

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM METAGENOMA
DE SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM
VISTAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL**

André Ferreira de Camargo

BIÓLOGO

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM METAGENOMA
DE SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM
VISTAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL**

André Ferreira de Camargo

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2016

C172p Camargo, André Ferreira de
Potencial biotecnológico de um metagenoma de solo sob cultivo
de cana de açúcar com vistas na degradação da biomassa vegetal /
André Ferreira de Camargo. -- Jaboticabal, 2016
xvi, 92 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Co-orientadora: Karla Cristina Stropa Goulart
Banca examinadora: Alessandro de Mello Varani, Maria de
Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
Bibliografia

1. Glicosil hidrolases. 2. Celulases. 3. Hemicelulases. 4.
Metagenômica. 5. Etanol 2G. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM METAGENOMA DE SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM VISTAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL


AUTOR: ANDRÉ FERREIRA DE CAMARGO

ORIENTADOR: JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES POLIZELI
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Jaboticabal, 13 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

André Ferreira de Camargo – nascido em 5 de março de 1992, no município de São Simão, estado de São Paulo. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, em fevereiro de 2010, recebendo o título de bacharel em Ciências Biológicas em fevereiro de 2013. Durante a graduação, participou por dois anos da comissão organizadora da X e XI Jornada Anual Biológica da Unesp (JABU) – gestão 2011/2012. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no ano de 2011, e bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), no período de 2012/2013. Em março de 2014 ingressou no curso de mestrado no programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

A Deus, aos meus pais, Ismael e Sônia, aos meus irmãos Jorge, Lidi e Ju, a vocês que vivem e lutam comigo e por mim sempre, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me permitiu trilhar este caminho e superar todas as dificuldades e desafios que surgiram, nunca me deixando desamparado. Sou eternamente grato pela presença, pelo amor incondicional, pelas pessoas que colocou em meu caminho e que muito me auxiliaram e pelas aprendizagens que adquiri durante este tempo.

Aos meus amados pais, Ismael e Sônia, sempre presentes independente das circunstâncias, meus sinceros agradecimentos. Obrigado por tudo, por tanta atenção e zelo, presença, amor e alegria que me proporcionam. Obrigado por assim serem, sempre me fortalecendo e me servindo de espelho e ponto de reflexão para continuar seguindo na vida e ajudar a tornar este mundo um lugar melhor. Obrigado por existirem e me fazer sentir tão seguro, certo de que estarão presentes sempre que precisar.

Aos meus irmãos Jorge, Lidi e Ju e suas famílias, obrigado pelos conselhos, abraços, sorrisos, bolos, almoços e por toda atenção e por tudo de bom que me proporcionam, que Deus possa retribuir-lhes tanta generosidade!

À minha amada avó Olga, *in memoriam*, por todas as orações.

A todos os meus familiares, pelas conversas e conselhos que sempre me auxiliam, dão respaldo e aconselham, muito obrigado!

Aos meus amados amigos de Luiz Antônio, ao grupo de jovens UM, por todas as orações, conversas e pensamentos positivos de sempre!! Que consigamos caminhar sempre na unidade! Muito obrigado!

Aos meus amigos da Rep. Tua Ksa, muito obrigado pela convivência animada e tranquila do dia a dia, por toda compreensão, silêncios, filmes, festas e conversas que me ajudaram nesta trajetória. Sou muito grato por tê-los conhecido e por tê-los como amigos, como irmãos que muito estimo. Um forte abraço a todos!

A todos os meus amigos de laboratório, em especial à Karla, ao Omori, ao Valter, ao Barbeta e, por fim, mas não menos importante, ao Claudio. Amigos que agradeço a Deus por tê-los e que me ajudaram de forma inestimável durante esta caminhada, me ajudando nas correções, ideias, idas e vindas, conversas e momentos de descontração. Meus sinceros agradecimentos a vocês!! Que Deus possa abençoar, conservar e multiplicar sempre!

Ao Prof. Dr. Daniel Pinheiro e ao Msc. Wellington Omori pelas colaborações e aprendizagens em bioinformática.

À Profa. Dra. Eliana Lemos, ao LBMP, ao LGA e ao meu orientador Prof. Dr. Jackson A. Marcondes de Souza, primeiramente pela oportunidade de aprendizagem e desenvolvimento, e também por todas as contribuições e colaborações ao longo destes anos de contato.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Tabelas	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Aproveitamento de recursos da indústria sucroalcooleira com vistas na produção de energia	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Biomassa como fonte de energia renovável	21
2.2 Composição da biomassa lignocelulósica e energia renovável	23
2.2.1 Celulose.....	24
2.2.2 Hemicelulose	25
2.2.3 Lignina	27
2.2.4 Pectina.....	27
2.3 Características das enzimas lignocelulolíticas	28
2.3.1 Celulases.....	29
2.3.2 Hemicelulases	32
2.3.3 Módulo de ligação a carboidratos (CBM).....	33
2.3.4 Atividades Auxiliares (AA) e Carboidrato Esterase (CE)	34
2.3.5 Micro-organismos como fonte de enzimas	34
2.4 Metagenômica.....	35
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Coleta de solo e extração do DNA metagenômico da amostra	39
4.2 Montagem da biblioteca, sequenciamento <i>high throughput</i> e tratamento das <i>reads</i>	39
4.2.1 Amostra comparativa e obtenção dos dados taxonômicos e funcionais.....	40
4.2.2 Montagem dos dados do metagenoma e obtenção dos novos perfis taxonômico e funcional	41
5 RESULTADOS	44
5.1 Sequenciamento, validação da biblioteca metagenômica e processamento das <i>reads</i>	44

5.2	Quantidade de sequências (<i>reads</i>) resultantes do sequenciamento e comparação do perfil de qualidade das <i>reads</i> antes e após o processamento das mesmas.....	45
5.3	Perfil metagenômico da distribuição taxonômica da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA) comparado ao metagenoma de Floresta Tropical (FT) através do MG-RAST.....	48
5.4	Perfil funcional metagenômico da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA) comparado ao metagenoma de Floresta Tropical (FT) através do MG-RAST	49
5.5	Montagem dos dados metagenômicos.....	51
5.6	Perfil taxonômico do metagenoma de solo após montagem dos dados	51
5.7	Enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica identificadas nos dados montados do metagenoma da comunidade microbiana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar	53
6	DISCUSSÃO.....	59
6.1	Distribuição taxonômica do metagenoma das comunidades microbianas presentes em solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA) e floresta tropical (FT).....	59
6.2	Perfil funcional do metagenoma da comunidade microbiana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar voltado à degradação do material lignocelulósico	63
6.2.1	Relação das classes de micro-organismos e suas atuações no processo de degradação da biomassa lignocelulósica.....	67
6.2.2	Outras classes de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal	69
6.3	Perspectivas futuras.....	70
7	CONCLUSÃO	73
8	REFERÊNCIAS	74

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM METAGENOMA DE SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM VISTAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL

RESUMO – Indústrias e governos buscam pela obtenção de biocombustível celulósico, entretanto a desconstrução do arranjo lignocelulósico para obtenção de açúcares livres de forma eficiente e economicamente viável ainda é um grande desafio. Avanços conquistados através da metagenômica ressaltam sua aplicação como alternativa para compreender e desvendar o grande potencial metabólico presente nos ambientes a fim de superar tais desafios. Contudo, ainda são poucos os trabalhos voltados à cana-de-açúcar. O solo trata-se da maior fonte microbiana de todo o planeta, sendo essa biodiversidade ainda desconhecida, esta comunidade microbiana fornece um ponto de partida para a exploração de novas enzimas responsáveis para a degradação de biomassa vegetal. Este trabalho buscou acessar o panorama do perfil taxonômico e funcional do metagenoma da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar contendo palhada sobre o mesmo, possuindo como foco enzimas envolvidas na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Os dados encontrados demonstraram uma variedade de famílias enzimáticas envolvidas na degradação do complexo lignocelulósico. Verificou-se a presença de 27 famílias de *Glycoside Hydrolases* (GH), 21 famílias de *Carbohydrate-Binding Module* (CBM), 11 famílias de *Carbohydrate Esterases* (CE) e 4 famílias de *Auxiliary Activities* (AA). Os filos mais abundantes neste ambiente foram Proteobacteria e Actinobacteria, possuindo o último reconhecida importância industrial dadas suas enzimas com resistências a variações de pH e temperatura. Tal comunidade microbiana apresentou um grande potencial como fonte de enzimas promissoras para a pesquisa na construção de coquetéis enzimáticos voltados à degradação do material lignocelulósico para obtenção otimizada do etanol celulósico.

