e glicose, que são então assimiladas pelas células. A decomposição da celulose pode ocorrer tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Bactérias anaeróbicas desenvolveram um sistema altamente sofisticado e complexo para a degradação deste polímero chamado de celulossoma (BAYER et al., 2008). Celulossomas são complexos multienzimáticos produzidos por várias bactérias celulolíticas. O primeiro exemplo desta estrutura foi descoberto na bactéria anaeróbia termofílica, *Clostridium thermocellum* (BAYER et al., 2008; LAMED et al., 1983).

As hidrolases compreendem aproximadamente 75% do total de enzimas comercializadas, incluindo celulasas, amilases e hemicelulasas, constituindo o segundo maior grupo, após as proteases (MELO, 2010).

As principais aplicações industriais de celulasas estão na indústria de tecidos, onde são empregadas nas fases de fiação, tingimento e acabamento do tecido. Além disso, são usadas em rações animais para melhorar a qualidade nutricional e digestibilidade, no processamento de sucos de frutas, e na cozinha. Uma área desafiadora, onde as celulasas teriam um papel central é a bioconversão de biomassa celulósica renovável em produtos químicos (IBRAHIM et al., 2007).

A empresa *The Feedonia Group Inc.*, especializada em pesquisa de Mercado no ramo industrial, elaborou um estudo “World Enzymes Market” no qual indica que a demanda mundial por enzimas terá um crescimento de 6,3% por ano e alcançará a marca de quase 7 bilhões de dólares em 2017. A demanda será impulsionada pelo aumento da renda per capita nos países em desenvolvimento, o que resultará em fortes ganhos de enzimas associadas com a produção de alimentos, bebidas, produtos de limpeza e rações para animais.

No Brasil, em 2005, as importações de enzimas chegaram a US\$ 31 milhões e as exportações a US\$ 3 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país, embora apresente um enorme potencial para produzi-las, por dois motivos em especial: abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como palha de arroz, soro de leite, bagaço de cana, entre outros, que constitui substrato de baixo custo para fermentações e a enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial (LADEIRA, 2009).

O fator limitante para o desenvolvimento de um processo enzimático de hidrólise é o custo monetário. O maior fator é a produção das enzimas celulolíticas e é necessária uma otimização no processo para o baixo custo, com o desenvolvimento de cepas microbianas de alta produtividade, melhoramento da produção e hidrólise das enzimas tanto quanto a reciclagem das enzimas para um melhor aproveitamento (ENARI, 1983; TANAKA, 1981). O custo da enzima é estimado em aproximadamente 50% do custo do processo de hidrólise total, sendo considerado um grande obstáculo para sua comercialização (WALKER e WILSON, 1991; EVELEIGH, 1987).

2.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose

Diversas pesquisas foram completadas em relação à conversão de materiais lignocelulósicos em etanol nas últimas duas décadas. A conversão inclui dois processos: hidrólise da celulose em materiais lignocelulósicos para fermentação de açúcares redutores e a fermentação do açúcar em etanol. A hidrólise é usualmente catalisada pela celulase e a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias.

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose incluem substratos, a atividade da celulase e condições de reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). A susceptibilidade dos substratos celulósicos depende das características estruturais do substrato, incluindo cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, área de superfície (porosidade) e conteúdo de lignina (McMILLAN, 1994).

Na hidrólise da celulose atua um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endo-1,4- β -Dglucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4- β -Dglucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- β -D-glucosidades que hidrolisam a celobiose à glicose (Figura 3) (WYMAN et al., 2005).

Figura 3 – Representação esquemática adaptada da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose (TÉBEKA et al., 2009)

A endoglicanase é a celulase que inicia a hidrólise, ela hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica liberando vários oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização, a exoglicanase atua nas extremidades redutoras e não redutoras dos oligossacarídeos, formando principalmente moléculas de celobiose. O terceiro

grupo, a β -glicosidase hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (Figura 4) (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Figura 4 – Esquema da atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da celulose. Fonte: (adaptado de CASTRO; PEREIRA Jr, 2010)

O conhecimento da maquinaria enzimática utilizada pelos micro-organismos para a hidrólise da biomassa oferece novas alternativas para o desenvolvimento de processos que podem ser aplicados em escala industrial para a liberação de açúcares da parede celular vegetal (RUBIN, 2008). A diversidade da composição da parede celular vegetal está diretamente relacionada com a diversidade de enzimas secretadas pelos micro-organismos para que a desconstrução da parede celular vegetal ocorra de forma eficiente (FARINAS, 2011).

Existem na literatura vários relatos de isolamento e caracterização de genes codificadores de celulasas (HEALY et al., 1995; PALACKAL et al., 2007; KIM et al., 2008), lipases, esterases, antibióticos, entre outros (ELEND et al., 2006; LEE et al., 2007; IBRAHIM et al., 2007; VAZQUEZ et al., 2008) em bibliotecas metagenômicas de distintos ambientes. Sabe-se a partir de tais estudos que ambientes distintos selecionam genes específicos que codificam para diferentes celulasas.

2.2.1 Efeito do pH

As enzimas são sensíveis às variações da concentração de H^+ do meio, e cada enzima possui um pH ótimo porque, como outras proteínas, estas possuem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácido da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de

união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Isto pode induzir uma troca na velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$), uma troca na afinidade da enzima pelo substrato (K_m) ou uma alteração na estabilidade da enzima. De forma similar, os grupos ionizáveis do substrato podem ser afetados pelo pH, já que possuem estados de ionização diferentes, de acordo com o pH, influenciando a formação do complexo enzima-substrato (THYS, 2004).

2.2.2 Efeito da Temperatura

Sabe-se que, de maneira análoga ao pH, existe uma zona de temperatura para qual a atividade enzimática é máxima. Esta variação da atividade enzimática em função da temperatura é resultado de duas tendências antagônicas. De um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e de outro, a desnaturação da enzima, frente à ação do calor. A desnaturação da proteína leva tempo para ocorrer, mesmo que o aumento da velocidade de reação se produza de maneira instantânea. Desta forma, a uma temperatura determinada, a atividade real, medida em unidades, irá diminuindo à medida que se aumenta o tempo de incubação (SCRIBAN, 1985).

Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa para uma conformação desprovida de atividade. De maneira geral, as baixas temperaturas não têm efeito desnaturante, entretanto, a repetição de transições sólido-líquido e congelamento-descongelamento provoca notáveis perdas de atividade (SCRIBAN, 1985; THYS, 2004).

2.2.3 Termoestabilidade Enzimática

A termoestabilidade e atividade ótima em temperaturas elevadas são propriedades inerentes às proteínas isoladas a partir de micro-organismos termófilos. Por que a maioria das proteínas são inativas em tais temperaturas, os mecanismos de estabilidade térmica de proteínas de termófilos têm atraído o interesse da comunidade científica desde que foram primeiramente descobertos. A análise da sequência de aminoácidos revelou nada de anormal, mas por outro lado, as sequências homólogas de proteínas termofílicas e mesófilas resultou ser muito

semelhante, as suas estruturas tridimensionais são sobreponíveis e apresentam os mesmos mecanismos catalíticos (BOUZAS et al., 2006).

No entanto, o fato de que tais proteínas permanecem termoestáveis, uma vez expressos em hospedeiros mesófilos sugere que a termotolerância reside na sequência do gene. Em geral, observou-se que as proteínas termófilas tendem a ter núcleos hidrofóbicos devido a uma dobragem diferente no que diz respeito aos mesófilos, o que provavelmente lhes proporciona maior estabilidade. (KIRINO et al., 1994).

Uma vasta variedade de genes de hipertermófilos foram clonados e expressos em mesófilos com sucesso. De todas as enzimas hipertermófilas expressas até agora em *E. coli*, menos do que 10% mostrou propriedades e estabilidades diferentes das versões nativas (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

As enzimas termoestáveis, as quais são secretadas por microrganismos termofílicos, apresentam benefícios para as indústrias, realizando a diminuição do risco de contaminação por micro-organismos mesófilos nos processos biotecnológicos geridos em altas temperaturas (HAKI; RAKSHIT, 2003). As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (EGOROVA; ANTRANIKIAN, 2005). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima, pois um aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação (ZAMOST et al., 1991).

Estudos estão sendo realizados visando à utilização de enzimas termoestáveis, em vários processos industriais. A maioria das bactérias termofílicas investigadas pertencem ao gênero *Bacillus* e foram isoladas de ambientes termofílicos e mesofílicos. (WANG et al., 2007). Apesar das vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso rotineiro na indústria, a aplicação biotecnológica de tem sido limitada até agora. As razões para esta contradição são muitas, mas a principal delas está relacionada com o escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas específicas, disponíveis em coleções (AQUINO, 2000).

Portanto, para a obtenção dessas características tão específicas, o presente estudo buscou o solo do Bioma Caatinga como fonte para a procura de enzimas celulolíticas termofílicas.

2.3 O Uso da Biomassa como Fonte de Energia Renovável

A biomassa é definida como o conjunto de todos os recursos renováveis provenientes de matéria orgânica, tanto de origem animal como vegetal, que podem ser empregados na geração de energia. Um tipo em particular de biomassa é a lignocelulósica, que corresponde a mais de 60% de toda a biomassa vegetal produzida no mundo (TENGERDY; SZAKACS, 2003).

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseada na agricultura, produzindo e exportando cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros. Todavia, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), que quando acumulados gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos importantes.

Nos últimos anos, uma variedade de subprodutos da indústria agrícola tem sido estudada com a finalidade de formular substratos para produção de enzimas (MUKHERJEE et al., 2008). Como por exemplo, lenha, carvão vegetal, resíduos vegetais, casca de arroz, cana de açúcar (bagaço da cana, palha) e farelo de trigo que apresentam grande potencial de reuso devido a sua composição e características físico-químicas, além dos benefícios ambientais (LADEIRA et al., 2010).

A celulose é o polímero natural mais abundante no planeta, constituindo cerca de 50% do peso seco em madeiras (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011). É encontrada na natureza na forma de filamentos, chamados de microfibrilas, que contêm de 36 a 1.200 cadeias de celulose, com diâmetro de 5 a 15 nm (LEVY et al., 2002). A interação entre as microfibrilas de celulose ocorre por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, resultando em uma estrutura cristalina e organizada por regiões amorfas (5 a 20%), as quais são as mais suscetíveis à hidrólise enzimática (RUBIN, 2008).

Anualmente, no Brasil, a produção de bagaço de cana-de-açúcar é de aproximadamente 186 milhões de toneladas (SOCCOL et al., 2010), onde a maior parte é queimado nas próprias usinas para produção de vapor e eletricidade em

processos de pouca eficiência. Apesar dessa aplicação, 10 a 15% do bagaço não possui uma destinação apropriada tornando-se poluente (BUDDADEE et al., 2008). Do mesmo modo, o trigo durante seu beneficiamento gera o farelo, um material lignocelulósico, que constitui aproximadamente 28% do grão. Este material que é descartado, representa uma valiosa fonte de hemicelulose, lignina, celulose e proteína (FARINAS et al., 2008; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008).

A tendência de estudos, como já havia sido reportado por Vásquez et al. (2007), é desenvolver processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da indústria de celulose, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração.

O bagaço apresenta significativa heterogeneidade morfológica e consiste em feixes de fibras e outros elementos estruturais como parênquima e células epiteliais (SANJUAN et al., 2001). Em relação à sua composição, apresenta de 19-24% de lignina, 27-32% de hemicelulose, 23-44% de celulose e 4,5-9,0% de cinzas (JACOBSEN; WYMAN, 2002). A celulose e a hemicelulose correspondem às frações de polissacarídeos que podem ser extraídas, fermentadas e transformadas em etanol, dando origem ao chamado etanol de segunda geração (CARDONA et al., 2007).

A expansão da produção e do consumo de biocombustíveis não tem sido isentos de contestações. O amplo apoio que os biocombustíveis desfrutavam erodiu em decorrência de novos estudos que têm ligado a sua produção a alta dos preços de alimentos, questionando sua capacidade para substituir a energia fóssil e a potencial contribuição para a monocultura e o desmatamento (SEARCHINGER et al., 2008; FARGIONE et al., 2008; TIMILSINA et al., 2010). A soma desses efeitos tem estimulado o urgente interesse no desenvolvimento de biocombustíveis, produzidos a partir de biomassas que não sejam usadas como alimentos e que utilizem menos terras e água de forma intensiva ou a utilização de resíduos das agroindústrias (CARRIQUIRY et al., 2011).

Especificamente, no Brasil, estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado na produção de etanol, permitiria duplicar a produção deste combustível no país sem aumentar as áreas de plantio (VÁSQUEZ et al., 2007).

Apesar do otimismo em relação ao etanol de segunda geração, existem dificuldades técnicas para que o processo de desconstrução da parede celular vegetal seja viável economicamente (RUBIN, 2008). A principal dificuldade do processo está relacionada à recalcitrância da parede celular vegetal, devido à alta associação entre os três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina (SOCCOL et al., 2010), além do alto preço da produção de enzimas (XIN et al., 2011; CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

2.4 O Bioma Caatinga: fonte de extremófilos

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, abrangendo cerca de 935.000 km², com grande heterogeneidade da fisionomia da vegetação e de sua composição florística (SAMPAIO et al., 2007). O tipo de vegetação é bem variável, sendo constituído de várias árvores altas, semi-caducifólias ou caducifólias, arbustos, ervas anuais como as leguminosas, semi-arbustos como as cactáceas, euforbiáceas e bromeliáceas. A produção total de fitomassa da folhagem das espécies lenhosas e da parte aérea das herbáceas na caatinga atinge, em média, 4.000 kg/ha, constituindo-se em forragem para caprinos, ovinos, bovinos e muares (DRUMOND et al., 2000).

Cerca de 18% do território nacional é ocupado por esse bioma, onde compreende os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, sul e leste do Piauí e norte de Minas Gerais (Figura 5), sendo a região semi-árida mais populosa do mundo (GIULIETTI et al., 2006; MENEZES et al., 2012), e apesar de sua grande extensão, este é um ambiente ainda pouco estudado, devido à falsa ideia de que sua biodiversidade é baixa, limitando às pesquisas.

O clima encontrado é quente, com temperaturas médias anuais entre 24°C e 27°C, com baixa pluviosidade (média entre 250 e 800 mm anuais) e na estação seca a temperatura do solo pode chegar até 60°C (SAMPAIO; RODAL, 2000).

Uma característica muito típica da Caatinga é a existência de duas estações do ano bem definidas, o verão e o inverno. O verão é considerado a época da seca, sem chuvas e que dura em torno de sete a nove meses, e o inverno é caracterizado por ser a estação da chuva, ocorrendo de três a cinco meses. No período chuvoso a vegetação apresenta um aspecto verde, encoberta de uma significativa quantidade de folhas e na seca ela se encontra despida, cinzenta e espinhosa (MAIA, 2004).

A ocorrência de secas estacionais e periódicas, além da vegetação com características específicas, ocasiona um depósito de folhas sobre o solo, formando uma camada de serapilheira, cuja decomposição está associada a atividade microbiana (COSTA et al., 2013).

Por ser considerada uma região predominante de temperaturas altas, incidência de radiação solar e estresse hídrico, os micro-organismos desse ecossistema representam uma fonte potencial para aplicações biotecnológicas e ambientais (DUAN; FENG, 2010; SOARES Jr., 2012).

Figura 5 – Mapa da América do Sul, com representação dos biomas brasileiros. Demonstrando os limites do bioma Caatinga. Fonte: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>

Ainda há poucos estudos demonstrando os micro-organismos existentes em ambientes áridos e semi-áridos. Gorlach-Lira e Coutinho (2007) registraram contagens de $5,0 \times 10^6$ UFG g⁻¹ para bactérias totais em amostras de solo de uma

região de caatinga, enquanto valores médios de $1,9$ a $93,3 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$ de solo para as populações de bactérias totais e de $0,1$ a $72,4 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$ de solo para populações de actinobactérias foram reportados por Pereira et al. (1996).

Até recentemente, a detecção e identificação de micro-organismos em amostras ambientais era baseada em técnicas de plaqueamento e cultivo em meios seletivos e/ou não seletivos e, métodos de observação direta em microscópio (TORSVIK et al., 2002). Os micro-organismos que conseguem crescer em meios artificiais não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados, havendo uma forte seleção em função da habilidade dos micro-organismos em se desenvolverem em meios com altas concentrações de nutrientes e geralmente em condições aeróbias (HUGENHOLTZ, 2002).

Há algum tempo, com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, os micro-organismos puderam ser estudados individualmente e caracterizados, principalmente, por critérios nutricionais. Nesse contexto, vários meios de cultura, seletivos ou não, foram utilizados para enumerar e isolar micro-organismos do solo e da rizosfera, com influência dos mesmos nos graus da diversidade genética obtida (TABACCHIONI et al., 2000). Entretanto, a abordagem do cultivo limitou, seriamente a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos micro-organismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997). Com isso, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em sequências gênicas vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana.

Micro-organismos termofílicos têm sido mais estudados e caracterizados nas últimas décadas (MAHESHWARI et al., 2000), devido à complexidade da degradação da celulose microcristalina, que é insolúvel em água devido a sua estrutura altamente compacta, portanto é interessante a utilização de celulasas termoestáveis ativas em altas temperaturas (HAKI; RAKSHIT, 2003).

A adaptação dos micro-organismos em ambientes extremos, faz com que a maior estabilidade enzimática seja adequada para as condições industriais mais agressivas. Além disso, a termoestabilidade é geralmente associada a uma maior resistência à desnaturantes químicos comumente usados nas reações industriais (BOUZAS et al., 2006).

Os solos tropicais brasileiros são habitats muito peculiares, com características próprias e únicas, cuja atividade biológica é extremamente rica. Estes solos possuem ampla biodiversidade e têm sido pouco estudados quanto às características microbiológicas que os tornam fontes excelentes para a busca de micro-organismos produtores de novas enzimas (BOM; CORVO; FERRARA, 2008).

Na Caatinga, ambiente promissor para micro-organismos termotolerantes e termofílicos, ainda há poucos estudos pela busca de extremófilos, mesmo sendo crescente o interesse na indústria biotecnológica.

2.5 Metagenômica Microbiana

O termo metagenômica é derivado do conceito estatístico de meta-análise (processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (análise ampla do material genético de um organismo) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

Esta abordagem tem potencial para descobrir novos genes, proteínas e vias metabólicas que podem ser exploradas para processos industriais. Pode funcionar ainda como um grande catálogo representativo de micro-organismos, permitindo compreender e prever o impacto da indústria, da agricultura e de outras atividades na diversidade procariótica e, compreender, ainda, a evolução de patógenos e de bactérias potencialmente úteis (TOUSSAINT et al., 2003).

A metagenômica envolve a clonagem de fragmentos grandes de DNA (40 a 100 kb), obtido a partir de amostras ambientais, em vetores tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), fosmídeos ou cosmídeos, e análise das bibliotecas resultantes em busca de uma nova expressão fenotípica na linhagem hospedeira de *E. coli* (HANDELSMAN et al., 1998; RONDON et al., 2000). A partir de uma biblioteca metagenômica, uma variedade maior de compostos com atividade biológica de interesse pode ser obtida simultaneamente, em comparação ao método tradicional de obtenção de compostos naturais, baseado em isolamento, cultivo e triagem de linhagens puras de micro-organismos.

As bibliotecas metagenômicas podem ser analisadas para uma ampla variedade de fenótipos ecológica e biotecnologicamente interessantes (ELENDO et al., 2006) por (1) análise baseada em sequência ou (2) análise baseada em atividade (Figura 6). Para isso, o desenvolvimento da bioinformática tem sido determinante, já que permite o processamento e análise da grande quantidade de dados gerada pelas técnicas de sequenciamento.

Figura 6 – Modelo esquemático de um estudo com abordagem metagenômica. (adaptado de HANDELSMAN, 2004)

2.5.1 Análise baseada em sequências

A análise baseada em sequência tem a vantagem de não depender da expressão dos genes clonados. No entanto, para analisar bibliotecas metagenômicas buscando clones que apresentem sequências de interesse, é requerido o desenho de sondas de hibridização ou primers de PCR, os quais são derivados de regiões conservadas de genes já conhecidos ou famílias de proteínas (FIESELER et al., 2007).

Contudo, essa abordagem não é seletiva para genes completos (DANIEL, 2004) e, além disso, apresenta grande probabilidade de obtenção de genes já descritos, uma vez que, os primers e sondas são desenhados a partir do que já é conhecido e conservado.

Alternativamente, pode ser realizado o sequenciamento aleatório de clones metagenômicos, o qual permite identificar relações filogenéticas, novos genes e deduzir vias metabólicas de bactérias não cultivadas (SCHMEISSER et al., 2003).

2.5.2 Análise baseada em função

Genes novos são um grande desafio a ser vencido, uma vez que, se não é observada similaridade com sequências já descritas, em geral não tem sido possível inferir funções. Diante disso, a análise baseada em atividade (análise funcional) é indicada para identificação de clones que expressem uma característica desejada, seguida pelo sequenciamento e caracterização do clone ativo através de análises genéticas e bioquímicas. Essa abordagem é seletiva para genes inteiros e produtos gênicos funcionais e, além disso, tem o potencial de detectar genes completamente novos, codificando novos tipos e classes de enzimas ou identificar a síntese de novos componentes bioativos, já que, a informação derivada de uma sequência já conhecida não é requerida (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

A revisão de Daniel (2004) apresenta um conjunto de trabalhos que obtiveram sucesso na busca de moléculas bioativas (ex. agarase, lipase, amilase, protease e outras) através triagem funcional em bibliotecas metagenômicas de amostras de solo. Ainda existe dificuldade para melhorar a eficiência na identificação de clones raros em bibliotecas muito grandes.

Entretanto, isso também, depende da disponibilidade de um ensaio para a seleção da função de interesse que possa ser realizado eficientemente em larga escala, uma vez que a frequência de clones ativos é bastante baixa (YUN et

al.,2004), visto a natureza complexa dos metagenomas, originados de uma mistura de espécies e a necessidade da expressão da função de interesse na cepa hospedeira, o que muitas vezes é dependente de agrupamento de vários genes requeridos para a função (UCHIYAMA et al., 2005; PARK et al.,2007).

O uso de um vetor de expressão bidirecional por Lammle et al. (2007) foi uma alternativa interessante e eficiente para contornar essa desvantagem gerando uma alta frequência de clones positivos. Entretanto, geralmente, fatores regulatórios cis e trans atuantes para eficiente transcrição, tradução e enovelamento da proteína têm papéis cruciais in vivo (PARK et al., 2007).

A utilização de sistemas de clonagem permite a separação e amplificação individual de fragmentos de DNA clonados, a partir de uma mistura de genes frequentemente desconhecidos e heterogêneos, oriunda de microrganismos do solo. Existe uma grande variedade de sistemas de clonagem disponíveis para acomodar diferentes tipos e tamanhos de fragmentos de DNA em linhagens hospedeiras.

Plasmídeos são utilizados para inserção de fragmentos pequenos (< 10kb), assim como os bacteriófagos (7-10kb), tendo grande aplicação na construção de bibliotecas de fragmentos de genes ou genes específicos (HENNE et al., 1999; KNIETSCH et al., 2003). Entretanto, estes vetores não permitem a detecção de *clusters* genéticos nem operons. Com esse objetivo, a utilização de cosmídeos (25-35kb) e fosmídeos (até 40 kb) tem sido relatada (HANDELSMAN, 2004). Para bibliotecas de grandes insertos, cromossomos artificiais bacterianos (BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*) e de leveduras (YAC – *Yeast Artificial Chromosome*), são capazes de permitir a inserção de fragmentos de 80-200kb e 200kb-1.5Mb, respectivamente (XU, 2006). Esses vetores podem ser utilizados na construção de sistemas de expressão de enzimas. A utilização de promotores gênicos permite o controle da expressão de um gene em condições controladas. O desenvolvimento de novas tecnologias que promovam a expressão e identificação eficiente de clones irá representar um avanço na fronteira da genômica funcional.

2.6 Produção de Enzimas Recombinantes em *Escherichia coli*

A escolha de um sistema de expressão para a produção de altos níveis de proteína recombinante depende de muitos fatores, tais como: características de crescimento celular, níveis de expressão, expressão intracelular e extracelular,

modificações pós-traducionais e atividade biológica da proteína de interesse, assim como questões regulatórias na produção de proteínas terapêuticas (MAKRIDES, 1996).

A *Escherichia coli* é o hospedeiro mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes. Além de ser o organismo referência em laboratórios do mundo inteiro para expressar proteínas, esta bactéria é utilizada em 40% do total comercializado de proteínas terapêuticas (LANGER, 2009). Isto pelo fato de este ser um organismo bem caracterizado do ponto de vista genético, fisiológico e expressão em cultivo de alta densidade celular com altos níveis de produtividade (CHOI et al., 2005),

Uma estratégia primeiramente demonstrada por Braun e Hanke em 1974, que teve seu conceito novamente provado em trabalhos recentemente publicados (NI et al., 2007; SHIN; CHEN, 2008) resultou em uma linhagem mutante de *E. coli* com a parede celular mais permeável permitindo o “vazamento” de enzimas recombinantes enviadas para o periplasma, inclusive hidrolases (celA e xyn11A, de *C. thermocellum* e *B. halodurans*, respectivamente) (SHIN; CHEN, 2008). Esta capacidade de “secretar” enzimas para o meio pode conferir à *E. coli* uma vantagem adicional na produção de enzimas de uso industrial, uma vez que pode reduzir significativamente os custos na recuperação e purificação, além de reduzir problemas relativos ao correto enovelamento e formação de corpos de inclusão (CHEN, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo acessar a diversidade microbiana do solo da Caatinga por meio de biblioteca metagenômica visando obter clones com atividade celulolítica.

3.2 Objetivos específicos

- Proceder à construção de uma biblioteca metagenômica em vetor fosmídeo;
- Selecionar funcionalmente clones da biblioteca metagenômica com atividade para o complexo de enzimas celulolíticas;
- Caracterizar os extratos celulásicos produzidos, em relação a parâmetros cinéticos, físico-químicos (temperatura, pH ótimos e termoestabilidade e especificidade sobre diferentes substratos);
- Sequenciar os clones selecionados para a identificação de genes e predição de funções;
- Caracterizar parcialmente as enzimas do complexo celulolítico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras de solo da Caatinga

A coleta de solo da Caatinga foi realizada no dia 03/05/2011, na Serra da Capivara, localizada no sudeste do estado do Piauí, no município de São Raimundo Nonato, nas coordenadas: 08° 50' 01.6" S / 42° 33' 13.3" W.

A área da Serra da Capivara compreende chapadas e vales. Nos vales, local da coleta, encontra-se uma caatinga arbórea, exuberante, com sub-bosque aberto e que podem atingir uma altura superior a 15 metros. A temperatura média do local é de 31°, podendo baixar para 22° nos meses mais chuvosos e frios e chegar até 47° no verão piauiense, além disso e o solo pode chegar a 60°C (SAMPAIO; RODAL, 2000).

No local da coleta, foi demarcada uma área de 1 m² dentro da qual foram retiradas cinco amostras. Após a retirada camada superficial do solo, composta basicamente de folhas em decomposição, aproximadamente 300g de solo foram coletados numa profundidade de 0-10 cm com o auxílio de uma pá. O solo foi colocado em um saco plástico esterilizado e armazenado a -20°C até a manipulação (Figura 7).

Figura 7 - Ponto de coleta de solo. Os círculos vermelhos representam os cinco pontos de coleta dentro de uma área demarcada de 1m². - As cinco amostras foram misturadas e homogeneizadas para posterior extração do DNA metagenômico

4.2 Extração de DNA de alto peso molecular do solo

Vários protocolos foram testados a fim de padronizar e otimizar a extração de DNA de alto peso molecular, os quais são descritos abaixo.

4.2.1 Extração por Freeze-Thaw

A extração de DNA pelo método *Freeze-Thaw* foi realizada de acordo com protocolos descritos por Großkopf et al. (1998) e Neria-Gonzáles et al. (2006), com algumas modificações descritas a seguir. Frações de 0,5 g de do solo da Caatinga foram adicionadas em microtubo e lavadas duas vezes com tampão PBS. Após a lavagem, foram adicionados 600 µL de tampão PBS e lisozima para a concentração final de 17 mg/mL e a solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado proteinase K para a concentração final de 0,7 mg/mL e SDS para a concentração final de 2% e, incubado a 60°C por 30 minutos. Em seguida, foram realizados três ciclos de 2 minutos cada de incubação em nitrogênio líquido e banho-maria a 65°C. Após a lise mecânica da parede pelo ciclo de *Freeze-Thaw*, foi realizada a lavagem com igual volume de fenol (pH 8,0) e posteriormente a centrifugação a 13200 rpm por 5 minutos. A fase superior da solução foi transferida para um novo tubo e igual volume de clorofórmio:álcool isolamílico (24:1) foi adicionando, seguido de centrifugação a 13400 rpm por 5 minutos. A fase superior dessa solução foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 10% do volume de NaCl 5M e dois volumes de etanol absoluto gelado e, incubado *overnight* a -20°C. O tubo então foi centrifugado a 13200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 70%, e, depois de seco, foi suspenso em 50 µL de água MilliQ.

4.2.2 Extração pelo kit PowerMax® Soil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.)

A extração de DNA de amostras de solo da Caatinga foi também realizada utilizando o kit *PowerMax® Soil DNA Isolation*, e o protocolo utilizado foi baseado nas instruções do fabricante.