Palavras-chave: glicosil hidrolases, celulasas, hemicelulasas, metagenômica, etanol

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL IN A SOIL METAGENOME UNDER SUGARCANE CULTIVATION VIEWING THE DEGRADATION OF PLANT BIOMASS

ABSTRACT – Industries and governments seek for obtaining cellulosic biofuel, but the deconstruction of lignocellulosic arrangement to obtain free sugars efficiently and economically viable is still a big challenge. Advances made by metagenomics emphasize their application as an alternative to understand and unravel the great metabolic potential present in the environment in order to overcome such challenges. However, there are few studies related to sugarcane. The soil is the largest source of microbial whole planet, and its biodiversity still unknown, this microbial community provides a starting point for the exploration of new enzymes responsible for the degradation of plant biomass. This study aimed to access the overview of taxonomic and functional profile of the metagenome of soil under sugarcane cultivation containing straw on it, having focused on enzymes involved in the hydrolysis of lignocellulosic materials. The soil metagenome under sugarcane cultivation showed a variety of enzyme families involved in the degradation of the lignocellulosic complex. The presence of 27 Glycoside Hydrolases (GH) families, 21 Carbohydrate-Binding Module (CBM) families, 11 Carbohydrate Esterases (CE) families and 4 Auxiliary Activities (AA) families has been verified. Proteobacteria and Actinobacteria were the abundest phyla in this environment, which the last has recognized industrial importance given their enzymes with resistance to changes in pH and temperature. Such microbial community showed great potential as a source of promising enzymes for research regarding the construction of enzyme cocktails facing degradation of lignocellulosic material to reach the optimized cellulosic ethanol production.

Keywords: glycosyl hydrolases, cellulases, hemicellulases, metagenomic, 2G ethanol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Percentual de área total de cana-de-açúcar por região.....p. 21
- Figura 2.** Os principais componentes e estrutura da lignocelulose das células vegetais.....p.24
- Figura 3.** Representação esquemática dos grupos enzimáticos envolvidos na hidrólise (celulossoma) das frações celulose (A) e hemicelulose (B) do complexo lignocelulósico.....p.29
- Figura 4.** Mecanismo de ação das enzimas que atuam na degradação da celulose.....p. 31
- Figura 5.** Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da hemicelulose.....p.32
- Figura 6.** Eletroforese do DNA metagenômico da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar contendo o padrão de fragmentos com cerca de 300 kb (~80 segundos) originados para a construção da biblioteca para o sequenciamento.....p. 44
- Figura 7.** Validação da qualidade da montagem da biblioteca para o sequenciamento. Fragmentos com cerca de 300 pb (80 segundos) após a quebra mecânica do DNA metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....p. 45
- Figura 8.** Perfil de qualidade *phred* das sequências R1 analisado antes o processamento das mesmas.....p. 46
- Figura 9.** Perfil de qualidade *phred* das sequências R1 analisado após o processamento das mesmasp. 46
- Figura 10.** Perfil de qualidade *phred* das sequências R2 analisado antes o processamento das mesmasp. 47

- Figura 11.** Perfil de qualidade *phred* das sequências R2 obtido após o processamento das mesmasp. 47
- Figura 12.** Perfis taxonômicos a nível de Filos das amostras dos metagenomas SA e FT, processados no servidor MG-RAST. Abundâncias com diferenças significativas ($P < 0.05$) calculadas no programa STAMP v. 2.1.3.....p. 49
- Figura 13.** Perfil funcional no nível 1 dos metagenomas SA e FT, originado a partir do servidor MG-RAST e estatisticamente analisado pelo programa STAMP v. 2.1.3. *($P < 0.05$)p. 50
- Figura 14.** Distribuição taxonômica a nível de filo do metagenoma da comunidade microbiana em relação ao domínio *Bacteria* presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcarp. 52
- Figura 15.** Atribuição taxonômica a nível de filo das sequências montadas que apresentaram as famílias de GHs.....p. 57
- Figura 16.** Via da degradação lignocelulósica e da pectina e suas enzimas relacionadas encontradas no metagenoma de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....p. 58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição de algumas plantas com potencial prospectivo para bioenergia.....p. 18
- Tabela 2.** Comparação dos dados pré e pós processamento das reads agrupadas em R1 e R2.....p. 45
- Tabela 3.** Resultado da montagem dos dados sequenciados através do *software* IDBA-UD v.1.1.2 (PENG et al., 2012).....p. 51
- Tabela 4.** Distribuição taxonômica dos domínios do metagenoma da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA).....p. 52
- Tabela 5.** Composição de Filos que apresentaram frequência menor que 1% listados em ordem decrescente de abundânciap. 53
- Tabela 6.** Famílias de GHs e suas respectivas funções encontradas no metagenoma da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....p. 55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aproveitamento de recursos da indústria sucroalcooleira com vistas na produção de energia

Atualmente a crescente demanda por energias renováveis de baixo custo e de baixa emissão de poluentes em escala mundial tem sido atendida apenas pelo etanol obtido através da cana-de-açúcar, em que tal combustível emite cerca de 60% menos poluentes frente à queima da gasolina, além do fato de que a produção de CO₂ é ainda absorvida pela própria cana-de-açúcar (CANILHA et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Desta forma, a utilização de etanol de cana-de-açúcar, além de tratar-se de uma via alternativa na substituição dos combustíveis fósseis de forma viável e de diminuir a dependência externa de energia, propicia notáveis benefícios ambientais quando comparada às outras opções de combustíveis (CANILHA et al., 2010).

O Brasil é um país de importante papel no cenário agrícola mundial atuando como um dos principais fornecedores de alimento e matéria-prima para mundo. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nas projeções para o Agronegócio de 2014/2015 a 2024/2025, prevê o constante crescimento deste setor pautado na sustentabilidade ambiental, aumento de produtividade da terra de modo a preservar o meio ambiente, entre outros meios a serem adotados, a fim de proporcionar maior qualidade de vida à sociedade brasileira (MAPA, 2015).

Sendo cultivada em todos os estados do país a cana-de-açúcar consiste em uma das principais culturas nos solos brasileiros, sendo o Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar mundial (CONAB, 2016). Da produção de açúcar e etanol resulta uma grande quantidade de biomassa, a qual é a soma do bagaço de cana-de-açúcar após moída e a palhada resultante da colheita mecanizada. Este montante de biomassa tem sido encaminhado a duas vias nas usinas: à cogeração de energia, a bioeletricidade e ao plantio direto, trazendo benefícios ao solo (CARVALHO et al., 2012).

Uma vez que esta biomassa se trata de uma rica fonte de açúcar, nos últimos anos o meio acadêmico tem investido esforços no aproveitamento mais nobre e racional dessa biomassa a partir de sua conversão em açúcares fermentescíveis às

leveduras com a finalidade de gerar maior quantidade de etanol com o benefício de não possuir necessidade de aumento de área de cultivo, processo denominado etanol de segunda geração (ZHENG et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Partindo-se dos resíduos agrícolas, fontes renováveis, o etanol de segunda geração se apresenta como uma importante alternativa frente aos combustíveis fósseis. Em função da grande quantidade de biomassa vegetal disponível e de sua composição rica em polissacarídeos, o bagaço de cana-de-açúcar se traduz em um substrato favorável às biorrefinarias (CHANDEL et al., 2012), as quais têm como um dos principais objetivos, a separação das frações celulose, hemicelulose e lignina (ISIKGOR e BECER, 2015).

A palhada da cana-de-açúcar se destaca como fonte energética frente aos outros resíduos lignocelulósicos, uma vez que suas características a tornam propícias a sua utilização na geração de calor, eletricidade e na geração de etanol celulósico. Esta palhada tende a possuir um importante papel como matéria-prima na geração de etanol combustível (Tabela 1) (CARROL e SOMERVILLE, 2009; SANTOS et al., 2012).

Tabela 1. Composição de algumas plantas com potencial prospectivo para bioenergia (CARROL & SOMERVILLE, 2009).

Fonte	Celulose	Lignina	Xilana	Manana	Galactana	Arabinana	Ácido Urônico
Cana-de-açúcar (bagaço)	39,01	23,09	22,05	0,35	0,46	2,06	2,16
Milho (palhada)	37,69	18,59	21,61	0,38	0,87	2,42	2,99
Trigo (palhada)	32,64	16,85	19,22	0,31	0,75	2,35	2,24
Pinheiro (Monterey)	41,70	25,90	5,90	10,70	2,40	1,60	2,50
Eucalipto	48,07	26,91	10,42	1,23	0,74	0,30	4,07

Como traz Ripoli (2000), uma tonelada de palhada é equivalente a cerca de 1,2 a 2,8 barris de petróleo, logo o não aproveitamento deste material é um desperdício energético. Levando em conta a complexidade estrutural da matriz lignocelulósica, para garantir a competitividade e sustentabilidade da produção de bioetanol, se torna imprescindível o pré-tratamento da mesma a fim de acelerar a desconstrução deste arranjo antes que o mesmo siga às próximas etapas: hidrólise enzimática, fermentação e destilação (DAVIS et al., 2015; JIA et al., 2015).