4.2.3 Extração pelo método CTAB-SDS

O protocolo de extração de DNA de alto peso molecular de solo da Caatinga foi realizado de acordo com Ghosh et al. (2010), com modificações. Um grama de solo foi misturado a 2,7 mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 100

mM Na₂EDTA [pH 8,0]; 100 mM Na₂HPO₄ [pH 8,0]; 1,5 M NaCl; 1% CTAB) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e, incubado por 30 minutos a 37°C sob agitação de 225 rpm. Após a incubação, foram adicionados 300 µL de SDS 20% e incubado novamente por 2 horas a 65°C sob agitação de 50 rpm. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 6440 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e adicionado de 900 µL de tampão de extração e 100 µL de SDS 20% e, incubado por 65°C por 10 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 6440 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Após a obtenção do sobrenadante, foi adicionado igual volume clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A separação das fases foi realizada por centrifugação a 8320 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi recolhida em um novo tubo e o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol e, então incubado *overnight* em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 10530 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 5 mL de etanol 70% e suspenso em Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

4.3 Purificação do DNA com Cloreto de Césio

Foi adicionado em cada tubo 0,1 g de CsCl a cada 100 µL do DNA extraído, com subsequente incubação da solução por 1-3 horas à temperatura ambiente. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 13200 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 400 µL de água MilliQ e 300 µL de isopropanol, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a centrifugação do material a 13200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspenso em 30 µL de água MilliQ.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a análise da qualidade e estimativa da quantidade DNA extraído, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 0,8% em TEB 1X (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.5 Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)

Para analisar com precisão o tamanho dos fragmentos de DNA previamente extraídos, foi realizada a Eletroforese em Campo Pulsado utilizando o equipamento Pulsed-field CHEF III (BIORAD).

Cinco microlitros da solução de DNA foram misturado em 3 μ L de tampão de corrida e aplicados em gel de agarose *low-melting* 1% (BioRad) em TEB 0,5X. Foi utilizado como padrão de peso molecular o *High MW DNA Markers* (Invitrogen™). Para a corrida, foram utilizados os seguintes parâmetros: 9 volts; switch time inicial e final de 0,5; ângulo de 120°, 12°C de temperatura e 5 horas de corrida.

4.6 Purificação com Gelase

O fragmento do gel correspondente ao DNA de alto peso molecular foi recortado para o início da montagem da biblioteca. Os microtubos foram pesados sem e com os pedaços do gel para o cálculo da quantidade de enzima a ser utilizada.

Em seguida, os microtubos foram colocados em banho à 70°C por 15 min para dissolver o gel. Em seguida foram colocados em banho a 45°C, adicionado o tampão e a enzima e incubados por pelo menos 1 hora. Seguido de banho a 70°C por 10 min para inativar a enzima.

Posteriormente, foi aliqotado 500 μ L em novos microtubos e incubado a -20°C por 5 min, centrifugado por 20 min a 13000 rpm e recolhido 90-95% do sobrenadante.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, 2,5 volumes de etanol absoluto e incubado em -80°C overnight. Após, a amostra foi centrifugada por 20 min a 13000 rpm e descartado o sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado com etanol 70% gelado, secado em temperatura ambiente e ressuspendido em 53 μ L de água ultrapura.

4.7 Reação de End-Repair

Para a montagem da reação foi utilizado, 52 μ L do DNA; 8 μ L tampão 10x End-Repair; 8 μ L 2,5 mM de dNTP mix; 8 μ L 10 mM ATP e 4 μ L da enzima End-Repair mix. Totalizando um volume final de 80 μ L.

Foi encubado a temperatura ambiente por 1 hora e seguido de banho a 70°C por 10 min para inativar a enzima. Para a precipitação do DNA, o volume foi

completado para 100 μL , adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3M, 2,5 volumes de etanol absoluto, incubado em -80°C overnight. Após, a amostra foi centrifugada por 20 min a 13000 rpm e descartado o sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado com etanol 70% gelado, secado em temperatura ambiente e ressuspendido em 7 μL de água ultrapura.

4.8 Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo

O vetor utilizado na clonagem foi o pCC2FOSTM (Epicentre). Tal vetor possui 8.181 pares de bases (Figura 8), e é fornecido pronto para uso, linearizado no sítio de restrição único da enzima SmaI, e desfosforilado.

Figura 8 – Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pCC2FOSTM (Epicentre)

4.9 Reação de Ligação

Para a montagem da reação foi utilizado 1 μL do tampão de ligação Fast Link (10x); 1 μL 10 mM ATP; 1 μL Vetor pCC2FOS (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 6 μL DNA e 1 μL de DNA

ligase. Após, foi incubado overnight a 16°C e em seguida incubado em banho 70°C por 10 min para inativar a enzima.

4.10 Reação de Empacotamento

Primeiramente, no dia anterior ao empacotamento, foi inoculado em 25 mL de LB + 10 mM de $MgSO_4$ + 0,2% de Maltose, 0,25 mL da cultura da EPI-300. Deixado sob agitação a 180 rpm à 37°C até alcançar a D.O. 0,8 - 1,0 (~2h / λ 600).

Descongelou-se (no gelo) 1 tubo de MaxPlax Lambda Extrac® (Fagos), transferiu-se 25µL para um novo tubo e adicionou-se a reação de Ligação, pipetando as soluções para misturar sem fazer bolhas. Após, a solução foi incubada a 30°C por 2 horas. Logo após a primeira incubação, adicionou-se mais 25 µL de MaxPlax e incubou-se novamente a 30°C por 2 horas.

4.11 Transfecção

Após a obtenção da biblioteca (~ 1 mL), foi realizada a transfecção, onde adicionou-se 100 µL de células EPI-300 crescidas (D.O. 0,8 – 1,0) em um novo tubo com 10 µL dos fagos empacotados, em seguida foram incubados a 37°C por 1 hora. Após, semeou-se em meio LA acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol e incubou-se a 37°C por 24 horas. No dia posterior foi feita a verificação da transfecção, observando e contando a quantidade de clones crescidos na placa de petri.

4.12 Seleção, cultivo e estoque dos clones

Após a incubação das placas que receberam os clones transformantes em estufa a 37°C por 22 horas, as colônias presentes nas placas foram coletadas. Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 µL) contendo 125 µL de meio de estoque permanente para fasmídeos (2YT + HMFM 1x) acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa por 22 horas. Após esse período as placas foram estocadas à em ultra freezer a -80°C, no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

4.13 Extração de Fasmídios

Os clones foram inoculados em 5 mL de LB acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol e incubados a 37°C por 12-16 horas. Logo após, foram centrifugados 3

mL de cultura descartando o sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em 100 µL de solução de ressuspensão celular gelada e incubado em temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 200 µL de solução de lise celular fresca, misturou-se por inversão vagarosamente e incubou-se no gelo por 5 min. Em seguida, adicionou-se 150 µL de solução de neutralização, misturou-se por inversão vagarosamente e incubou-se no gelo por 5 minutos. Então, centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min. e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Foi adicionado 0,5 µL (100 µg/mL) de RNase e incubado por 30 min. a 37°C. Em seguida foi feita a desproteínação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1), inverteu-se vagarosamente e centrifugou-se a 12000 rpm por 15 min. Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão vagarosamente e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min. Após, recolheu-se o sobrenadante e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 2,5 vol. de etanol 100% gelado. Colocou-se para precipitar *overnight* a -80°C. Então, centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min., lavou-se o pellet com etanol 70%, deixou-se secar e ressuspendeu-se em 25 µL de água. Em seguida fez-se a Reação de Restrição com a enzima Not I: 2 µL de tampão da enzima; 0,5 µL da enzima Not I; 12,5 µL de água e 5 µL de DNA. Colocou-se em termociclador a 37°C por 10 horas e após, 65°C por 10 min. Para finalizar correu-se um gel de agarose 0,8% para visualizar os padrões de bandas.

4.14 Teste Bioquímico para produção de Celulase em placa de petri

Para o teste de produção de celulase, foi utilizado o meio CMC (NaNO₃ – 0,5 g; K₂HPO₄ – 1 g; MgSO₄ 7H₂O – 0,5 g; FeSO₄ 7H₂O – 0,01 g; Extrato de Levedura – 1 g, CMC – 10 g; ágar – 15 g, q.s.p. H₂O 1 L). Os clones foram replicados por meio de um replicador e crescidos por 72 h a 37°C. Após o crescimento, aplicou-se uma solução de iodo (iodeto de potássio – 2 g; iodo – 1 g; H₂O – 300 mL) por toda a placa de petri, por 3 min., para a visualização do halo.

4.15 Quantificação de Enzimas Celulolíticas

A quantificação enzimática foi determinada através da medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação. As fontes de celulose testadas foram: farelo de trigo, Carboximetil Celulose (CMC), bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado e não hidrolisado.

A atividade enzimática foi calculada através da conversão da taxa de reação em unidades de enzima (U), multiplicando o volume de reação com a velocidade da reação. Uma unidade é igual a 1 μmol de produto produzido por mL ao longo do tempo, o que indica a quantidade de enzima ativa na mistura (1 U = 1 μmol / mL / min), nas condições de cada ensaio usando a curva padrão de glicose.

4.15.1 *Celulase Total*

A quantificação de Celulase Total foi realizada de acordo com Mandels et al. (1976). Os clones foram crescidos previamente em meio Luria–Bertani por 12 horas para a obtenção da D.O. 1,0 em espectrofotometria a 600 nm. Após, 1 mL da cultura foi inoculada em 20 mL do Meio Líquido modificado de Vogel (1956) [Citrato de Sódio 2H₂O: 3,33g; (NH₄)H₂PO₄: 3,23g; KNO₃: 3,69g; KH₂PO₄: 2,05g; MgSO₄: 0,25g; Extrato de Levedura: 3g; CaCl₂.2H₂O: 0,12g/ 1000 mL]. Acrescido de 128 μL de Solução de Elementos Traços [Ácido cítrico: 5g; ZnSO₄.7H₂O: 5g; Fe(NH₄)₂(SO₄).6H₂O: 1g; CuSO₄.5H₂O: 0,250g; MnSO₄.H₂O: 0,050g; H₃BO₃: 0,050g; Na₂MoO₄.2H₂O: 0,050g / q.s.p 100 mL], 64 μL de solução de Biotina (0,1 mg/mL), 0,2% de fonte de celulose para cada 20 mL de meio de cultura e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol. Em seguida foi feita a incubação em 37°C com agitação em 120 rpm. Após a incubação nos tempos definidos (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas), a cultura foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Em outro tubo foi colocado um pedaço de papel filtro de 6 cm², 500 μL do extrato centrifugado e 1000 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Foi então encubado por 60 minutos a 50°C.

Posteriormente foram adicionados 1000 μL de tampão Sunmer (Ácido 3,5 dinitrosalicílico: 10g; NaOH: 16g; Tartarato de potássio e sódio: 300g / 1000 mL), encubado por 5 minutos a 100°C, esfriado e lido em espectrofotometria à 540 nm. Para o branco, o ensaio foi efetuado da mesma maneira sem a presença do substrato. O valor obtido da absorbância do branco foi subtraído de cada um dos valores da absorbância dos ensaios que compõem a triplicata.

4.15.2 *Endoglicanase*

A quantificação de Endoglicanase foi realizada de acordo com Mandels et al. (1976). Os clones foram crescidos previamente em meio Luria–Bertani por 12 horas para a obtenção da D.O. 1,0 em espectrofotometria a 600 nm. Após, 1 mL da cultura foi inoculada em 20 mL do Meio Líquido modificado de Vogel (1956) [Citrato de

Sódio 2H₂O: 3,33g; (NH₄)H₂PO₄: 3,23g; KNO₃: 3,69g; KH₂PO₄: 2,05g; MgSO₄: 0,25g; Extrato de Levedura: 3g; CaCl₂.2H₂O: 0,12g/ 1000 mL]. Acrescido de 128 µL de Solução de Elementos Traços [Ácido cítrico: 5g; ZnSO₄.7H₂O: 5g; Fe(NH₄)₂(SO₄).6H₂O: 1g; CuSO₄.5H₂O: 0,250g; MnSO₄.H₂O: 0,050g; H₃BO₃: 0,050g; Na₂MoO₄.2H₂O: 0,050g / q.s.p 100 mL], 64µL de solução de Biotina (0,1 mg/mL), 0,2% de fonte de celulose para cada 20 mL de meio de cultura e 12,5 µg/mL de cloranfenicol. Em seguida foi feita a incubação em 37°C com agitação em 120 rpm.

Após a incubação nos tempos definidos (0, 2, 4, 6, 8, e 12 horas), a cultura foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Em outro tubo foi colocado 500 µL de solução de CMC (1% carboximetil celulose em tampão citrato 0,1M pH 5,0) e 500 µL do extrato centrifugado reagindo por 30 min a uma temperatura de 50°C.

Posteriormente foram adicionados 1000 µL de tampão Summer, encubado por 5 minutos a 100°C, esfriado e lido em espectrofotometria a 540 nm. Para o branco, o ensaio foi efetuado da mesma maneira sem a presença do substrato. O valor obtido da absorbância do branco foi subtraído de cada um dos valores da absorbância dos ensaios que compõem a triplicata.

4.15.3 β-glicosidase

A quantificação de β-glicosidase foi realizada de acordo com Miller (1959). Os clones foram crescidos previamente em meio Luria–Bertani por 12 horas para a obtenção da D.O. 1,0 em espectrofotometria a 600 nm. Após, 1 mL da cultura foi inoculada em 20 mL do Meio Líquido modificado de Vogel (1956) e 12,5 µg/mL de cloranfenicol. Em seguida foi feita a incubação em 37°C com agitação em 120 rpm.

Após a incubação nos tempos definidos (0, 2, 4, 6, 8, e 12 horas), a cultura foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Em outro tubo foi colocado 250 µL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e 250 µL de 4-nitrofenol β-glicopiranosídeo 4 µM (PNPG, Sigma) e 50 µL do extrato centrifugado reagindo por 10 min a uma temperatura de 60°C.

A reação enzimática foi parada com 2 mL de carbonato de sódio 2M e quantificadas por espectrometria à 410 nm. Para o branco, o ensaio foi efetuado da mesma maneira sem a presença do substrato. O valor obtido da absorbância do branco foi subtraído de cada um dos valores da absorbância dos ensaios que compõem a triplicata.

4.16 Efeito da temperatura, do pH e da termoestabilidade sobre a atividade das enzimas celulolíticas

Para avaliar o efeito do pH das atividades enzimáticas de celulase total, endoglicanase e β -glicosidase foi utilizado a metodologia descrita nos itens **4.17** com a alteração do pH do tampão de 2,0 ao 10,0.

Para avaliar a influência da temperatura nas enzimas, tubos de ensaio contendo 2 mL do extrato bruto foram incubados em banho de água entre 30°C a 80°C. Após, foram realizados ensaios enzimáticos para se verificar a atividade residual das celulasas.

Uma vez determinada a temperatura ótima para a hidrólise do substrato foram realizados experimentos nessas temperaturas para a determinação da estabilidade térmica das celulasas produzidas. Os tubos de ensaio contendo o 2 mL do extrato bruto foram incubados por 5 horas nas respectivas temperaturas. Em intervalos de 60 minutos foi determinada a atividade de celulasas. Os experimentos foram feitos de acordo com os mesmos métodos quantitativos citados anteriormente para cada enzima, todos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em valores médios.

4.17 Extração e sequenciamento do DNA fosmidial

Uma vez selecionados os clones codificadores de celulasas, foi realizada a extração do DNA fosmidial dos clones positivos utilizando-se o kit Qiagen Large-Construct. O DNA metagenômico de cada amostra foi amplificado. Cada biblioteca foi gerada por meio da reação de amplificação em solução contendo enzima Dream Taq; dNTP (2,5 mM); oligonucleotídeos iniciadores. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) segundo as condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; extensão final de 10 minutos a 72°C (SOGIN et al., 2006). Após verificação da qualidade das amostras em gel de agarose 1,5% (p/v), as reações de cada amostra foram purificadas utilizando Agencourt® AMPure® XP Reagent e estante magnética, de acordo com protocolo fornecido por *Life Technologies - Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries)* (www.iontorrent.com). Após purificação, as amostras foram quantificadas por meio do NanoDrop (Thermo Scientific). Realizou-se a reação de amplificação em emulsão, onde as sequências foram ligadas a esferas, de acordo com protocolo

fornecido por *Life Technologies - Ion PGM™ 200 Xpress™ Template Kit* (www.iontorrent.com). Após recuperação das esferas, foi realizado o enriquecimento e preparo para carregamento no chip 314 e posterior sequenciamento (*Ion Sequencing Kit User Guide v2.0*) no sequenciador *Ion Personal Genome Machine™* (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies). O sequenciamento gerou sequências de até 100 pb produzindo >10 Mb com precisão superior a 99,0%.

4.18 Montagem dos contigs e anotação dos genes

Após realização da etapa de sequenciamento dos insertos de interesse, as sequências foram limpas, removendo sequências do vetor de baixa qualidade, barcodes e primer's reverse, utilizando-se o programa Galaxy. Posteriormente, a montagem dos contigs (região contigua) dos clones ativos, foi realizada através do software CLC Genomics Workbench para cada conjunto de dados separadamente. A anotação previa dos genes de interesse foi feita por meio de comparação de cada uma das sequências dos quadros abertos de leitura (ORFs - *open reading frame*), via blastx contra a base de dados PDB (Protein Data Bank) e SwissProt. Outra ferramenta utilizada para a anotação dos genes foi o *Integrated Microbial Genomes Expert Review* (IMG/MER) (MARKOWITZ et al., 2012). O programa é uma plataforma que otimiza a anotação de dados de genômica e metagenômica de micro-organismos. Em um único programa ele reúne vários bancos de dados bem como COG, Pfam, Ko, Enzyme, KEGG e MetaCyc.

4.19 Análise de proteínas em gel desnaturante de Poliacrilamida – SDS PAGE

A eletroforese de proteínas foi conduzida de acordo com Sambrook e Russel, (2001) em gel desnaturante de poliacrilamida em um sistema de eletroforese da BioRad®. O preparo dos géis foi realizado adicionando-se as seguintes quantidades dos reagentes.

Gel Concentrador 4%

Acrilamida:Bis-acrilamida (28:2)	1,0 mL
Tris-HCL 1 M pH 6,8	940 µL
Água destilada (q.s.p.)	7,5 µL
SDS 1% (p/v)	75 µL
APS 10% (p/v)	40 µL

TEMED	10 μ L
Gel Separador 12%	
Acrilamida:Bis-acrilamida (28:2)	12 mL
Tris-HCL 1,5 M pH 8,8	7,5 mL
Água destilada (q.s.p.)	30 mL
SDS 10% (p/v)	300 μ L
APS 10% (p/v)	300 μ L
TEMED	15 μ L

4.19.1 Procedimentos

Cerca de 2 mL das amostras dos sobrenadantes das culturas dos clones 283/A8 e 307/E11 cultivadas por 5h nas diferentes fontes de carbono foram precipitados na presença de 10% de Ácido Tricloroacético 100% (TCA) (50 g TCA; 50 mL água destilada q.s.p.; estocada a 4°C), homogeneizados e incubados em banho de gelo e água por 1 h, em seguida, foram submetidos à centrifugação a 16000 x g, a 4 °C, durante 20 minutos. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado em 500 μ L de acetona gelada sendo repetida a centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. O sedimento, resultante da centrifugação após a lavagem com acetona, foi ressuspendido em 30 μ L de tampão de amostra para SDS PAGE 1X, fervido durante 5 minutos e aplicado no gel.

4.19.2 Corrida eletroforética

A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina 1X com uma voltagem constante de 6 mV/cm em um sistema de eletroforese vertical.

4.19.3 Coloração com azul de Coomassie

As bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após a incubação deste durante duas horas, sob agitação, na solução corante de *Coomassie Blue Coloidal* seguida pela descoloração, incubando o gel durante a noite, sob agitação, em água destilada.

4.20 Cromatografia de troca aniônica

A cromatografia de troca aniônica foi efetuada em coluna Econo-Pac High Q cartridge (suporte de troca iônica Macro-Prep® com grupo funcional $N^+(CH_3)_3$;

BioRad). O tampão inicial foi formado por tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e as proteínas adsorvidas foram eluídas com NaCl no mesmo tampão. Empregamos eluição gradual das proteínas a 100 e 500 mM de NaCl no mesmo tampão. Os tampões foram preparados, se necessário o pH foi ajustado. As frações são coletadas e testadas quanto a atividade enzimática de acordo com item 4.17.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA de alto peso molecular

A opção de montagem de bibliotecas metagenômicas com grandes insertos (25-40 kb) é permitir o acesso de vias metabólicas completas, que exigem *operons* inteiros para a síntese de um composto de interesse. Dessa forma, o passo de extração de DNA de alto peso foi crucial na montagem da biblioteca.

Algumas dificuldades surgiram no decorrer da metodologia, dentre elas a obtenção do DNA de alto peso (acima de 25 kb), a concentração necessária para a clonagem em vetor específico e a purificação.

A extração pelo método do *Freeze-Thaw* e *CTAB-SDS* não foram eficientes na obtenção do DNA, pois não permitiu a obtenção de fragmentos com alto peso molecular e sim DNA com elevado índice de degradação (Figura 9).

Figura 9 – Gel de eletroforese 0,8%. 1. DNA do fago λ 50 ng; 2. λ 100 ng; 3. DNA obtido do solo da Caatinga, (Ponto 2 - Serra da Capivara) pelo método *Freeze-Thaw*, e 4. DNA obtido do solo da Caatinga, (Ponto 2 - Serra da Capivara) através do método *CTAB-SDS*

A extração de DNA realizada pelo kit PowerMax® Soil, (MoBio – Laboratories, Inc.) foi satisfatória de acordo com a Figura 10 e Figura 11.

Figura 10 – Gel de eletroforese 0,8%. 1. DNA do fago λ 50 ng; 2. λ 100 ng; 3. DNA obtido do solo da Caatinga (Ponto 2- Serra da Capivara) pelo kit PowerMax® Soil, (MoBio – Laboratories, Inc.).

Figura 11 - Gel de PFGE 1%. 1. High MW DNA Markers (Invitrogen™); 2. Extração de DNA obtido do solo da Caatinga (Ponto 2 – Serra da Capivara) pelo kit PowerMax® Soil, (MoBio – Laboratories, Inc.).

5.3 Reação de Ligação

Após diversos métodos testados e a obtenção de uma grande quantidade de DNA de alto peso molecular, foi possível a ligação dos fragmentos de DNA. Sendo assim, foi possível o empacotamento dos fragmentos pelo fago e consequentemente a finalização da biblioteca metagenômica.

5.4 Empacotamento e Transfecção

A transfecção foi realizada seguida do empacotamento. Obtivemos 80 placas de petri (140 X 15 cm) positivas em relação à clonagem, como o exemplo mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Colônias de clones obtidos após a transfecção com crescimento em meio LB

5.5 Extração de Fosmídios

Para a confirmação da variabilidade genética da biblioteca foram selecionados clones aleatórios para a extração de fosmídios. O padrão de bandas nos propõe que os insertos de DNA foram aleatoriamente selecionados, mostrando a diversidade dos clones obtidos (Figura 13).

Figura 13 – Análise do perfil dos fosmídios em gel PFGE 1%. 1- Fosmídio; 2-14 – amostragem dos clones

5.6 Teste Bioquímico para Produção de Celulases em Placa de Petri

Foram avaliados 20.064 clones em placas aleatórias, uma pré-seleção dos clones produtores de celulase para etapa da quantificação. O teste consiste na hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) presente no meio de cultura, a hidrólise é visualizada através da formação de halo “amarelo” ao redor do clone produtor da celulase (KIM et al., 2000). O meio de cultura CMC é citado como o substrato mais adequado para estudo sólido, onde é utilizado por diversos autores para triagem (MATSUSHITA et al., 1990; HENDRICKS et al., 1995; KIM et al., 2000; YODA et al., 2005; WAEONUKUL et al., 2009; WANG et al., 2009). As análises com a célula EPI30™ *Escherichia coli* não transformada do Copy Control™ HTP Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE Biotechnologies) possibilitaram verificar a ausência da formação de halo ao redor das colônias.

Entre todas as placas testadas obteve-se 4 clones que apresentaram resultado positivo para produção de celulase, dos quais dois deles estão representados na Figura 14.

Figura 14 – Teste de produção de celulase dos clones 307/E11 e 283/A8. Os halos “amarelos” ao redor dos clones indicam que os mesmos produziram celulase. Os clones foram testados em triplicata

As estratégias de triagem funcional têm como objetivo detectar a reação biocatalítica e, em seguida, caracterizar o gene responsável. A expressão heteróloga em linhagens de *E. coli* pode limitar a atividade enzimática em caso de possíveis diferenças de repertório metabólico e mecanismos de regulação moleculares em relação ao micro-organismo de origem. Uma pesquisa com 32 genomas procarióticos constatou que apenas 40% dos genes podem ser expressos usando *E. coli* (GABOR et al., 2004). Além disso, mesmo quando um gene é expresso, o nível de expressão pode ser tão baixo que não pode ser detectada através de triagem funcional. Alguns trabalhos mostram um enorme esforço de triagem para a detecção de poucos clones positivos (DANIEL, 2004). As amostras avaliadas mostram que obtivemos sucesso no isolamento de genes envolvidos na degradação da celulose a partir de amostras de solo, como já têm sido descritos em trabalhos anteriores (KIM et al., 2008; VOGET et al., 2006; WANG et al., 2009).

Kavamura (2012) obteve 11 bactérias isoladas da rizosfera do solo da Caatinga no período chuvoso que exibiram halo de degradação no meio de CMC. Estas bactérias foram identificadas como pertencentes às linhagens de *Bacillus* spp. E *Serratia* sp.

A detecção de atividade celulolítica encontrada na biblioteca demonstra o enorme potencial do metagenoma da microbiota do solo na busca de moléculas bioativas. A possibilidade de manipulação da expressão de genes triados na Caatinga representa um enorme potencial biotecnológico no que diz respeito à utilização de enzimas celulolíticas na produção de biocombustíveis.

Os sistemas de expressão que utilizam *E. coli* apresentam diversas vantagens. Como esta bactéria é comumente utilizada nos protocolos de manipulação de DNA, a maioria dos laboratórios está capacitada a manipulá-la e apresentam as condições mínimas para esse fim. Esta bactéria é de fácil manipulação e cresce rápido em meio de cultura relativamente barato. É possível utilizar todo conhecimento da genética e fisiologia que se conhece desta bactéria, assim como toda a vasta literatura disponível sobre este organismo e suas aplicações.

5.7 Quantificação de Enzimas Celulolíticas

5.7.1 Pré-seleção dos clones positivos

Primeiramente, foi realizada uma curva de crescimento dos quatro clones positivos para que se tenha o tempo ótimo de produção enzimática e para detectar os melhores intervalos para a quantificação. Utilizou-se o meio de cultura LB para crescimento, onde a glicose está facilmente disponível, por isso utilizamos a curva de crescimento somente para obter um perfil do crescimento dos clones. Foi resultado, então, uma curva de crescimento semelhante em todos os clones, no qual a fase Lag vai de 0 a 2 horas, a fase Log de 2 a 4 horas e a fase Estacionária a partir de 5 horas, aproximadamente (Figura 15).

Figura 15 – Curva de crescimento dos clones 249/G12, 259/D2, 283/A8, 307/E11

Após o período ideal de crescimento realizou-se uma pré-seleção da produção enzimática, onde utilizamos a fontes de celulose farelo de trigo. Esta pré-seleção foi apenas para determinar quais clones seriam melhores produtores de cada enzima para assim continuar os testes mais específicos. Nas figuras abaixo temos os resultados da produção das enzimas (Figura 16).

Figura 16 – Atividade enzimática dos clones 249/G12, 259/D2, 283/A8, 307/E11 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

As melhores atividades enzimáticas foram observadas nos clones 307/E11 e 283/A8, com destaque para a dosagem de Celulase Total. Com isso, os dois melhores clones foram selecionados para determinar o pico de produção e dar continuidade aos testes aos quais foram realizadas quantificações de acordo com as fontes de celulose e temperaturas ideais citadas na literatura para cada enzima.

5.7.2 Cinética Enzimática

Para verificar o melhor tempo de produção dos clones 283/A8 e 307/E11 foram realizados experimentos de cinética da atividade das enzimas celulolíticas. De acordo com o resultado dos testes anteriores realizamos estes experimentos com o substrato farelo de trigo. O crescimento dos clones foi mensurado através de espectrofotometria com absorbância em 600 nm.

5.7.3 Dosagem das enzimas: celulase total, endoglicanase e β -glicosidase

A quantificação das enzimas foram realizadas nos tempos pré-definidos de cultivo: 2, 4, 6, 8, e 12 horas. Podemos verificar nas Figuras 17 e 18 aumento da produção de celulase total seguido pelo declínio de produção de acordo com o tempo de cultivo. Conjuntamente com a dosagem de açúcares redutores foi realizada a quantificação de crescimento.

Figura 17 – Atividade de Celulase Total produzida pelo clone 307/E11 utilizando papel de filtro como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

Figura 18 – Atividade de Celulase Total produzida pelo clone 283/A8 utilizando papel de filtro como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

A dosagem de Endoglicanase pode ser visualizada nas Figuras 19 e 20, onde a melhor atividade foi produzida no final da fase Log.

Figura 19 - Atividade de Endoglicanase produzida pelo clone 307-E11 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

Figura 20 - Atividade de Endoglucanase produzida pelo clone 283/A8 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

A produção da β -glicosidase teve seu pico de produção em 4 horas de cultivo, no final da fase Log, como era esperado, por ser um sítio mais interno no conjunto celulósico para a degradação (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Atividade de β -glicosidase produzida pelo clone 307/E11 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

Figura 22 - Atividade de β -glicosidase produzida pelo clone 283/A8 utilizando farelo de trigo como substrato. Cada tempo de quantificação representa a média das triplicadas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,005$)

Pode-se observar que o tempo “ótimo” de produção das enzimas pelos clones 307/E11 e 283/A8 são de 4h de cultivo, onde o crescimento se encontra na fase Log.

Com relação à produção de enzimas celulolíticas, destaca-se o clone 307/E11. Tendo 21,6; 25 e 37,5% maior produção nas enzimas Celulase total, Endoglicanase e β -glicosidase, respectivamente, quando comparado ao clone 283/A8.