O interesse nesta área de pesquisa é dado em função das dificuldades encontradas nas etapas de tratamento prévio da biomassa lignocelulósica visando o alcance dos monômeros passíveis de fermentação. Tal processo, de maneira geral, é considerado economicamente dispendioso. É necessário, pois, o surgimento de processos economicamente viáveis para que haja o aproveitamento otimizado desta biomassa (SIQUEIRA et al., 2010).

Ainda como grande barreira para a produção industrial se encontra a ineficiência enzimática no processo de sacarificação celulósica da parede celular vegetal (MAICHE e HUBER, 2010) atrelada aos custos ainda elevados demandados pela utilização destas enzimas. A prospecção de novas enzimas especializadas na degradação da biomassa vegetal se apresenta como uma promissora alternativa para a superação deste desafio (HESS et al., 2011), haja vista que a mesma apresenta elevada capacidade de integração nas instalações industriais existentes (MUSSATTO et al., 2010). Uma vez que o solo se trata do ambiente mais biodiverso do planeta e uma fonte de inúmeros recursos biomoleculares (NIELSEN, WALL e SIX, 2015), a prospecção por estas enzimas neste ambiente tem sido reportada (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2016).

Sendo assim, através do acesso ao DNA metagenômico da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar e seu subsequente sequenciamento conduzido na plataforma Illumina® (NGS – *Next Generation Sequencing*), o presente trabalho se propôs a levantar o potencial metabólico desta comunidade por meio da busca por enzimas associadas à degradação da biomassa lignocelulósica, bem como relacionar quais os grupos de micro-organismos estão relacionados a este processo de desramificação da biomassa vegetal.

Inicialmente, através do MG-RAST (*Rapid Annotation using Subsystems Technology for Metagenomes*) (MEYER et al., 2008) realizou-se um levantamento prévio da composição taxonômica e funcional do metagenoma da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, levantamento este que foi realizado juntamente com dados metagenômicos de floresta atlântica a título de comparação.

Posteriormente, os dados metagenômicos do ambiente de cana-de-açúcar foram trabalhados de modo a permitir a montagem genômica a partir das *reads* resultantes do sequenciamento, a qual foi então analisada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa como fonte de energia renovável

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo responsável por 50% da produção do açúcar mundial e o maior produtor de etanol proveniente de cana-de-açúcar (CONAB, 2015), sendo referência na produção de agroenergia (MAPA, 2016). A cana-de-açúcar é uma importante cultura para o país. O etanol e o biodiesel atraem atenção mundial, uma vez que de forma menos poluente e mais barata, se apresentam como vias alternativas aos combustíveis fósseis de forma ecológica e econômica viáveis (MAPA, 2016).

A área destinada ao plantio de cana-de-açúcar na safra de 2015/2016 foi de 8.995,5 mil hectares com produtividade estimada de 73.228 (kg ha⁻¹) e produção de 658,7 milhões de toneladas (CONAB, 2015), a primeira estimativa para a safra de 2016/2017 é de 690,98 milhões de toneladas. O crescimento está estimado em 3,8% em relação à safra anterior, e a área cultivada foi de 9.073,7 mil hectares, aumento de 4,8%, se comparada com a safra 2015/16. (CONAB, 2016).

A cultura cultivada abrange todo o país, todavia a maior parte da produção nacional é encontrada na região sudeste (Figura 1), sendo apenas o estado de São Paulo responsável por mais da metade da produção (CONAB, 2016).

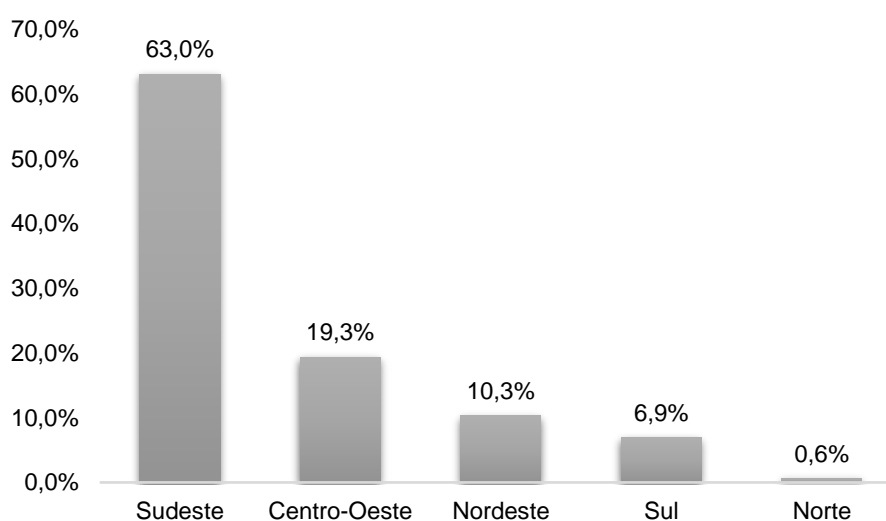


Figura 1. Percentual de área total de cana-de-açúcar por região (CONAB, 2016).
Nota: estimativa abril de 2016.

Dos processos industriais, desde a colheita até a produção do açúcar e álcool, uma grande quantidade de biomassa é gerada. Esta biomassa é nome geral dado ao conjunto de palhada e do bagaço da cana-de-açúcar. A palhada é composta por três frações: folhas verdes, folhas secas e topos, as quais são geradas durante o processo de colheita mecanizada – atualmente o padrão de colheita empregado no Brasil (CANILHA et al., 2012). Já o bagaço da cana-de-açúcar é obtido após do processo de moagem da mesma, sendo que para cada tonelada moída gera em média 270 a 280 Kg de bagaço (RODRIGUES et al., 2003).

Nos últimos anos, parte desta palhada remanescente gerada durante a colheita tem sido utilizada em um manejo agrícola denominado plantio direto. Este manejo consiste na permanência desta palhada sobre o solo de cultivo ao invés de sua retirada, como era feito no manejo convencional. A aplicação do plantio direto tem propiciado inúmeros benefícios ao meio ambiente e à produção (DUARTE JR e COELHO, 2008; CARVALHO et al., 2012). Entretanto, é estimado que cerca de 65% da palhada deixada sobre o solo pode ser retirada sem danos ao solo (FRANCO et al., 2011). Para além desta aplicação, outra parte desta palhada remanescente é ainda destinada à cogeração de energia através da combustão da palhada com a finalidade de gerar bioeletricidade (BNDES, 2008).

Energeticamente estima-se que a palhada e o bagaço de cana-de-açúcar representam 2/3 da energia total da cultura (PIPPPO et al., 2011). Dada a rica composição energética encontrada na biomassa lignocelulósica, se esta quantidade de material fosse levada à produção de etanol de segunda geração, haveria um grande aumento da produção de energia sem a necessidade de aumentar a área de plantio (PEREIRA et al., 2015). Em suma, o processo de geração do etanol 2G incluem as etapas de (i) pré-tratamento, para iniciar a desramificação do complexo lignocelulósico iniciando a remoção da lignina e exposição da fração celulósica; (ii) hidrólise dos polímeros a fim de gerar monômeros fermentescíveis às leveduras; (iii) fermentação dos monômeros gerados, pentoses e hexoses, para a geração de etanol e, por fim, (iv) a destilação (CANILHA et al. 2012). O etanol de segunda geração, tem sido considerado uma das mais promissoras alternativas à substituição dos combustíveis fósseis (MACRELLI et al., 2012). Entretanto, a técnica para esta produção ainda não está otimizada de modo que seja economicamente viável. Um

dos principais gargalos ainda são os custos com as enzimas. Os custos da produção de enzimas chegaram a reduzir na última década, entretanto ainda somam aproximadamente 15% do custo da produção de etanol de segunda geração (HUMBIRD et al., 2011; DA SILVA DELABONA et al., 2013), demonstrando assim a necessidade de pesquisas neste sentido.