A atividade específica é um importante variável de resposta na análise de bioprocessos, pois ela é uma medida da pureza do extrato enzimático em relação à(s) enzima(s) de interesse (LEHNINGER, 1976).

Embora as abordagens independentes de cultivo permitam o isolamento de genes de celulasas a partir de amostras ambientais, incluindo metagenomas do solo, a maioria dos estudos relata o isolamento de endocelulasas (FENG et al., 2007; HEALY et al., 1995; KIM et al., 2008; VOGET et al., 2006; WANG et al., 2009). Até o momento, o isolamento e caracterização de genes de exocelulase da microbiota ruminal têm sido realizados com sucesso (FERRER et al., 2005), no entanto o isolamento de exocelulasas a partir de metagenomas do solo parece uma promissora fonte de novos genes celulolíticos (FUJII et al., 2011).

5.8 Determinação da produção de celulasas em diferentes substratos

Para avaliar a influência do substrato na produção de celulasas, os clones 283/A8 e 307/E11 foram crescidos com três diferentes fontes de celulose: farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado. Podemos observar na Tabela 1 os resultados obtidos para cada tipo de substrato.

Tabela 1 - Atividade enzimática ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$), relativa a cada enzima, dos clones 307/E11 e 283/A8

Substratos	Celulase Total		Endoglicanase		B-glicosidase	
	307/E11	283/A8	307/E11	283/A8	307/E11	283/A8
Farelo de Trigo	2,53	2,38	2,1	2,5	0,76	0,04
Bagaço (tratado)	1,5	2,3	1,1	2,2	0,23	0,87
Bagaço (não tratado)	0,8	1,8	0,5	1,78	0,12	0,63

A produção de enzimas do clone 307/E11 variou de 0,12 a 11,4 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e do clone 283/A8 variou de 0,04 a 9,98 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, conforme é apresentado na tabela. Dos diferentes tipos de substratos utilizados o que obteve melhores resultados foi o farelo de trigo.

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de vários fatores que envolvem desde as características do substrato até a natureza do sistema enzimático utilizado. Os fatores relacionados às enzimas incluem a inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de produto final (celobiose e glicose), adsorção irreversível das enzimas sobre o substrato, desnaturação enzimática por exposição excessiva à temperatura e agitação necessárias ao processo. Já os fatores relacionados ao substrato correspondem à porosidade e cristalinidade das fibras de celulose, teor de lignina e o teor de hemiceluloses presentes (FLACHNER; RÉCZEY, 2004; LESCHINE et al., 1995).

Há estudos com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo onde estes substratos têm se mostrado eficiente para a indução da produção de enzimas celulolíticas por fungos (HALTRICH et al., 1996; SÁNCHEZ, 2009). Diferentes resíduos celulósicos induzem a produção de diferentes enzimas do complexo celulolítico desde que apresentam diferentes composições de celulose além de diferentes tipos de hemicelulose. Como por exemplo o farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, celulose microcristalina, sabugo de milho, palha de arroz (SÁNCHEZ, 2009).

Tanto o crescimento microbiano como a produção de enzimas celulolíticas são determinados por uma grande variedade de parâmetros, como a composição, a temperatura e pH, além disso, a escolha da fonte de carbono tem um papel importante na produção enzimática (JUHÁSZ et al., 2005). Para otimização dessas enzimas na indústria, faz-se necessária uma prévia caracterização enzimática, que seja capaz de determinar os principais parâmetros que influenciam a atividade e estabilidade enzimática.

5.9 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto

5.9.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de hidrólise das Enzimas Celulolíticas

O pH está intimamente associado à atuação enzimática, visto que os sítios ativos das enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar em uma forma iônica adequada para que se mantenham sua conformação, se liguem aos substratos e catalisem a reação (SEGEL, 1979).

Primeiramente, cabe ressaltar que os resultados apresentados representam a atuação das enzimas nos extratos brutos, sem prévias purificações, sendo, portanto, aparentes as condições ótimas de atuação verificadas.

O efeito do pH das atividades enzimáticas de celulase total, endoglicanase e β -glicosidase para os dois isolados foi testado do pH 2,0 ao 10,0 (Figuras 23 e 24). Ambos os clones produziram as enzimas no valor máximo (atividade ótima) em tampão com pH 5,0 e são consideradas, portanto, enzimas acidofílicas. Resultado semelhante ao encontrado por Wang et al. (2009), onde relatou o pH ótimo entre 4,0 e 7,0.

Figura 23 – Atividade das enzimas Celulase Total, Endoglicanase e β -glicosidase pelo clone 307/E11 de acordo com a variação do pH. Cada quantificação representa a média das triplicadas

Figura 24 – Atividade das enzimas Celulase Total, Endoglicanase e β -glicosidase pelo clone 283/A8 de acordo com a variação do pH. Cada quantificação representa a média das triplicadas

Tomando-se como pontos centrais os valores de pH ótimos encontrados, pode-se observar que as enzimas se mostraram mais sensíveis a acréscimos no pH, ou seja, em geral a perda de atividade foi mais acentuada para valores de pH mais alcalinos. Com os valores de pH 9,0 e 10,0 a atividade enzimática foi completamente perdida.

O impacto da temperatura nas atividades enzimáticas do extrato bruto dos clones 307/E11 e 283/A8 está demonstrada nas figuras 25 e 26. As temperaturas utilizadas para os ensaios variaram de 30°C a 80°C.

Figura 25 – Efeito da temperatura sobre atividade das enzimas do clone 307/E11. A atividade foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas seguidas do ensaio enzimático. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade relativa das enzimas

Figura 26 – Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas do clone 283/A8. A atividade foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas seguidas do ensaio enzimático. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade relativa das enzimas

Analisando o clone 307/E11, as enzimas celulase total, endoglicanase e β -glicosidase obtiveram uma atividade máxima a 60°C. Na temperatura de 80°C as enzimas diminuíram suas atividades para 65, 46, e 43% respectivamente.

Já o clone 283/E11 teve sua atividade ótima em 60°C somente para β -glicosidase, enquanto que as demais enzimas tiveram máxima atividade em 50°C. Na temperatura de 80°C as enzimas diminuíram suas atividades para 51% para celulase total, 21% para β -glicosidase e 32% para endoglicanase.

Pode-se observar que o clone 307/E11 possui uma temperatura ótima mais alta que o clone 283/A8, além de um menor decréscimo de atividade conforme maior temperatura.

Assim como o preconizado pela literatura, incrementos na temperatura reacional promoveram aumentos nas atividades enzimáticas, até o valor ótimo, que variou entre 50°C e 60°C. A temperatura de 80°C provocou drásticas reduções nas atividades celulósicas, provavelmente, pela mudança conformacional acarretada pelo rompimento de ligações intermoleculares.

Pang et al., (2009) fez clonagem através de compostagem aerada de solo em *E. coli* e selecionou clones com atividade para endoglicanases, onde a atividade principal da enzima ficou entre 10 e 40°C. Acima de 45°C a atividade foi rapidamente perdida e com uma hora de incubação a enzima manteve sua atividade apenas abaixo de 40°C.

No estudo de Kemp (2010) com clones obtidos a partir de DNA extraído do rúmen de vaca, as enzimas celulolíticas estudadas possuem uma temperatura ótima de 40°C mas permanecem estáveis até cerca de 60°C, após este ponto, a atividade começa a decair.

Há também diversos trabalhos realizados com fungos termofílicos, como o do gênero *Humicola*. O grande interesse por esse fungo é justificado por sua capacidade em produzir um conjunto de enzimas termoestáveis como celulasas, xilanases, β -glicosidases, amilases, entre outras (AZEVEDO et al., 1990; CARDELLO et al., 1994; DE PAULA et al., 1998). Genes deste gênero foram clonados e expressos em *A. orizae*, sendo que as enzimas produzidas, endoglicanases e β -glicosidases, apresentaram temperatura ótima entre 50 a 70°C (TAKASHIMA et al., 1996).

O aumento da atividade das celulasas e a redução de seu custo de produção são duas questões importantíssimas na hidrólise de materiais celulolíticos.

Coquetéis enzimáticos baseados nessas enzimas têm sido propostos como um método alternativo para destruir a resistência desses resíduos à fermentação. Além disso, a produção de enzimas em temperatura alta é mais vantajosa no ponto de vista industrial, pois minimiza a contaminação por micro-organismos que crescem em temperatura ambiente (OLIVEIRA, 2010).

5.9.2 Termoestabilidade das Enzimas Celulolíticas

Para avaliar a estabilidade térmica das celulasas produzidas pelo clone 307/E11, empregaram-se as temperaturas de melhor produção para cada enzima. Sendo 60°C para Celulasas Total e Endoglicanase; e 50°C para β -glicosidase.

A atividade da Celulase Total apresentou maior estabilidade onde se manteve em 100% mesmo variando o tempo de incubação até duas horas. Após quatro horas de incubação, 82% de atividade foi mantida e em 5 horas, a atividade decaiu para 78,3%. A enzima β -glicosidase foi a segunda com melhor estabilidade térmica, quando em 5 horas obteve 64,1% de atividade. A Endoglicanase obteve resultado final de 49% de atividade enzimática (Figura 27).

Figura 27 – Termoestabilidade das enzimas produzidas pelo clone 307/E11

Figura 28 – Termostabilidade das enzimas produzidas pelo clone 283/A8

Enzimas que apresentam estabilidade em temperaturas acima de 40°C são ditas como termostáveis (GOMES et al., 2007). Estudo com o actinomiceto *Streptomyces drozdowiczii* mostrou que a enzima endoglicanase demonstrou estabilidade térmica ao longo de uma hora e meia a temperatura de 50°C, e a 60°C sua atividade foi reduzida completamente (LIMA et al., 2005). Enzimas termostáveis são altamente específicas e, portanto, têm um potencial considerável para muitas aplicações industriais. Portanto, a descoberta de novas celulases extremófilas é essencial para atender as necessidades da indústria (DUTTA et al., 2008).

Enzimas termostáveis possuem grande importância biotecnológica. Celulases termostáveis podem ser utilizadas na indústria alimentícia, onde ocorrem processos que requerem altas temperaturas como a pasteurização. Outras aplicações incluem as indústrias de polpa e papel, tratamento de efluentes industriais e processamento de materiais celulósicos (JANG; CHENG, 2003).

A produção de celulases por micro-organismos extremófilos e o aumento da estabilidade térmica das celulases utilizadas conjuntamente com a expressão de genes heterólogos para essas enzimas são de grande importância para a indústria, visto a melhoria do desempenho das celulases e a diminuição da quantidade de enzimas necessárias para a eficiente hidrólise de materiais lignocelulósicos (BON et al., 2008).

A metagenômica é uma excelente estratégia independente de cultivo para a detecção e isolamento de enzimas do complexo celulolítico. Há uma diversidade catalítica nas reações enzimáticas, tais como a degradação da celulose, sendo muitas vezes misturas de enzimas que interagem sinergisticamente (VOGET et al., 2006).

5.10 Características Gerais dos Fosmídios

O sequenciamento dos clones foi feito para encontrar genes relacionados a hidrólise da celulose.

5.10.1 Montagem das sequências

Após a montagem dos reads foram obtidos cinco e quatorze *contigs* para os fosmídios 307/E11 e 283/A8, respectivamente.

5.10.2 Características gerais dos fosmídios

As características gerais dos insertos, bem como o tamanho da sequência, conteúdo de G+C, e o total de genes, estão descritas da Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo das características gerais dos dois fosmídios analisados

(continua)

Dados	Fosmídio 307/E11		Fosmídio 283/A8	
	Quantidade	% de agregados	Quantidade	% de agregados
Números de sequências	5	100,00%	14	100,00%
Número de bases	41449	100,00%	40097	100,00%
Contagem de GC	26233	63.29%	24856	61,99%
Genes de RNA	1	2,33%	*	*
Genes de tRNA	1	2,33%	*	*
Genes que codificam para Proteínas	42	97.67%	56	100%
Com nome do produto	31	72,9%	31	55,36%

Tabela 2 – Resumo das características gerais dos dois fismídios analisados

				(conclusão)
Com COG	27	62,79%	27	48,21%
Com Pfam	26	60,47%	25	44,64%
Com KO	18	41,86%	16	28,57%
Com Enzyme	9	20,93%	13	23,21%
Com MetaCyc	6	13,95%	6	10,71%
Com KEGG	14	32,56%	8	14,29%
COG Clusters	29	0,60%	28	0,57%
Pfam clusters	36	0,24%	25	0,17%

* não possuem genes de RNA

Os produtos dos genes preditos foram divididos em categorias funcionais de acordo com a lista fornecida pelo agrupamento de grupos ortólogos de proteínas (COGs), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Resumo do número total de ORFs encontradas para cada fismídio atribuídas em categorias COG estabelecidas

n° ORF Fismídio 307/E11	n° ORF Fismídio 283/A8	Categorias funcionais
3	5	Transporte e metabolismo de aminoácidos
1	0	Transporte e metabolismo de carboidratos
2	3	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
1	0	Transporte e metabolismo de lipídios
0	1	Transporte e metabolismo de nucleotídeos
4	2	Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular
0	2	Mecanismo de defesa
1	1	Replicação, recombinação e reparo
2	0	Controle de ciclo celular, divisão celular e divisão cromossômica
1	1	Biossíntese de parede celular/membrana/envelope
0	1	Transporte e metabolismo de coenzimas
2	3	Predição funcional geral
5	3	Modificação pós-traducional e chaperonas
3	2	Mecanismo de transdução de sinal
0	2	Transcrição
2	1	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese
5	4	Função desconhecida

Nenhum marcador taxonômico conhecido, como RNA ribossomal 16S, estava presente nas sequências metagenômicas analisadas. Portanto, a origem taxonômica dos insertos foi predita com o auxílio do programa IMG/MER. Os resultados da predição sugeriram que o fragmento fosmidial E11 pertence ao filo *Proteobacteria* e o fragmento A8 não teve sua origem identificada.

O foscímio E11 apresentou uma sequência de tRNA com 85 pb. Esta foi submetida ao BLASTn, apresentando 96% de similaridade com o gênero *Azorhizobium* (nº de acesso BA000040.2/ AP012279.1/ AP012206.1/ CP007569.1), corroborando com a análise do IMG, uma vez que essa espécie pertence ao filo *Proteobacteria*.

Autores tem detectado CMCases em diferentes espécies de *Rhizobium* (MARTÍNEZ-MOLINA et al., 1979; MATEOS et al.; 1992; MORALES et al., 1984; SALEH-RASTIN et al., 1991). Jiménez-Zurdo et al. (1996a) confirmaram atividade enzimática celulolítica em todos os isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* estudados. Os mesmos autores demonstraram que a celulase produzida por *Rhizobium leguminosarum* é codificada pelo plasmídio simbiótico (pSym) (JÍMENEZ-ZURDO et al., 1996b).

Subramanian e Smith (2013), citam *Bradyrhizobium japonicum* como produtor de enzimas que degradam polissacarídeos, como a poligalacturonase e carboximetilcelulase, que clivam ligações glicosídicas da parede da célula hospedeira para penetração nas raízes. Porém, ainda pouco se conhece sobre espécies de *Azorhizobium* como produtores de enzimas celulolíticas e identificação das mesmas.

5.11 Anotação do Foscímio E11

As funções preditas para as 43 ORFs detectadas no foscímio E11 são descritas na tabela 4, com informação referente ao tamanho das regiões codificantes em nucleotídeos e suas referências relacionadas à base de dados COG. Para 20 ORFs foi possível atribuir atribuir funções, enquanto 14 ORFs permanecem com função desconhecida. A organização das ORFs presentes no inserto fosmidial encontra-se ilustrada na Figura 29.

Figura 29 – Representação esquemática do inserto totalmente sequenciado do foscímio E11 derivado da biblioteca metagenômica

Tabela 4 – ORFs anotadas do fosmídeo E11 proveniente da biblioteca metagenômica

(continua)

Gene ID	Nome do Gene	Início	Final	Tamanho(pb)	COG ID	Função COG
CAA_10011	Afadin- and alpha -actinin-Binding	2	1264	1263		
CAA_100110	Uncharacterized conserved protein	9536	10240	705	COG1434	Uncharacterized conserved protein
CAA_100111	Cell division protein	10314	11282	969	COG2177	Cell division protein
CAA_100112	Predicted ATPase involved in cell division	11275	11934	660	COG2884	Predicted ATPase involved in cell division
CAA_100113	Protein of unknown function (DUF3426)	12133	13008	876		
CAA_100114	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	13078	13416	339	COG2204	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
CAA_100115	hypothetical protein	13547	13783	237		
CAA_100116	hypothetical protein	13885	16497	2613	COG3846; COG5271	Type IV secretory pathway, TrbL components; AAA ATPase containing von Willebrand factor type A (vWA) domain
CAA_100117	Uncharacterized homolog of gamma-carboxymuconolactone decarboxylase subunit	16680	17063	384	COG0599	Uncharacterized homolog of gamma-carboxymuconolactone decarboxylase subunit
CAA_100118	hypothetical protein	18302	18766	465	COG5527	Protein involved in initiation of plasmid replication
CAA_100119	Mid-1-related chloride channel (MCLC)	19350	19511	162		
CAA_10012	hypothetical protein	1541	1762	222		
CAA_10013	Uncharacterized protein conserved in bacteria	1990	3174	1185	COG4093	Uncharacterized protein conserved in bacteria
CAA_10014	Uncharacterized protein involved in cation transport	3364	3966	603	COG3703	Uncharacterized protein involved in cation transport
CAA_10015	hypothetical protein	4168	4410	243		
CAA_10016	hypothetical protein	4471	5895	1425	COG4076	Predicted RNA methylase
CAA_10017	Arylsulfatase A and related enzymes	5892	7406	1515	COG3119	Arylsulfatase A and related enzymes
CAA_10018	hypothetical protein	7577	8713	1137		
CAA_10019	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	8751	9524	774	COG0204	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
CAA_10021	Type III restriction/modification enzyme methylation subunit	3	122	120		
CAA_10022	Outer membrane protein	457	1803	1347	COG1538	Outer membrane protein
CAA_10023	Protein of unknown function (DUF2497)	1891	2502	612	COG3827	Uncharacterized protein conserved in bacteria
CAA_10024	Antirestriction protein Ral	2499	3023	525		
CAA_10025	Valyl-tRNA synthetase	3197	4408	1212	COG0525	Valyl-tRNA synthetase

Tabela 4 – ORFs anotadas do fosmídio E11 proveniente da biblioteca metagenômica

.(conclusão)

CAA_10031	Valyl-tRNA synthetase	1	1512	1512	COG0525	Valyl-tRNA synthetase
CAA_100310	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	9142	10494	1353	COG0544	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)
CAA_100311	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases	10656	11120	465	COG0740	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases
CAA_100312	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases	11117	11308	192	COG0740	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases
CAA_100313	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit	11503	12768	1266	COG1219	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit
CAA_100314	ATP-dependent Lon protease, bacterial type	12935	14791	1857	COG0466	ATP-dependent Lon protease, bacterial type
CAA_100315	Prephenate dehydrogenase	15038	15982	945	COG0287	Prephenate dehydrogenase
CAA_100316	hypothetical protein	15976	16419	444		
CAA_100317	hypothetical protein	16437	16649	213		
CAA_10032	GGDEF domain	1663	4233	2571	COG3290; COG4252; COG5001	Signal transduction histidine kinase regulating citrate/malate metabolism
CAA_10033	FOG: EAL domain	4230	4496	267	COG2200	FOG: EAL domain
CAA_10034	Cholesterol oxidase, substrate-binding	4515	4757	243		
CAA_10035	Glutamine synthetase	4945	6354	1410	COG0174	Glutamine synthetase
CAA_10036	Nitrogen regulatory protein PII	6471	6809	339	COG0347	Nitrogen regulatory protein PII
CAA_10037	Predicted sugar kinase - COG0063	7041	8618	1578	COG0062; COG0063	Uncharacterized conserved protein; Predicted sugar kinase
CAA_10038	hypothetical protein	8723	8911	189		
CAA_10041	hypothetical protein	1	240	240		
CAA_10051	hypothetical protein	2	253	252		

5.12 Anotação do fósídeo A8

A anotação do fósídeo A8 também foi realizada com a ferramenta IMG/MER. Um total de 56 ORFs foi predito, das quais 29 foram atribuídas alguma função e 27 com funções desconhecidas. A organização das ORFs presentes no inserto fosmidial encontra-se ilustrada na Figura 30. As informações referentes ao tamanho das regiões codificantes em nucleotídeos e suas referências relacionadas à base de dados COG estão descritas na Tabela 5.

Figura 30 - Representação esquemática do inserto totalmente sequenciado do fósídeo A8 derivado da biblioteca metagenômica

Tabela 5 – ORFs anotadas do fosmídeo A8 proveniente da biblioteca metagenômica

.(continua)

Gene ID	Nome do Gene	Início	Final	Tamanho (pb)	COG ID	Função COG
CAAC_10011	Uncharacterized protein conserved in bacteria	58	612	555	COG4254	Uncharacterized protein conserved in bacteria
CAAC_100110	Uncharacterized protein conserved in bacteria	9467	9904	438	COG5388	Uncharacterized protein conserved in bacteria
CAAC_100111	Aldehyde dehydrogenase family	10154	10687	534		
CAAC_100112	Aldehyde dehydrogenase family	10690	11220	531		
CAAC_100113	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	11230	12111	882	COG0212	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
CAAC_100114	Dioxygenases related to 2-nitropropane dioxygenase	12117	13133	1017	COG2070	Dioxygenases related to 2-nitropropane dioxygenase
CAAC_100115	hypothetical protein	13275	14261	987		
CAAC_10012	Uncharacterized protein conserved in bacteria	784	1509	726	COG4254	Uncharacterized protein conserved in bacteria
CAAC_10013	Fe2+-dicitrate sensor, membrane component	1709	2287	579	COG3712	Fe2+-dicitrate sensor, membrane component
CAAC_10014	Glycine rich protein Family	2484	2807	324	COG1512	Beta-propeller domains of methanol dehydrogenase type
CAAC_10015	ADP-ribose pyrophosphatase	2913	3320	408	COG1051	ADP-ribose pyrophosphatase
CAAC_10016	Acetyltransferases, including N-acetylases of ribosomal proteins	3322	3909	588	COG1670	Acetyltransferases, including N-acetylases of ribosomal proteins
CAAC_10017	N-acetylglutamate synthase (N-acetylornithine aminotransferase)	3890	5122	1233	COG1364	N-acetylglutamate synthase (N-acetylornithine aminotransferase)
CAAC_10018	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	5214	6224	1011	COG0760	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase
CAAC_10019	Preprotein translocase subunit SecA (ATPase, RNA helicase)	6501	9287	2787	COG0653	Preprotein translocase subunit SecA (ATPase, RNA helicase)
CAAC_10021	hypothetical protein	114	977	864	COG5266	ABC-type Co2+ transport system, periplasmic component
CAAC_10022	Antirepressor regulating drug resistance, predicted signal transduction N-terminal membrane component - COG4219	974	3100	2127	COG3133; COG4219; COG5665	Outer membrane lipoprotein; Antirepressor regulating drug resistance, predicted signal transduction N-terminal membrane componentcomplex
CAAC_10023	Predicted transcriptional regulator - COG3682	3097	3483	387	COG3682	Predicted transcriptional regulator
CAAC_10024	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) - cyclophilin family	3578	4090	513	COG0652	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) - cyclophilin family
CAAC_10025	hypothetical protein	4106	5023	918	COG4785	Lipoprotein Nlpl, contains TPR repeats
CAAC_10031	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases	94	1284	1191	COG0626	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases

Tabela 5 – ORFs anotadas do fosmídio A8 proveniente da biblioteca metagenômica

(continuação)

CAAC_10032	hypothetical protein	1548	2012	465		
CAAC_10041	hypothetical protein	55	306	252		
CAAC_10051	hypothetical protein	46	267	222		
CAAC_100510	Homoserine dehydrogenase	8452	9543	1092	COG0460	Homoserine dehydrogenase
CAAC_10052	hypothetical protein	296	1429	1134		
CAAC_10053	hypothetical protein	1518	3170	1653	COG1629; COG3853	Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport; Uncharacterized protein involved in tellurite resistance
CAAC_10054	hypothetical protein	3201	4823	1623	COG1114	Branched-chain amino acid permeases
CAAC_10055	hypothetical protein	5040	5408	369		
CAAC_10056	Cupin domain	5405	5770	366	COG1917	Uncharacterized conserved protein, contains double-stranded beta-helix domain
CAAC_10057	Domain of unknown function (DUF365)	6227	6547	321		
CAAC_10058	Protein of unknown function (DUF3325)	6544	6759	216		
CAAC_10059	hypothetical protein	6756	7922	1167		
CAAC_10061	Sulfotransferase Family	1	306	306		
CAAC_10071	hypothetical protein	1	225	225		
CAAC_100710	hypothetical protein	3830	4102	273		
CAAC_100711	hypothetical protein	4556	4735	180		
CAAC_100712	hypothetical protein	5120	5296	177		
CAAC_100713	hypothetical protein	5289	5435	147		
CAAC_10072	hypothetical protein	283	408	126		
CAAC_10073	Chloramphenicol O-acetyltransferase	408	575	168	COG4845	Chloramphenicol O-acetyltransferase
CAAC_10074	Chloramphenicol O-acetyltransferase	675	968	294	COG4845	Chloramphenicol O-acetyltransferase
CAAC_10075	Site-specific recombinase XerD	1069	1371	303	COG4974	Site-specific recombinase XerD
CAAC_10076	hypothetical protein	1371	1568	198		
CAAC_10077	hypothetical protein	1732	2168	437		
CAAC_10078	Initiator Replication protein	2783	3223	441		
CAAC_10079	hypothetical protein	3527	3673	147		
CAAC_10081	SinI restriction endonuclease	1	159	159		

Tabela 5 – ORFs anotadas do fosmídio A8 proveniente da biblioteca metagenômica

(conclusão)

CAAC_10082	hypothetical protein	474	917	444		
CAAC_10091	hypothetical protein	2	289	288		
CAAC_10092	Protein of unknown function (DUF2524)	229	381	153		
CAAC_10101	hypothetical protein	2	232	231		
CAAC_10111	hypothetical protein	1	267	267		
CAAC_10121	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases	57	254	198	COG0740	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases
CAAC_10131	hypothetical protein	1	282	282		
CAAC_10141	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	122	265	144	COG0065	3-isopropylmalate dehydratase large subunit

As ORFs obtidas nos sequenciamentos dos clones não apresentaram similaridade com as bases de dados disponíveis, no que se refere ao complexo celulolítico, portanto, os resultados destas buscas indicam que provavelmente são genes desconhecidos, ainda não identificados. Porém ainda há necessidade de maiores estudos para que se consiga a comprovação.

Os micro-organismos são responsáveis pela maior parte dos ciclos biogeoquímicos que formam o ambiente dos solos e oceanos (VENTER et al., 2004). A microbiota não-cultivável, que realiza uma função vital nos processos do ambiente natural, é uma larga fonte de recursos para aplicação biotecnológica.

Alguns estudos mostram que a técnica metagenômica oferece uma associação quase ilimitada para encontrar novos genes que codifiquem produtos biotecnológicos relevantes, como as enzimas, lipases, amilases, celulase, quitinases, esterases, e outras envolvidas com biossínteses (KNIGHT et al., 2003).

A aplicação da tecnologia de recombinação genética melhorou ainda mais os processos de manufatura e permitiu a comercialização de enzimas que não podiam ser produzidas anteriormente. Além disso, os mais recentes desenvolvimentos da biotecnologia moderna, incluindo engenharia de proteínas e evolução dirigida, revolucionaram ainda mais o desenvolvimento de enzimas industriais.

Vários novos produtos naturais de interesse biotecnológico foram descobertos através da abordagem metagenômica, como esterases (XINMIN et al., 2008; PENG et al., 2011; FAN et al., 2012), celulasas (PANG et al., 2009; POTTKAEMPER et al., 2009), amilases (SHARMA et al., 2010), lipases (ELED et al., 2007; GLOGAUER et al., 2011), hidrolases (BIJTENHOORN et al., 2011), enzimas diversas (LEE et al., 2008), isoprenoides, ácidos graxos poliinsaturados e flavonoides (CHEMLER et al., 2006) e antibióticos como glicopeptídeos (BANIK; BRADY, 2008) e policetídeos (PARSLEY et al., 2011, NIKOLOULI; MOSSIALOS, 2012).

5.13 Caracterização do Perfil Enzimático

Para a caracterização enzimática dos clones 307/E11 e 283/A8, os sobrenadantes das culturas, após 5 horas de incubação, em meio de cultura acrescido de farelo de trigo e CMC foram analisados em gel de poliácridamida 12% e o perfil de secreção dos clones analisados para cada substrato (Figura 31).

Figura 31 - Análise eletroforética do sobrenadante da cultura dos clones 307/E11 e 283/A8 em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado com *Comassie Blue Coloidal*. Em **M**, o marcador de peso molecular *Unstained Protein Marker* da Fermentas®, com o tamanho de suas bandas indicados à esquerda. EM **1** e **2**, o sobrenadante da cultura em farelo de trigo, sendo os clones 283/A8 e 307/E11 respectivamente. Em **3** e **4**, o sobrenadante da cultura em CMC, sendo os clones 283/A8 e 307/E11 respectivamente

No sobrenadante das culturas dos clones crescidas em farelo de trigo, principalmente 307/E11 existem proteínas de diversos tamanhos e com diferentes níveis de expressão. Os sobrenadantes das culturas com CMC apresentaram uma proteína em grande quantidade com aproximadamente 35 kDa para os dois clones.

O meio de cultura utilizado para a indução de enzimas específicas é fundamental para a eficiência da hidrólise enzimática.

Micro-organismos celulolíticos produzem enzimas complexas que apresentam problemas consideráveis de fracionamento. Métodos cromatográficos de troca iônica tem sido usado para a separação e purificação (PESSELA et al., 2004). Neste trabalho, as enzimas presentes no extrato enzimático produzido pelo clone 307/E11 crescido com farelo de trigo, foram purificadas por cromatografia de troca aniônica.