2.2 Composição da biomassa lignocelulósica e energia renovável

A matéria vegetal lignocelulósica é o mais abundante material presente na Terra, seus principais constituintes da biomassa lignocelulósica são os polímeros de: lignina, hemicelulose, celulose e pectina (Figura 2), em combinação com enzimas associadas à parede celular vegetal, proteínas estruturais e proteoglicanos, formam uma rede que fornece resistência e durabilidade para a parede celular vegetal (POPPER et al., 2011). A lignina, hemicelulose e celulose, são os três maiores constituintes da parede celulares dos vegetais, unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos, e juntos compõem cerca de 97 a 99% da massa seca deste material (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010), sendo que a hemicelulose compõe cerca de 50% de todo material lignocelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (DE SOUZA et al., 2013).

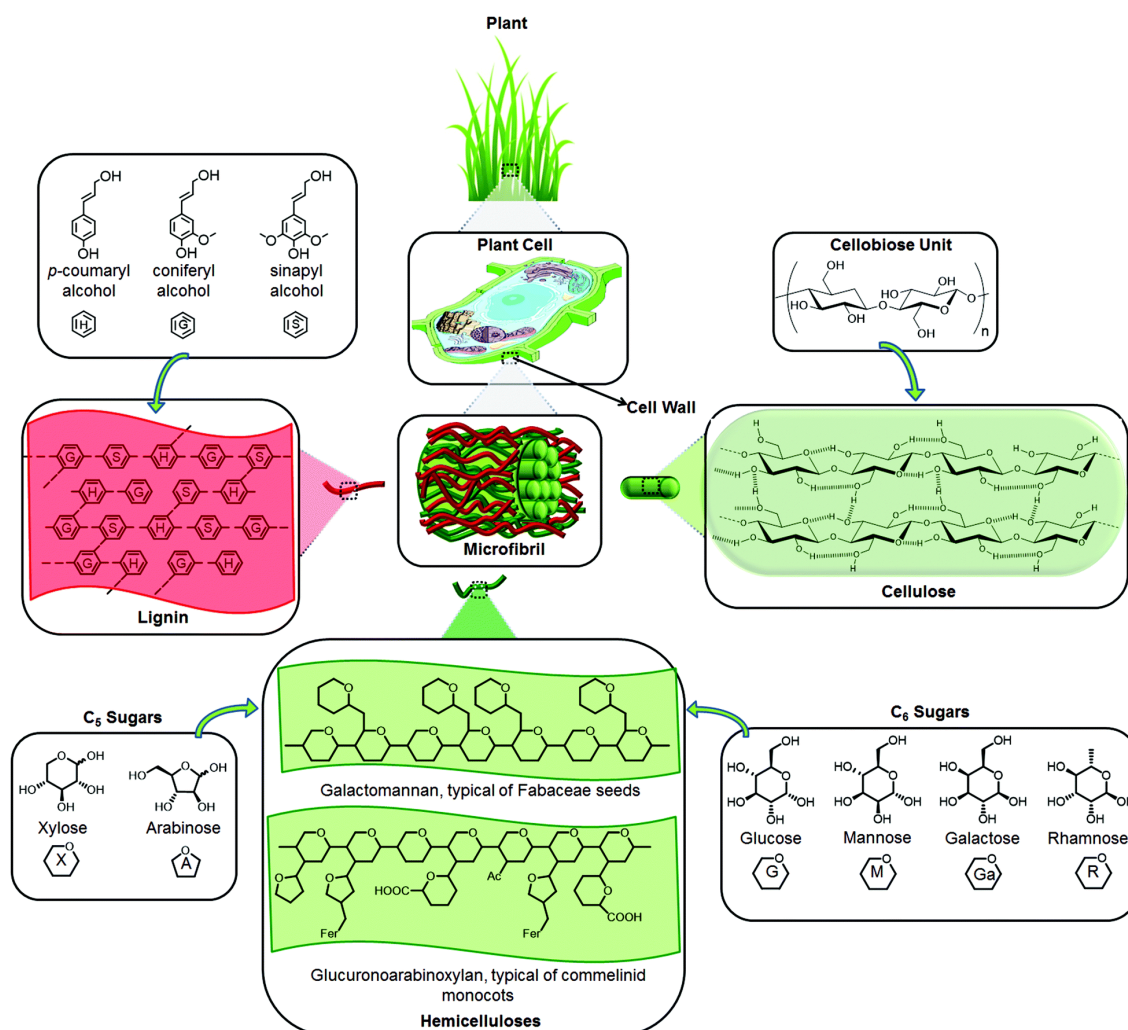


Figura 2. Os principais componentes e estrutura da lignocelulose das células vegetais (SIKGOR e BECER, 2015).

2.2.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante no mundo. A estrutura organizacional da celulose pode ser dividida em três partes; (i) a primeira, se traduz na sequência linear dos resíduos β-D-glicopiranosídicos os quais estão unidos por ligações covalentes β-D (1-4) glicosídicas, tendo como fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$; (ii) a segunda, está relacionada à conformação espacial dos resíduos de glicose, às distâncias entre as ligações e seus ângulos, além das ligações de hidrogênio intramoleculares; (iii) a terceira, diz respeito à associação das moléculas que formam agregados com estruturas cristalinas. Estas moléculas dispostas em cadeias espirais e unidas através de ligações de hidrogênio, associadas a estruturas cristalinas

conferem resistência e flexibilidade ao polímero, originando as fibras celulósicas (SANTOS et al., 2012).

As regiões de celulose cristalina, região mais compacta devido às ligações de hidrogênio e de difícil degradação enzimática, são separadas por regiões de menor organização, denominadas amorfas. As regiões de celulose amorfa apresentam baixa resistência aos ataques químicos e biológicos, sendo, portanto, pontos de degradação (FAN et al., 1980).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose encontra-se interligando as frações de celulose e lignina, abrangendo cerca de 30% a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, e tem como função ligar as microfibrilas de celulose (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993), apresenta uma estrutura mais diversificada que a celulose (KARNAOURI et al., 2014). Seus componentes são uma variedade de heteropolissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas e geralmente são classificados de acordo com o principal açúcar presente na sua composição (GLASS et al., 2013). Entre os açúcares constituintes estão as pentoses (xilose, ramnose, arabinose), as hexoses (manose, glicose, galactose) e os açúcares ácidos (ácidos urônicos e manurônico), além de radicais acetila. As hemiceluloses são classificadas basicamente de acordo com os açúcares que estão presentes nas suas cadeias principais: xilana, manana e galactana (CANILHA et al., 2012). Esta composição confere à hemicelulose flexibilidade, entretanto a torna altamente resistente a espécies químicas (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010; OGEDA e PETRI, 2010). Esses açúcares estão ligados entre si, por ligações glicosídicas β -(1,4) e β -(1,3). Essas ligações entre os monômeros da hemicelulose são facilmente hidrolisáveis (PÉREZ et al., 2002).

A xilana é o carboidrato da hemicelulose mais abundantes e se constitui de heteropolissacarídeos (BEG et al., 2001). Estruturalmente as xilanas são compostas de uma cadeia principal de xiloses unidas por ligações β -(1,4). Partindo desta cadeia principal, ocorrem ramificações regulares com xilose ligada por ligações α -(1,6), entre outras ramificações com outros açúcares como L-arabinoses, O-acetil-L-arabinoses e ácido D-glucurônico, além das ramificações contendo grupos acetila e ácidos ferúlico e cumárico. Algumas destas xiloses ainda podem apresentar ramificações por

galactose ligadas por ligações α -(1,2). Em parede celular primária, mas não em parede celular de reserva, as ramificações por galactose ainda podem ser ramificadas por fucose ligadas por ligações α -(1,2) (ENCARNAÇÃO, 2012 e OCHOA-VILLARREAL et al.; 2012).

Baseado em sua estrutura e composição, o grupo dos mananas pode ser subdividido em três grupos: mananas puras, glicomananas e galactomananas. (BUCKERIDGE et al., 2000). As mananas puras são definidas como contendo mais de 90% de manose formando uma cadeia linear do tipo β -(1,4) sem ramificações, podendo ou não estar ramificada com galactose. Assim, as mananas são estruturalmente relacionadas aos galactomananos, apenas apresentando um grau menor de ramificação com galactose. As mananas, portanto, apresentam alto grau de interatividade intermolecular, formando cristais na parede celular, o que confere dureza e diminui a sua solubilidade (BUCKERIDGE et al., 2000).

As glicomananas são as menos conhecidas, sua estrutura apresenta uma cadeia principal formada por um número proporcionalmente equivalente de resíduos de β -glicopiranosídeo e β -manopiranosídeo unidos por ligações β -(1,4). Com certa frequência pode-se detectar a presença de unidades de galactopiranosídeo unidos por ligações α -(1,6) à cadeia principal (ENCARNAÇÃO, 2012; BUCKERIDGE et al., 2000).