Optou-se por selecionar somente o clone 307/E11 devido à sua maior produção e complexidade enzimática (Figura 32).

Figura 32 – Cromatografia de troca iônica das proteínas do clone 307/E11. A amostra foi concentrada com sulfato de amônio e separada em resina trocadora aniônica High-Q (Bio-Rad) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e eluída no mesmo tampão com NaCl 0,5 M. A amostra foi aplicada em fluxo de 1 mL min⁻¹ (1 a 10 min) e a eluição foi efetuada a 2 mL min⁻¹ (10 a 8 min). A atividade de endoglicanase está representada como glicose liberada

As frações coletadas (2 min cada) foram reunidas de acordo com o perfil de eluição das proteínas e avaliadas quanto à atividade celulolítica, de acordo com o item 4.17.1. Na Tabela 6 estão representadas as dosagens das frações com atividade biológica.

Tabela 6 – Atividade enzimática das frações obtidas do clone 307/E11 por cromatografia

Frações	Atividade enzimática ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
82	1,13
84	1,35
86	1,23
88	1,03
90	1,0
92	0,54
94	0,45
96	0,09
98	0,00
100	0,00

Podemos observar que a produção enzimática das frações obtidas do clone 307/E11 diminuiu quando comparada com a produção enzimática dos extratos brutos demonstrados na Tabela 1, onde variou de 0,12 a 14,8 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

A influência do pH e da temperatura na hidrólise da celulose foram avaliadas incubando-se as frações 82 a 90 em pH variáveis de 02 a 10 e temperaturas variáveis de 30 a 80°C durante 30 minutos, de acordo com o item 4.18 (Figura 33 e Figura 34). Com relação ao pH foi encontrado novamente o valor de atividade ideal em 5,0 e a temperatura em 50°C

Podemos verificar que quando comparamos a capacidade de produção em altas temperaturas do extrato bruto com as frações, há uma perda significativa. Todas as frações testadas decresceram com o aumento da temperatura, sendo praticamente inexistente a partir dos 70°C. Isto pode ter ocorrido pois o complexo enzimático presente no extrato bruto acarreta numa maior estabilidade térmica.

Figura 33 - Atividade enzimática as frações do clone 307/E11 de acordo com a variação do pH. Cada quantificação representa a média das triplicadas

Figura 34 - Efeito da temperatura sobre atividade enzimática das frações do clone 307/E11. A atividade foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas seguidas do ensaio enzimático. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade relativa das enzimas

As propriedades físico-químicas encontradas para o complexo enzimático do clone 307-E11 são semelhantes às aquelas caracterizadas na literatura para linhagens de *B. subtilis* (BELIEN et al., 2009; YOON, 2009) e outras linhagens de *Bacillus* (YIN et al., 2010), com temperatura ótima em torno de 50°C, pH pouco ácido (entre 5,0 e 7,0) e uma massa molecular provável entre 30 e 40 KDa, micro-organismos pertencentes ao Filo Proteobacteria, o mesmo identificado para o clone 307/E11. Essas características são de interesse para a indústria de conversão de biomassa, em que os processos ocorrem em pH ácido (HARRIS; DEBOLT, 2010; KUMAR et al., 2008).

Diversas linhagens e espécies de micro-organismos tem sido estudada para a produção de todas as enzimas do complexo celulolítico em diferentes fontes de carbono, pH, temperatura, estabilidade térmica e principalmente sinergismo entre as enzimas (ZHANG; DONALDSON, 2012; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009; KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

Segundo Singhania et al. (2010), a escolha de coquetéis enzimáticos eficientes para a hidrólise enzimática da biomassa celulósica tem sido um grande desafio para as pesquisas. A eficiência hidrolítica de um coquetel é dependente de

propriedades individuais das enzimas e também da interação entre elas. Um coquetel ideal deve apresentar alta atividade hidrolítica sobre a biomassa celulósica, atuar em valores de pHs relativamente próximos ao pré-tratamento escolhido, apresentar pouca inibição pelo produto e ter um bom custo benefício.

Devido a intensa procura industrial, estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (JORGENSEN et al., 2005; KANG et al., 2004).

6 CONCLUSÕES

A enorme diversidade microbiana de biomas brasileiros representa um reservatório inexplorado de novos genes e metabolismos que desempenham um papel fundamental na saúde ambiental. Além disso, a diversidade microbiana representa um grande reservatório para a descoberta e aplicações biotecnológicas. Descobertas baseadas em abordagem metagenômica, através de sequenciamento massivo podem representar abordagens adequadas para usar esta vasta biodiversidade. Porém poucos trabalhos mostram a biodiversidade microbiana da Caatinga, bem como o seu potencial biotecnológico. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- Os clones 283/A8 e 307/E11 obtiveram tempo ótimo de produção enzimática aproximadamente 4 horas de cultivo para todas as enzimas testadas, indicando a eficiência de produção;
- Farelo de Trigo foi o melhor substrato celulósico para a produção enzimática pelos clones testados;
- Não foi possível a identificação e correlação dos genes responsáveis pela produção do complexo celulolítico de acordo com as bases de dados disponíveis;
- A análise eletroforética das enzimas produzidas pelos clones 283/A8 e 307/E11 demonstrou que o tamanho e quantidade das proteínas produzidas dependem do substrato utilizado;
- A purificação parcial das enzimas produzidas pelo clone 307/E11 demonstrou que o complexo enzimático bruto possui uma maior estabilidade quando em variações de pH e temperaturas mais elevadas do que as frações purificadas.

REFERÊNCIAS

ANGELO, R.S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. de (Org.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EducS, 2004. cap. 8 p. 263-288.

AQUINO, A.C.M.H. **Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades da glucoamilase e α -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1**. 2001. 121 p. Dissertação (Mestrado em Biologia comparada)- FFCLRP/USP - Ribeirão Preto-SP, 2000.

ARANTES, V., & SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. London, n. 3 v. 4, p. 1- 11, 2010.

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; ASTOLFI, S.F.; RADFORD, A. Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 136, p. 2569-2576, 1990.

BANIK, J.; BRADY, S.F. Cloning and characterization of new glycopeptide gene clusters found in an environmental DNA megalibrary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Salt Lake City, v. 105, p. 17272-17277, 2008.

BAYER, E.A; LAMED, R.; WHITE, B.A.; FLINT, H.J. From cellulosomes to cellulosomics. **The Chemical Records**, New York, v. 8, p. 364-377, 2008.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

BELIEN, T.; JOYE, I.J.; DELCOUR, J.A.; COURTIN, C.M. Computational design-based molecular engineering of the glycosyl hydrolase family 11 B. subtilis XynA endoxylanase improves its acid stability. **Protein Engineering, Design and Selection**, Oxford, v. 22, p. 587-596, 2009.

BIJTENHOORN, P.; SCHIPPER, C.; HORNING, C.; QUITSCHAU, M.; GROND, S.; WEILAND, N.; STREIT, W.R. BpiB05 a novel metagenoma-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 155, p. 86-94, 2011.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), Rio de Janeiro, 2008. 506 p.

BOUZAS, M.T.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; VILLA, T.G. Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: A review. **Protein & Peptide Letters**, Gainesville, v.13, p. 645-651, 2006.

BUDDADEE, B.; WIROJANAGUD, W.; WATTS, D.; PITAKASO, R. The development of multi-objective optimization model for excess bagasse utilization: A case study for Thailand. **Environmental Impact Assessment Review**, Gattikon, v. 28, p. 380-391, 2008.

CARDELLO, L.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Microbiology**, London, v. 140, p. 1671-1677, 1994.

CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CARRIQUIRY, M.A.; DU, X.; TIMILSINA, G.R. Second generation biofuels: economics and policies, **Energy Police**, Center for Agricultural and Rural Development at Iowa State University, p. 1-55, 2011.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHEMLER, J.A.; YAN, Y.; KOFFAS, M.A.G. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 5, n. 20, p. 1-9, 2006.

CHEN, R.R. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 730-738, 2007.

CHOI, H.; ZHANG, K.; DIONYSIOU, D.D.; OERTHER, D.B.; SORIAL, G.A. Influence of cross-flow velocity on membrane performance during ultrafiltration of biological suspension. **Journal Membrane Science**, Pennsylvania, v. 248, p. 189-199, 2005.

COSTA, C.C.A.; OLIVEIRA, F.L.; CAMACHO, R.G.V.; DANTAS, I.M.; MARACAJÁ, P.G. Entomofauna presente no conteúdo da serapilheira em área de caatinga na floresta nacional do Açu-RN. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 8, n.4, p. 50-56, 2013.

COUGHLAN, M.P.; LJUNGDAHL, L.G. Comparative Biochemistry of Fungal and Bacterial Cellulolytic Enzyme Systems. **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation (Fems Symposium)**, St Luis, v. 3, p.11-30,1988.

DANIEL, R. The soil metagenome--a rich resource for the discovery of novel natural products, **Current Opinion in Biotechnology**, Cambridge, v.15, n.3 p. 199-204, 2004.

DEMAIN, A.L.; NEWCOMB, M.; WUM D.J.H. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Washington, v. 69, p. 124-154, 2005.

DE PAULA, E.H.; FARIA, F.P.; BARBOSA, C.D.; CORNÉLIO, I.N.; PEREIRA, L.R.; AZEVEDO, M.O. Sacarificação de compostos lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Anais da Enzitec**, Rio de Janeiro, 1998. 15p.

DRUMOND, M.A.; KIIL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C de; ALBUQUERQUE, S.G. de; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTI, J. **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga**: estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. Documento para discussão no GT estratégias para o uso sustentável. Pretrolina, 2000. 23p.

DUAN, C.J.; FENG, J.X. Mining metagenomes for novel cellulase genes. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 32, p. 1765-1775, 2010.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 275-282, 2009.

EGOROVA, K.; ANTRANIKIAN, G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, Paris, v. 8, p. 649-655, 2005.

ELEND, C.; SCHMEISSER, H.; HOEBENREICH, H.L.; STEELE, W.R.S. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (*R*)-ibuprofen esters. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 130, p. 370-377, 2007.

ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J.D.; STEELE, H.L.; REYMOND, J.L.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome—derived esterases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3637-6345, 2006.

ENARI, T.M. Microbial lipases. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, London: applied Science Publishers, 1983.

EVELEIGH, D.E. Cellulase: a perspective. **Philosophical Transactions Royal Society of London**, Series A, London, v. 321, p. 435-447, 1987.

FAN, X.; LIU, X.; LIU, Y. The cloning and characterization of one novel metagenome-derived thermostable esterase acting on N-acylhomoserine lactones. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Amsterdam, v. 83, p. 29-37, 2012.

FARGIONE, J.; HILL, J.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; HAWTHORNE, P. Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science**, Washington, v. 319, p. 1235-1238, 2008.

FARINAS, C.S. **A parede celular vegetal e suas enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13p.

FARINAS, C. S.; LEMOS, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida**. Embrapa, 2008. 13p. (Boletim Técnico Embrapa).

FENG, Y.; DUAN, C.J.; PANG, H.; MO, X.C.; WU, C.F.; YU, Y.; HU, Y.L.; WEI, J.; TANG, J.L.; FENG, J.X. Cloning and identification of novel cellulose genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Berlím. v. 75, n. 2, p. 319-328, 2007.

FERRER, M.; GOLYSHINA, O.V.; CHERNIKOVA, T.N.; KHACHANE, A.N.; REYES-DUARTE, D.; SANTOS, V.A.P.M.D.; STROMPL, C.; ELBOROUGH, K.; JARVIS, G.; NEEF, A. et al. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environmental Microbiology**, Washington. v. 7, p. 1996-2010, 2005.

FIESELER, L.; HENTSCHEL, U.; GROZDANOV, L.; SCHIRMER, A.; WEN, G.; PLATZER, M.; HRVATIN, S.; BUTZKE, D.; ZIMMERMANN, K.; PIEL, J.; Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73 n. 7 p.2144-2155, 2007

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Laysanne, v. 18, n. 3, p. 303-307, 2004.

FUJII, K.; KUWAHARA, A.; NAKAMURA, K.; YAMASHITA, Y. Development of a simple cultivation method for isolating hitherto-uncultured cellulose-producing microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlím, v.91, p. 1183-1192, 2011.

GABOR, E.M.; ALKEMA, W.B.L.; JANSSEN, D.B. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 879-886, 2004.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. To self science. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. p. 11-15.

GLOGAUER, A. **Isolamento de clones com atividade lipolítica do metagenoma de solo contaminado com gordura animal e caracterização e uma nova e eficiente lipase**. 2011. 99p. Dissertação (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GOMES, J.; TERLER, K.; KRATZER, R.; KAINZ, E.; STEINER, W. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 4, p. 969-975, 2007.

- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 135-141, 2007.
- GHOSH, R.P.; NIKITINA, T.; HOROWITZ-SCHERER, R.A.; GIERASCH, L.M.; UVERSKY, V.N.; HITE, K.; et al. Unique physical properties and interactions of the domains of methylated DNA binding protein 2. **Biochemistry**, Washington, v. 49, p. 4395–4410, 2010.
- GROßKOPF, R.; STUBNER, S.; LIESACK, W. Novel Euryarchaeota lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 960-969, 1998.
- HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 89, p.17-34, 2003.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.; STEINER, W.; ZUPANCIC. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 58, p. 137-161, 1996.
- HAMADA, N.; FUSE, N.; KODAIRA, R.; KANDA, J. Cloning and characterization of a new exo-cellulase gene, cel3, in *L. lactus*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 172, p. 231-237, 1999.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, Amsterdam, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.
- HARRIS, D.; DEBOLT, S. Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 8, n. 2, p. 244-262, 2010.
- HEALY, F.G.; RAY, R.M.; ALDRICH, H.C.; WILKIE, A.C.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 4, p. 667-674, 1995.
- HENNE, A.; DANIEL, R.; SCHIMITZ, R.A.; GOTTSCHALK, G. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3901-3907, 1999.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍRREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A. et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**. 2002. Disponível em: <http://genomebiology>. Reviews. Acesso em : 22/08/2014

IBRAHIM, A.S.S.; EL-SHAYEB, N.M.A.; MABROUK, S.S. Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian Soda Lake. **Journal of Applied Sciences Research**, Islamabad, v. 3, n. 11, p. 1363-1368, 2007.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. Washington, v. 41, p. 1454-1461, 2002.

JANG, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 19, p. 263-268, 2003.

JÍMENEZ-ZURDO, J.I.; MATEOS, P.F.; DAZZO, F.B.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 28, p. 917-921, 1996a.

_____. Influence of the symbiotic plasmid (pSym) on cellulase production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* ANU843. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 28, p. 131-133, 1996b.

JORGENSEN, H.; MORKEBERG, A.; KROGH, K.B.R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 42-48, 2005.

JUHÁSZ, T.; EGYHAZI, A.; RÉCZEY, K. β -Glucosidase production by *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cham, v. 121, n. 1-3, p. 243-254, 2005.

KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 153-156, 2004.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012. 244 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

KIM, Y.S.; JUNG, H.C.; PAN, J.G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 788 – 793, 2000.

KIM, S.J.; LEE, C.M.; HAN, B.R.; KIM, M.Y.; YEO, Y.S.; YOON, S.H.; KOO, B.S.; JUN, H.K. Characterization of a gene encoding cellulose from uncultured soil bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 282, p. 44-51, 2008.

KIRINO, H.; AOKI, M.; AOSHIMA, M.; HAYASHI, Y.; OHBA, M.; YAMAGISHI, T.; WAKAGI, T.; OSHIMA, T. Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. **European Journal of Biochemistry**, Dublin, v.220, n.1 p. 275-281, 1994.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B.A.; BLANCH, H.W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 109, p. 1083-1087, 2012.

KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a bene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1408-1415, 2003.

KNIGHT, S.L. **Best institutional practices for farmworker and community equity-sharing schemes**. 2003. 251p. Unpublished Marster of Agricultural Management Dissertation, School of Agricultural Sciences and Agrobusiness, University of Natal, Pietermaritzburg, 2003.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 377-391, 2008.

LADEIRA, S.A. **Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por bacillus sp. smia-2 e propriedades da enzima**. 2009. 108p. Tese (Mestrado em Produção vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 108 p. 2009.

LADEIRA, S.A.; ANDRADE, M.V.V.; DELATORRE, A.B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M.L.L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova** (online), v. 33, N. 2, p. 324-328, 2010.

LAMED, R.; SETTER, E.; KENIG, R.; BAYER, E.A. **Cellulosome**: a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities, v. 13, 1983.

LAMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 127, p. 575-592, 2007.

LANGER, E.S. Capitalizing on novel expression systems. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, New Rochelle v. 14, p. 12, 2009.

LEE, C.-M.; YEO, Y.-S.; LEE, J.-H.; KIM, S.-J.; KIM, J.-B.; HAN, N.S.; KOO, B.-S.; YOON, S.-H. Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 370, p. 322-326, 2008.

LEE, D.G.; JEON, J.H.; JANG, M.K.; KIM, N.Y.; LEE, J.H.; KIM, S.J.; KIM, G.D.; LEE, S.H. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. **Biotechnology Letters**, Berlin, v. 29, n. 3, p. 465-472, 2007.

LEHNINGER, A.L., **Bioquímica**, 2ªed., v.1, São Paulo, 1976, 265p.

LESCHINE, S. Cellulose degradation in anaerobic environments. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 399-426, 1995.

LEVY, I.; SHANI, Z.; SHOSEYOV, O. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 19, p. 17-30, 2002.

LIMA, A.L.G.; NASCIMENTO, R.P.; BON, E.P.S.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulose production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbiology Technology**, Amsterdam, v. 37, p. 272-277, 2005.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature**, London, v. 3, p. 510-516, 2005.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Washington, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo, D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004, 10p.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 34 n. 3, p. 461-488, 2000.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 60, p. 3512-3538, 1996.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, Malden, v. 6, p. 21-33, 1976.

MARKOWITZ, V.M.; CHEN, I-M.A.; PALANIAPPAN, K. et al. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. 115-122, 2012.

MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MORALES, V.M.; HUBBELL, D.H. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1186-1188, 1979.

MATEOS, P.F.; JÍMENEZ-ZURDO, J.I.; CHEN, J.; SQUARTINI, A.; HAACK, S.K.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HUBBELL, D.H.; DAZZO, F.B. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biobar. *Trifolii* **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 1816-1822, 1992.

MATSUSHITA, O.; RUSSELL, J.B.; WILSON, D.B. Cloning and sequencing of a *Bacteroides rumnicola* B₁₄ endoglucanase gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 3620-363, 1990.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292–324, 1994.

MELO, G. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico Humicola grisea var. thermoidea em diferentes substratos lignocelulósicos**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) Universidade Federal de Goiás, Goiânia - 2010, 68p.

MENEZES, R.S.; SAMPAIO, E.V.; GIONGO, V.; PÉREZ-MARIN, A.M. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga biome. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, p. 643-653, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORALES, V.M.; MARTÍNEZ-MOLINA; HUBBELL, D.H. Cellulase production by *Rhizobium*. **Plant Soil**, Berlin, v. 80, p. 407-415, 1984.

MUKHERJEE, A.K.; ADHIKARI, H.; RAI, S.K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 39, p. 353–361, 2008

NERIA-GONZÁLES, I.; WANG, E.T.; RAMÍREZ, F.; ROMERO, J.M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUES, C. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from southeast of Mexico. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 12, p. 122-133, 2006.

NI, J.; TAKEHARA, M.; MIYAZAWA, M.; WATANABE, H. Random exchanges of non-conserved amino acid residues among four parental termite cellulases by family shuffling improved thermostability. **Protein Engineering, Design and Selection**. Oxford, v. 20, p. 353-542, 2007.

NIKOLOULI, K.; MOSSIALOS, D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. **Biotechnology Letters**, Berlin, v. 34, p. 1393-1403, 2012.

OLIVEIRA, S.L.R. **Aproveitamento da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases**. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**. Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PALACKAL, N.; LYON, C.S.; ZAIDI, S.; LUGINBUHL, P.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; MACOMBER, J.L.; SHORT, J.M.; HAZLEWOOD, G.P.; ROBERTSON, D.E.; STEER, B.A. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 113-124, 2007.

PANG, H.; ZHANG, P.; DUAN, C.J.; MO, X.C.; TANG, J.L.; FENG, J.X. Identification of cellulose genes from metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. **Current Microbiology**, Berlin, v. 58, p. 404-408, 2009.

PARK, H.J.; JEON, J.H.; KANG, S.G.; LEE, J.H.; LEE, S.A.; KIM, H.K. Functional expression. And refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 52, p. 340-347, 2007.

PARSLEY, L.C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A.M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R.M.; LOPANIK, N.B.; LILES, M.R. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil *Acidobacteria*. **FEMS Microbiology Ecology**, Washington, v. 78, p. 176-187, 2011.

PENG, Q.; ZHANG, X.; SHANG, M.; WANG, S.; WANG, G.; LI, B.; GUAN, G.; LI, Y.; WANG, Y. A novel esterase gene cloned from a metagenomic library for neritic sediments of the South China Sea. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, n.95, p. 1-10, 2011.

PESELA, B.C.C.; TORRES, R.; FUENTES, M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; VIAN, A.; CARRASCOSA, A.V.; GARCIA, J.L.; GUISÁN, J.M.; LAFUENTE, R.F. Selective and mild adsorption of large proteins on lowly activated immobilized metal ion affinity chromatography matrices: purification of multimeric thermophilic enzymes overexpressed in *Escherichia coli*. **Journal of Chromatography A**, Washington, v. 1, n. 2, p. 93-98, 2004.

POTTKAEMPER, J.; BARTHEN, P.; ILMBERGER, N.; SCHWANEBERG, U.; SCHENK, A.; SCHULTE, M.; IGNATIEV, N.; STREIT, W.R. Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. **Green Chemistry**, Oxford, v. 11, p. 957-965, 2009.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R.E.; FOLCH-MALLOL, J.L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotecnología Aplicada**, Cubanacán, v. 28, p. 205-215, 2011.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; LEMO, V.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. In: ENCONTRO DA SBPMAT (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS), 7., 2008. Guarujá. **Anais...** Guarujá, 2008. v. 1. 134p.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MacNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBOURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** Washington, v. 66, n. 6, p. 2541-2547, 2000.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulose biofuels. **Nature**, London, v. 454, n. 14, p. 841-845, 2008.

SALEH-RASTIN, N.; PETERSEN, M.; COLEMAN, S.; HUBBELL, D. Rapid plate assay for hydrolytic enzymes of *Rhizobium*. In: KEISTER, D.; GREGON, P. **The rhizosphere and plant growth**. The Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Press, 1991. X, 188p.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2028p.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SAMPAIO, G.; NOBRE, C.; COSTA, M.H.; SATYAMURTY, P.; SOARES-FILHO, B.S.; CARDOSO, M. Regional climate change over eastern Amazonia caused by pasture and soybean cropland expansion. **Geophysical Research Letters**, Washington, DC, v. 34, n.17, p.1-7, 2007.

SAMPAIO, E.; RODAL, M.D.J. Fitofisionomias da caatinga. In: **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga**. Petrolina, 2000. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org/caatinga/relatorios/fitofisionomias.pdf>> Acesso em: 01/03/2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Washington, v.27, p.185-194, 2009.

SANJUAN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibres from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, Berlin, v. 59, p. 447-450, 2001.

SANTOS, W. D.; GÓMEZ, E. O.; BUCKERIDGE, M. S. Bioenergy and the sustainable revolution. In: _____. **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, , 2011.cap. 2, p. 15-26.

SARANRAJ, P.; STELLA, D.; REETHA, D. Microbial cellulases and its applications: a review. **International Journal of Biochemistry & Biotech Science**, Chidambaram, v. 1, p. 1-12, 2012.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Cambrige, v. 14, p. 303-310, 2003.

_____. Toward a census of bacterial in soil. **PLOS Computational Biology**, San Francisco, v. 2, p. 786-793, 2006.

SCHMEISSER, C.; STOCKIGT, C.; RAASCH, C.; WINGENDER, J.; TIMMIS, K.N.; WENDEROTH, D.F.; FLEMMING, H.C.; LIESEGANG, H.; SCHITZ, R.A.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7298-7309, 2003.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: MAnole, 1985. 489 p.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land use charge. **Science**, Washington, v. 319, p. 1157-1268, 2008.

SEGEL, I.H. **Bioquímica. Teoria e Problemas**. Rio de Janeiro: Ed. Livros técnicos e científicos, 1979. 527p.

SHARMA, S.; KHAN, F.G.; QAZI, G.N. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 86, p. 1821-1828, 2010.

SHIN, H.D.; CHEN, R.R. Extracellular recombinant protein production from an *Escherichia coli* lpp deletion mutant. **Biotechnology and Bioengineering**. Malden. v. 101, n. 6, p. 1288-1296, 2008.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 46, p. 541-549, 2010.

SOARES JR, F.L.; MELO, I.S.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, p. 2195-2203, 2012.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Washington, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.; MEDEIROS, A.B.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITAO, V.; GOTTSCHALK, L.M.; ARAUJO JDE, A.; TORRES, F. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, Amsterdam v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences** (online), v. 103 n. 32 p. 12115-12120, 2006.

SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D.L. A Proteomics Approach to Study Soybean and Its Symbiont *Bradyrhizobium japonicum* – A Review, 30 p., 2013. Acesso em: <http://dx.doi.org/10.5772/5372>

TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. **Microbial Ecology**, London, v. 40, p. 169-176, 2000.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; TAKESHI, U. Cloning, sequencin, and expression of the cellulose genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 50, p. 137-147, 1996.

TANAKA, T.; SHIMOMURA, Y.; HIMEJIMA, M.; TANIGUCHI, M.O.S. Characterization of xylan-utilizing anaerobes from mesophilic and thermophilic methane sludge and their xylan degrading enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 50, n. 9, p. 2185-2192, 1981.

TÉBEKA, I.R.M.; SILVA, A.G.L.; PETRI, D.F.S.; **Langmuir** 2009, 25, 1582.

TENGERDY, R.P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 169-179, 2003.

THYS, R.C.S. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. Kr10. 2004. 104p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

TIMILSINA, G.R.; BEGHIN, J.C.; MEVEL, S.; VAN DER MENSBRUGGHE, D. The impacts of biofuel targets on land-use change and food supply: a global CGE assessment. **Word Bank Policy Research Working Paper** WPS5513. World Bank, Washington, DC, 2010.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TOUSSAINT, A.; GHIGO, J.M.; SALMOND, G.P. A new evaluation of our life-support system. **EMBO Reports**, Malden, v. 4, n. 9, p. 820-824, 2003.

UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nature Biotechnology**, London, v. 23, p. 88-93, 2005.

VÁSQUEZ, M.P.; SILVA, J.N.C.; SOUZA, M.B.; PEREIRA Jr.; N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cham, v. 137/140, n. 1/12, p. 141-153, 2007.

VAZQUEZ, S.C.; HERNANDEZ, E.; CORMACK, W.P. Extracellular proteases from the Antarctic marine pseudoalteromonas sp. P96-47 strain. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 40, n. 1, p. 63-71, 2008.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.; HALPERN, A.; RUSCH, D.; EISEN, J.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSEON, K.; NELSON, W.; FOURS, D.; LEVY, S.; KNAP, A.; LOMAS, M.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, P.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y.; SMITH, H. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, p. 66-74, 2004.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.65, p. 1-43, 2001.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, Ohio, v. 13, p. 42-43, 1956.

VOGET, S.; STEELE, H.L.; STREIT, W.R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulose. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 126, p. 26-36, 2006.

XINMIN, C.; HAOZE, H.; CHANGQUAN, G.; BAOLIN, S. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, p. 615-625, 2008.

XIN, Z.; WATANABE, N.; LAM, E. Improving efficiency of cellulosic fermentation via genetic engineering to create “smart plants” for biofuel production. In: **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011. cap. 12, p. 181-197.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, Malden, v. 15, p. 1713-1731, 2006.

WAEONUKUL, R.; PASON, P.; KYU, K.L.; SAKKA, K.; KOSUGI, A.; MORI, Y.; RATANAKHANOKCHAI, K. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a multidomain endo-beta-1,4-xylanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, and characterization of the recombinant enzyme. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 19, p. 277-285, 2009.

WALKER, L.P.; WILSON, D.B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 3-14, 1991.

WANG, F.; LI, F.; CHEN, G.; LIU, W. Isolation and characterization of novel cellulose genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, p. 650-657, 2009.

WANG, F.; PODELL, E.R.; ZAUG, A.J.; YANG, Y.; BACIU, P.; CECH, T.R.; LEI, M. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, **Nature**, London, v. 445, p. 506-510, 2007.

WYMAN, C.E.; DECKER, S.R.; HIMMEL, M.E.; BRADY, J.W.; SKOPEC, C.E.; VIIKARI, L. Em **Polysaccharides: strutural diversity and functional versatility**; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, 2005, cap. 43.

ZAMOST, B.L.; NIELSEN, H.K; STARNES, R.L. Thermostable enzymes for industrial applications. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 8 p. 71-82, 1991.

ZHANG, Z. DONALDSON, A.A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 30, p. 913-919, 2012.

YIN, L.J.; LIN, H.H.; CHIANG, Y.I.; JIANG, S.T. Bioprospectives and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 58, p. 557-562, 2010.

YODA, K.; TOYODA, A.; MUKOYAMA, Y.; NAKAMURA, Y.; MINATO, H. Cloning, sequencing, and expression. Of a *Eubacterium cellulosolvens* 5 gene encoding an endoglucanase (Cel5A) with novel carbohydrate-biding modules, and properties of Cel5A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 5787-5793, 2005.

YOON, K.H. Cloning of a *Bacillus subtilis* AMX-4 xynanase gene and characterization of the gene product. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 19, p. 1514-1519, 2009.

YUN, J.; KANG, S.; PARK, S.; YOON, H.; KIM, M.J.; HEU, S.; RYU, S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 7229-7235, 2004.