As galactomananas são polissacarídeos compostos de uma cadeia linear de resíduos de D-manose unidas por ligações β -(1,4), à qual resíduos de D-galactose estão unidos por ligações α -(1,6), formando ramificações simples (BUCKERIDGE et al., 2000). A razão manose:galactose e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia variam de espécie para espécie, com a razão ocorrendo entre 1:1 e 4:1 (ENCARNAÇÃO, 2012; BUCKERIDGE et al., 2000).

As galactanas são definidas como polissacarídeos que possuem a cadeia principal de galactose unidas por ligações β -(1,3), (1,6) com algumas ligações β -(1,4), ou polissacarídeos de galactose com ligações β -(1,4) com ramificações de L-arabinofuranose a cada 16 a 21 resíduos da cadeia principal. A galactana é uma molécula de múltiplas funções, exercendo tanto a função de reserva de parede celular em sementes, como também, sendo um importante elemento na modulação da expansão cotiledonar durante o desenvolvimento da plântula (ENCARNAÇÃO, 2012).

2.2.3 Lignina

A lignina é o segundo componente mais abundante da parede celular de plantas vasculares (RUIZ-DUEÑAS e MARTÍNEZ, 2009), pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% dependendo da espécie de planta. Depois da celulose, a lignina é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas. É um heteropolímero amorfo que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. Em função disso, a lignina é de difícil acesso pelas enzimas “lignases” e por isso de difícil degradação, atuando como uma barreira física para as enzimas e, conseqüentemente, influencia na quantidade de enzima requerida para o processo de hidrólise, assim como dificulta a recuperação da enzima após a hidrólise (LEVASSEUR et al., 2013; SANTOS et al., 2012).

O teor de lignina e a sua distribuição são os fatores responsáveis pela recalcitrância de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática, o que limita a acessibilidade da enzima e, portanto, o processo de deslignificação pode melhorar as taxas de conversão de hidrólise enzimática (CANILHA et al., 2012). Apesar da degradação da lignina ser um processo difícil para os micro-organismos, diferentes estratégias enzimáticas microbianas já foram comprovadas para modificar e/ou degradar a matriz de lignina (LEVASSEUR et al., 2013).

2.2.4 Pectina

Trata-se do mais complexo polissacarídeo estrutural e funcional da parede celular vegetal, sendo encontrada na parede vegetal de plantas superiores. É constituída por monômeros de ácido D-galacturônico α -(1,4) ligados entre si dando origem a uma cadeia principal. O ácido galacturônico é seu principal componente, representando mais que 65% do total de compostos (CANTERI et al., 2012). Possui quatro classes estruturais que se destacam: homogalacturonana, ramnogalacturonana I, xilogalacturonana e ramnogalacturonana II (GLASS et al.,

2013). Com relação à complexidade funcional, os polissacarídeos nela encontrada estão associados à porosidade da parede vegetal, ao controle da carga iônica da parede celular vegetal, na adesão de células adjacentes e na defesa e crescimento das plantas vasculares.

Desta forma, em função desta diversidade de moléculas e complexidade de arranjos encontrados em meio às frações que compõem a estrutura lignocelulósica, uma grande diversidade de enzimas são necessárias à sua degradação (CLASSEN et al., 1999; SHALLOM e SHOHAM, 2003).

2.3 Características das enzimas lignocelulolíticas

As Glicosil Hidrolases (GHs) abrangem as enzimas celulasas e hemicelulasas, as principais enzimas atuantes na degradação do complexo lignocelulósico (Figura 3).

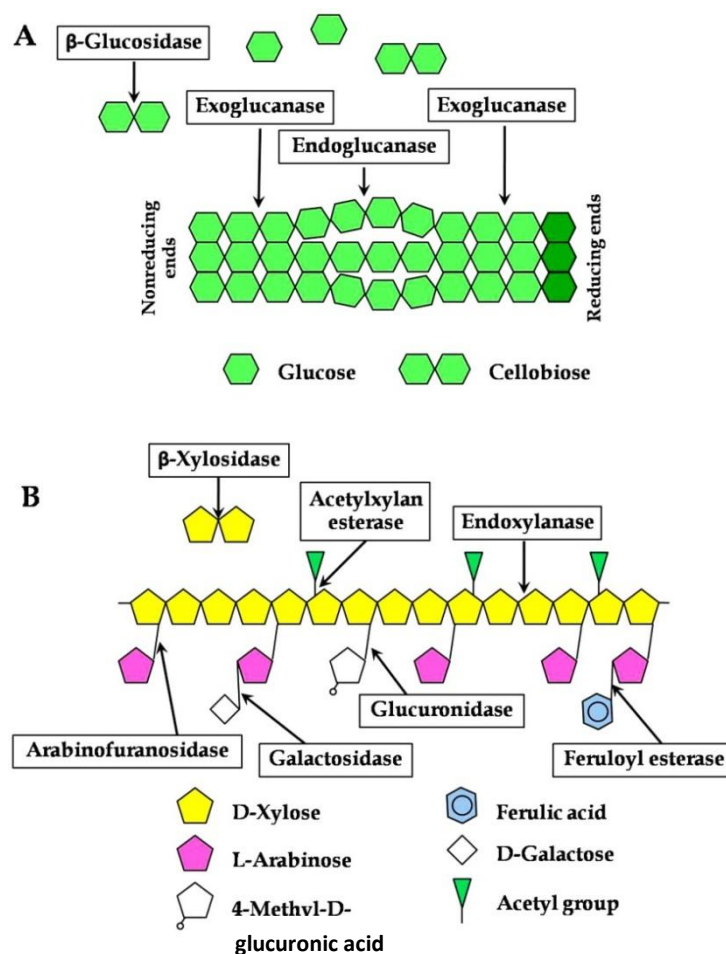


Figura 3. Representação esquemática dos grupos enzimáticos envolvidos na hidrólise (celulossoma) das frações celulose (A) e hemicelulose (B) do complexo lignocelulósico (ARO et al., 2005).

2.3.1 Celulases

Frente à diversidade de moléculas que compõem o complexo celulósico e suas diferentes conformações, os micro-organismos possuem, por sua vez, vasta quantidade de enzimas que contribuem na degradação deste material, em especial as celulases, que constituem o complexo celulolítico (WARREN, 1996; JORDAN ET AL., 1992). Para hidrolisarem e metabolizarem a celulose insolúvel é necessária aos micro-organismos a produção de celulases extracelulares. Estas enzimas são proteínas de massa molecular entre 20 e 240 kDa, capazes de romper ligações glicosídicas do tipo β-1,4 de microfibrilas da celulose, liberando moléculas de celobiose e glicose (KUBICEK et al., 2013).

As enzimas pertencentes ao complexo celulolítico foram inicialmente classificadas por conta da ação catalítica de cada uma, posteriormente em função de suas propriedades estruturais (HENRISSAT et al., 1998).

As enzimas relacionadas à hidrólise de ligações glicosídicas, o que incluem as celulasas, estão em um grupo denominado Glicosil Hidrolases (GHs). De acordo com a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) tal nomenclatura é baseada na especificidade da enzima pelo substrato e ocasionalmente no mecanismo molecular da mesma.

A classificação das enzimas GHs em famílias a partir das similaridades entre as sequências de aminoácidos e, conseqüentemente, da similaridade estrutural, vem sendo proposta há alguns anos. Esta classificação, por sua vez, reflete as características estruturais destas enzimas de melhor forma do que apenas pela especificidade de substrato, bem como auxilia na elucidação das relações evolutivas entre as enzimas (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT e BAIROCH, 1993). Este modelo é utilizado pelo banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes Database*) e tal modelo subdivide as GHs em 135 diferentes famílias, das quais algumas serão tratadas neste trabalho (LOMBARD et al., 2014).

As celulasas são divididas em três grandes grupos de acordo com sua forma de atuação no substrato (Figura 4): (i) endoglucanases (EnG) ou 1-4- β -D-glicano-4-glicanohidrolase, classificadas com o E.C. 3.2.1.4, atuam na região interna da fibra celulósica; (ii) exoglucanases (ExG), incluindo 1,4- β -D-glicano glicanohidrolases (conhecidas como celodextrinases), E.C. 3.2.1.74 e 1,4- β -D-glucano celobiohidrolases (as celobiohidrolases), E.C. 3.2.1.91, atuam nas extremidades da fibra; e (iii) β -glicosidases ou β -D-glucoside gluco-hidrolases (BG), classificadas com o EC 3.2.1.21, hidrolisam os oligossacarídeos solúveis em glicose (Figura 4) (LYND et al., 2002; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

As β -glicosidases além disso auxiliam na atividade das CBHs, uma vez que atuam nas celobioses (inibidoras da atividade das CBHs) (OLSEN et al., 2011).

As endoglucanases são responsáveis por dar início à hidrólise enzimática da celulose. Atuam clivando aleatoriamente a cadeia polissacarídica, dando origem a oligossacarídeos de diferentes tamanhos. Em consequência destas clivagens, terminações redutoras e não-redutoras são geradas. Em função desta fragmentação

da fibra celulósica em vários oligossacarídeos, elas são consideradas as responsáveis pela rápida diminuição do grau de polimerização da celulose, isto é, pela solubilização da fibra (LYND et al., 2002; CARDONA et al., 2010).

As exoglucanases agem sobre os terminais redutores e não-redutores resultantes da atividade das endoglucanases. Tais enzimas, também chamadas de celodextrinases, liberam resíduos de glicose diretamente do polímero, enquanto que as celobiohidrolases (CBH) são responsáveis pela amorfogênese das fibras celulósica uma vez que desestratificam as mesmas. Desta forma, as CBHs promovem o aumento na hidrólise das fibras por torná-las mais expostas às demais celulases do complexo celulolítico (OHMIYA et al., 1982; LYND et al., 2002). Elas ainda podem ser divididas em dois subgrupos, CBH I e CBH II, caracterizadas por hidrolisarem terminais Redutores e Não-redutores, respectivamente (LYND et al., 2002).

As β -glicosidases, por fim, agem sobre as celobioses e celodextrinas solúveis gerando, como produto da hidrólise, monômeros de D-glicose (WITHERS, 2001).

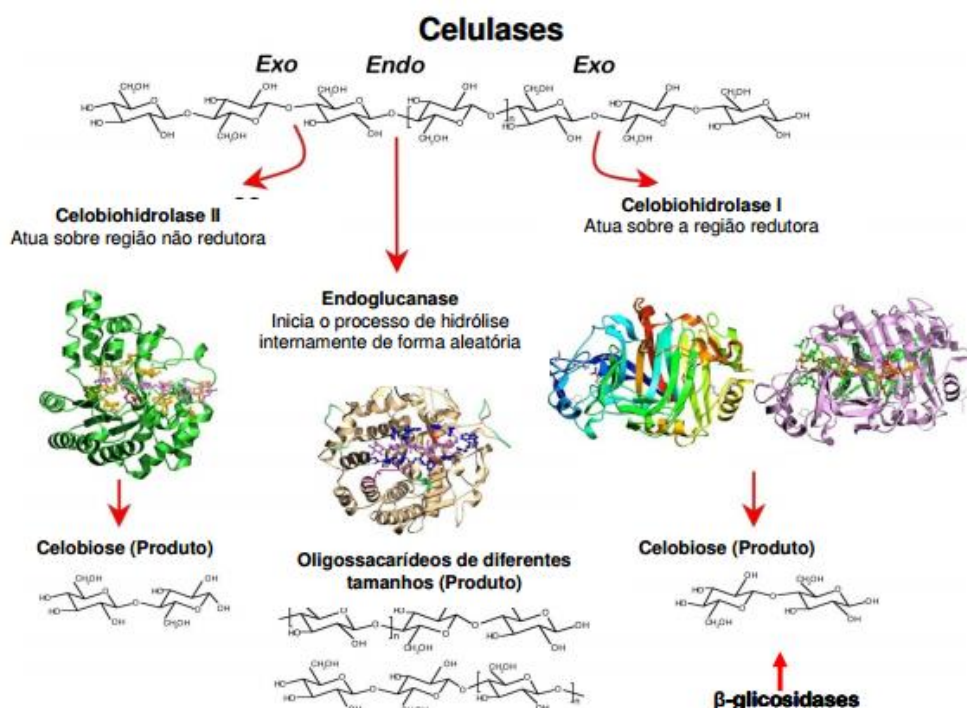


Figura 4. Mecanismo de ação das enzimas que atuam na degradação da celulose (SANTANA, 2010).

2.3.2 Hemicelulases

Devido à complexidade de polissacarídeos presentes na estrutura da hemicelulose a sua hidrólise completa precinde a ação enzimática conjunta de enzimas específicas, como as xilanases, responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β -(1,4) presentes na xilana (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993) (Figura 5). A hidrólise completa da hemicelulose requer no mínimo nove enzimas diferentes de GHs e quatro de CEs. Tais enzimas atuarão nas diversas ramificações encontradas ao longo da composição da hemicelulose, as quais geralmente são L-arabinose, D-xilose, L-fucose, D-galactose, ácido D-glucurônico, resíduos acetil e os ácidos p -cumárico e ferúlico (GOUVÊA, 2013).

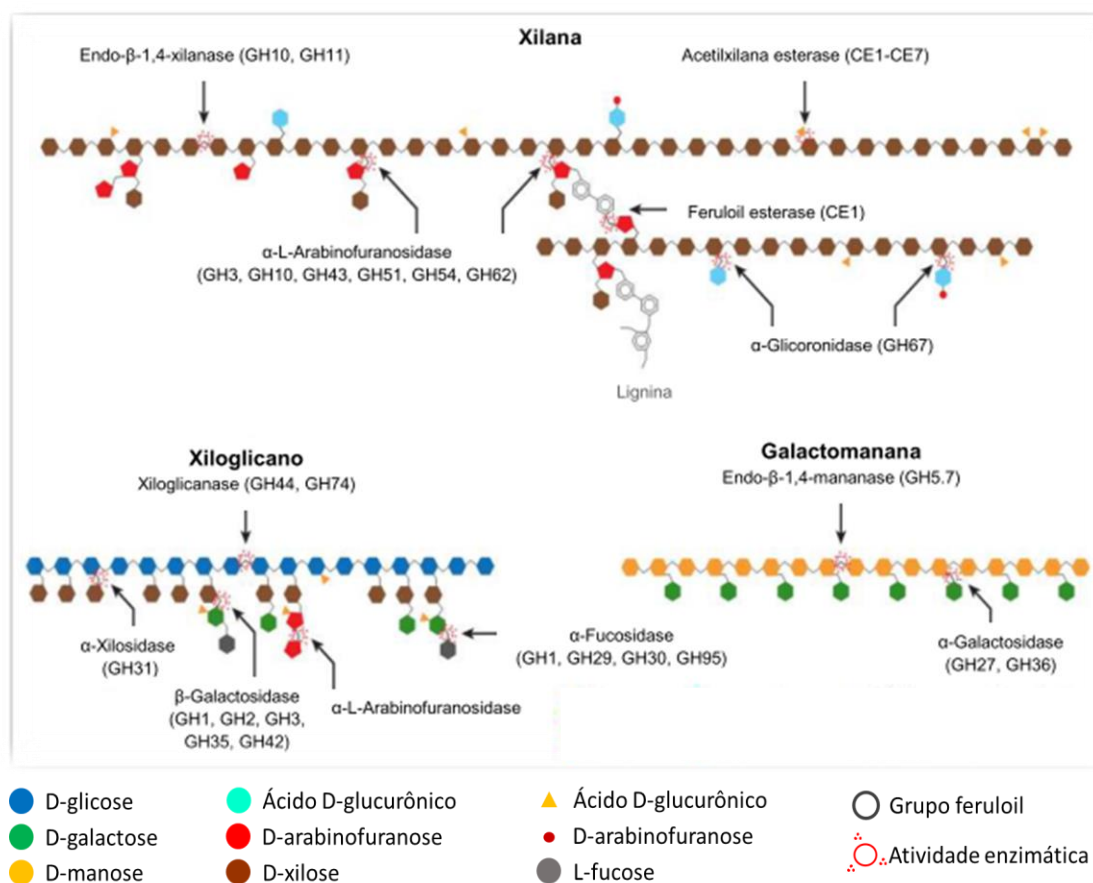


Figura 5. Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da hemicelulose (SCHNEIDER, 2014).

As enzimas endo-xilanases são as principais enzimas na hidrólise da hemicelulose. Iniciam a hidrólise atuando diretamente nas cadeias principais de xilana. Ao promoverem aleatoriamente a hidrólise das ligações β 1-4 entre os resíduos

de D-xilose (E.C. 3.2.1.8), levam à liberação de xilo-oligossacarídeos, os quais serão sequentemente hidrolisados pelas demais hemicelulases (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993).

As hemicelulases, juntamente com enzimas auxiliares, aumentam o rendimento de geração de monossacarídeos no processo de hidrólise enzimática do complexo lignocelulósico (GAO et al., 2011).

2.3.3 Módulo de ligação a carboidratos (CBM)

As enzimas podem se ligar ao substrato por meio de seu sítio catalítico ou então através de algum módulo de ligação não catalítico (VAN DYK et al., 2012). Dada a dificuldade de acesso a substratos insolúveis como a celulose, muitas enzimas são modulares, isto é, possuem módulo de ligação ao carboidrato, denominados CBM (*Carbohydrate Binding Module*) (LOMBARD et al., 2014). São domínios não catalíticos relacionados ao metabolismo de carboidrato que podem ser encontrados nas porções N- ou C-terminais das proteínas, havendo a possibilidade de ser encontrado mais que um CBM em determinada proteína ou, por outro lado, serem estes módulos encontrados ocasionalmente sozinhos (BARRAL et al., 2005). Geralmente estes módulos sofrem o processo de dobramento de modo autônomo (BORASTON et al., 2004) e estão ligados por uma estrutura flexível ao sítio catalítico (VÁRNAI et al., 2013). Estão relacionados principalmente à especificidade de reconhecimento e subsequente ligação a carboidratos e suas estruturas complexas. Através deles é possível a hidrólise de carboidratos insolúveis como a celulose, xilana, arabinofuranosidase, manana, fucose, galactose, entre outros (GUILLÉN, SÁNCHEZ e RODRÍGUEZ-SANOJA, 2010). Uma vez que levam à aproximação entre o sítio catalítico enzimático e o substrato, mantém esta ligação por maior período e a ligação destes aos substratos resultam em maior rendimento enzimático obtendo, por exemplo, rendimento triplicado de hidrólise em substratos insolúveis como os celulósicos (REYES-ORTIZ et al., 2013). Além de colaborarem na ação de hidrolases, é reportado que as CBMs possuem a capacidade de auxiliar na desramificação do complexo lignocelulósico independentemente de ação hidrolítica de alguma enzima, entretanto é apontado que não são todas que possuem tal capacidade (BORASTON et al., 2004).

Por outro lado, tendo em vista a viabilidade, a reutilização de enzimas é algo a ser desenvolvido na produção de etanol de segunda geração. Porém, um dos entraves é que ao término das reações enzimáticas, algumas enzimas permanecem ligadas ao substrato. Estudos demonstraram que a utilização de celulases não acompanhadas por CBM possuíram um rendimento inferior em apenas 10% em relação àquelas acompanhadas, entretanto ao final do processo a recuperação das enzimas para a reutilização foi maior, demonstrando a necessidade de outras pesquisas (PAKARINEN et al., 2014).

2.3.4 Atividades Auxiliares (AA) e Carbohidrato Esterase (CE)

As enzimas AA trata-se de uma nova classe do CAZy que foi originada a partir do grupo de LPMO (*lytic polysaccharide monooxygenase*), enzimas que participam na solubilização do material lignocelulósio através de reações de oxirredução e monooxigenases dependentes de cobre (QUINLAN et al., 2011). Tais enzimas somadas à antiga família GH 61, deram origem a esta nova classe chamada AA (LOMBARD et al., 2014). Estas enzimas realizam uma atividade oxidativa fundamental participando de maneira significativa na desconstrução de materiais recalcitrantes atuando nos compostos aromáticos (LEVASSEUR et al., 2013).

As enzimas CE colaboram na degradação do material lignocelulósico e estão divididas em 16 famílias de acordo com o banco de dados CAZy (LOMBARD et al., 2014). Atuando na O-desacetilação e N-desacetilação dos sacarídeos, isto é, atuam em moléculas éster ou amidas, nas quais o determinado sacarídeo estará na porção que seria de álcool e amina, respectivamente (BIELY, 2012).

2.3.5 Micro-organismos como fonte de enzimas

Os micro-organismos possuem um papel de fundamental importância nos ecossistemas, atuando na ciclagem de nutrientes, disponibilização de minerais, fixação de nitrogênio, desnitrificantes e como promotores de crescimento vegetal, configurando-os como peças-chave nos processos biogeoquímicos (LIMA et al., 2009; DE SOUZA et al., 2012). São desta forma importantes ferramentas na biotecnologia atuando como fonte de enzimas, antibióticos, biorremediadores, entre outros recursos que buscam a melhoria das condições de vida humana de forma sustentável

(PEREIRA et al., 2012). Frente à diversidade de moléculas que compõem o complexo lignocelulósico, os micro-organismos apresentam vasta quantidade de enzimas que contribuem na degradação deste material, em especial as celulases, que constituem o complexo celulolítico (WARREN, 1996). Para hidrolisarem e metabolizarem a celulose insolúvel é necessária aos micro-organismos à produção de celulases extracelulares.

Na natureza, as enzimas podem ser encontradas em toda a parte, desde o trato digestivo até superfícies em contato com matéria orgânica. A identificação e isolamento de enzimas em amostras de biomas nacionais são importantes para baratear os processos biotecnológicos e descobrir atividades bioquímicas diferentes e mais apropriadas à aplicação industrial brasileira.

2.4 Metagenômica

O emprego da metagenômica na exploração de amostras ambientais tem sido considerado uma das formas mais acuradas para desvendar um nicho ecológico (VON MERING et al., 2007; CHISTOSERDOVA, 2010). O solo é a maior fonte microbiana de todo o planeta, sendo essa biodiversidade ainda desconhecida, representando, pois, um grande recurso inexplorado para obtenção de produtos naturais com potencial para aplicação na agricultura e outras áreas biotecnológicas (SLEATOR et al., 2008; NIELSON, WALL e SIX, 2015).

Os microbiologistas apontam dificuldades em cultivar grande parte da microbiota presente no solo indo ao encontro de relatos indicando que apenas 0,1 a 1,0% da microbiota do solo é cultivável por meio de métodos padrões (TORSVIK et al., 2002). Desde a década passada houve um crescimento dos estudos independentes de cultivo de micro-organismos, os quais permitem aos pesquisadores alcançarem um retrato do que ocorre na comunidade microbiana em determinado ambiente (WOOD e SALZBERG, 2014).

A metagenômica abrange um amplo campo nas ciências biológicas direcionado à obtenção de conhecimento quanto aos genomas de micro-organismos, bem como quanto a toda comunidade microbiológica presente nos mais diversos ambientes. Entretanto, uma vez que o foco desta abordagem é o material genético, sua aplicação possui o grande benefício de não necessitar o cultivo destes micro-organismos para

que os estudos sejam realizados (CHISTOSERDOVA, 2010). Traduz-se, portanto, em uma importante ferramenta que possibilita explorar o ambiente microbiano e suas potencialidades genéticas e metabólicas (HANDELSMAN, 2004; DANIEL, 2005; SILVEIRA et al., 2006; STEELE et al., 2009; SIMON e DANIEL, 2010). Sendo assim, vem em auxílio e se apresenta como uma alternativa na busca por novos genes voltados à degradação do material lignocelulósico.

A análise da biblioteca metagenômica pode ser feita abordando duas metodologias: funcional e sequencial (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003). A investigação por meio da função identifica clones que expressam enzimas ou uma via metabólica desejada (JEON et al., 2009) sendo o fenótipo identificado em meios de cultivo com substrato específico. A abordagem por meio de sequência é feita com a aplicação de sondas de hibridização desenhadas com base em regiões conservadas do DNA, ou por PCR, possibilitando encontrar genes de interesse. Por este método é utilizado também o sequenciamento das extremidades dos insertos de DNA recombinante ou sequenciamento total dos DNAs. A identificação das sequências metagenômicas é feita por comparação em banco de dados mundiais (SCHLÜTER et al., 2008; MORIMOTO e FUJII, 2009).

Uma vez que os micro-organismos desempenham diversas funções nos mais variados ambientes, em especial nos solos, são atores imprescindíveis nos processos biogeoquímicos (LIMA et al., 2009; DE SOUZA et al., 2013). Reconhecida a relevância destes, são também importantes ferramentas na biotecnologia atuando como fonte de enzimas, antibióticos, biorremediadores, entre outros recursos que buscam a melhoria das condições de vida humana de forma sustentável (PEREIRA et al., 2012).

A metagenômica permite um grande alcance de micro-organismos não cultivados, desta forma aumenta as chances de encontrar enzimas ainda não caracterizadas, com a finalidade de estudar esta porção ainda desconhecida e verificar se a mesma apresenta atividades biotecnologicamente interessantes e aplicáveis. Através de sequenciamentos metagenômicos tem sido possível encontrar uma ampla quantidade de enzimas envolvidas na degradação do complexo lignocelulósico (KOECK et al., 2014).

Sendo assim, com o objetivo de atender às premissas apontadas pelo MAPA quanto à sustentabilidade ambiental e aumento de produtividade da terra de modo a

preservar o meio ambiente, somado ao fato de que no solo se encontra uma rica fonte de micro-organismos e enzimas com potencial biotecnológico, esta dissertação trava sobre a prospecção e levantamento de potenciais enzimas envolvidas na degradação do extrato lignocelulósico presente na biomassa remanescente através da abordagem metagenômica, o que irá contribuir para o meio acadêmico no avanço destas tecnologias ainda incipientes com relação à viabilidade do etanol 2G.

3 OBJETIVOS

Analisar o panorama do perfil metabólico e taxonômico em um metagenoma de solo sob cultivo de cana-de-açúcar, observando a relação existente entre os mesmos. Prospectar enzimas de interesse biotecnológico envolvidas na desconstrução do material lignocelulósico.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliação do perfil taxonômico desta comunidade;
- Realizar o levantamento qualitativo e quantitativo de algumas famílias de enzimas envolvidas na desconstrução de material lignocelulósico;
- Correlacionar as enzimas identificados com seus potenciais táxons.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de solo e extração do DNA metagenômico da amostra

O solo foi amostrado na Usina Pitangueiras Açúcar e Álcool – SP, localizada na porção noroeste do estado a aproximadamente 397 Km da capital. De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, esta região é pertencente ao tipo Aw – tropical chuvoso com inverno seco, sendo o mês mais frio com temperatura média superior a 18 °C. A precipitação média anual desta região é de 1355 mm e temperatura anual média de 23 °C (CEPAGRI, 2015).

A coleta se deu em agosto de 2012, inverno no Brasil, em campo sob cultivo de cana-de-açúcar (RB – 855453) colhida mecanicamente. Não houve queima da cultura nesta área e havia palhada de cana-de-açúcar sobre o solo.

A área de amostragem foi delimitada perpendicularmente à linha de plantio, com cinco pontos para coleta (NUNES et al., 2011). A distância entre os extremos do quadrante foi de 5 m², somando 25 m² de área representativa. O solo foi coletado até a profundidade de 0-20 cm a partir da superfície, no diâmetro de 5 cm para cada ponto.

4.2 Montagem da biblioteca, sequenciamento *high throughput* e tratamento das *reads*

As amostras de solo foram unidas e homogeneizadas resultando em uma amostra representativa do ambiente. Desta amostra, 1 g foi utilizado para a extração do DNA total através do *FastDNA® SPIN Kit for Soil* (BIO 101 – Quantum Biotechnologies), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Este *kit* fornece grande quantidade de material genético quando comparado aos outros, permanecendo com qualidade (MAHMOUDI; SLATER e FULTHORPE, 2011). O DNA total foi avaliado em gel de agarose 0,6% e em leitura na plataforma Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e 1 µg foi utilizado para o sequenciamento.

A biblioteca metagenômica foi preparada conforme protocolo *TruSeq® DNA Sample Preparation v2* (Illumina®) recomendado pelo fabricante. O *Whole Genome Sequence* (WGS) foi realizado na plataforma Illumina® (NGS – *Next Generation Sequencing*), equipamento HiScanSQ, utilizando os *kits Paired-End Cluster*

Generation kit v3 (Illumina®) e *TruSeq™ SBS kit v3 – 200 Cycles* (Illumina®) nas especificações do fabricante. Uma vez que os dados são *paired-end* (2x 100 pb) o resultado da demultiplexação foram dois arquivos, R1 e R2.

Os dados metagenômicos brutos resultantes do sequenciamento foram submetidos a um processamento de modo a remover as sequências de *barcodes* e de adaptadores. Para isso os programas *Scythe* v. 0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) e *CutAdapt* v. 1.4.1 (MARTIN, 2011) foram utilizados no tratamento das extremidades 3' e 5' das *reads*, respectivamente. Subsequentemente, através do programa *PRINSEQ-lite* v.0.20.3 (SCHMIEDER e EDWARDS, 2011) as bases das *reads* foram analisadas com relação à qualidade, em que seriam removidas aquelas de baixa qualidade. A remoção de adaptadores e *barcodes* da extremidade 3' é realizada antes da remoção por qualidade, pois se esta remoção por qualidade ocorrer antes da retirada dos *barcodes* e adaptadores, bases que caracterizam um *barcode* ou um adaptador, por exemplo, poderia ser removida por possuir baixa qualidade, afetando negativamente a identificação e remoção destes *barcodes/adaptadores*.

Para parametrizar o tratamento das sequências, estas foram avaliadas segundo a qualidade antes e depois do processamento das mesmas através do programa *FastQC* v. 0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), através do qual foram gerados os gráficos antes e depois do tratamento realizado com as *reads* de R1 e R2.

4.2.1 Amostra comparativa e obtenção dos dados taxonômicos e funcionais

Para a obtenção do perfil taxonômico as *reads* foram submetidas ao servidor *MG-RAST* (*Rapid Annotation using Subsystems Technology for Metagenomes*) (MEYER et al., 2008), o qual utiliza o padrão taxonômico do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para esta finalidade. A análise de abundância foi realizada a partir do algoritmo *LCA* (*Lowest Common Ancestor*) presente no servidor *MG-RAST*, a qual utiliza o banco de dados *M5NR* (*M5 non-redundant protein*) (WILKE et al., 2012), a partir de uma identidade mínima de 60%, com um e-value máximo de corte de 10^{-5} e alinhamento mínimo de 50 pb.

O perfil funcional das *reads* foi obtido através do servidor *MG-RAST*, o qual

lança mão, neste sentido, preferencialmente do banco de dados curado SEED (OVERBEEK et al., 2014), utilizando identidade mínima de 60%, com e-value máximo de 10^{-5} e alinhamento mínimo de 15 aminoácidos.

A fim de comparar os dados alcançados pelo sequenciamento do DNA total do Solo Agrícola (SA) sob cultivo de cana-de-açúcar foram utilizados dados metagenômicos de uma amostra presente no banco público do servidor MG-RAST (MEYER et al., 2008). O DNA metagenômico desta amostra (4446153.3) é referente ao solo de uma Floresta Tropical (FT) denominada Floresta Experimental Luquillo localizada em Porto Rico. Esta floresta tropical é caracterizada por um clima relativamente estável com a média anual de precipitação de 4500 mm e temperatura média anual de 22 a 24°C (DEANGELIS et al., 2010).

Os gráficos foram gerados e as análises estatísticas foram realizadas sendo o método estatístico utilizado o teste exato de Fisher e a correção de erro, Benjamini-Hochberg, a partir do software STAMP v. 2.1.3 (PARKS et al., 2014).

4.2.2 Montagem dos dados do metagenoma e obtenção dos novos perfis taxonômico e funcional

A fim de se obter informações mais profundas e de maior acurácia acerca do ambiente estudado, foi realizada a montagem dos dados do metagenoma, isto é, a partir das sequências (*reads*) oriundas do sequenciamento, realizou-se a formação de sequências maiores, aqui chamadas de sequências montadas. Uma vez que os dados são metagenômicos, foi utilizado o algoritmo montador IDBA-UD v.1.1.2 (PENG et al., 2012). Este montador possui um modo de entrada dos dados diferenciado, o qual ao invés de utilizar uma entrada simples como outros montadores, utiliza uma entrada múltipla que será relativa à profundidade de cobertura das *reads*. Desta forma, os *k-mers* errôneos, sejam de alta, sejam de baixa cobertura, são removidos (PENG et al., 2012). A avaliação referente à montagem genômica foi feita através do programa Assemblathon 2 (BRADNAM et al., 2013). Para o alinhamento das *reads* nos dados montados foi utilizado o alinhador BOWTIE2 v.2.2.3 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012). Através deste alinhamento entre as *reads* e a montagem genômica é possível se ter a informação referente às localizações das *reads* em cada montagem,

possibilitando, por exemplo, determinar a abundância de determinada espécie ou gene e estabelecer relações entre estes.

A filiação taxonômica foi realizada partindo-se das sequências montadas utilizando o programa Kraken v.0.10.5-beta, o qual é pautado em análise de *Lowest Common Ancestor* (LCA). O núcleo deste programa é composto por um conjunto *k-mers* e respectivo LCA dos micro-organismos que possuem em seus genomas tais *k-mers*. Sendo assim, este programa filia cada montagem a determinado táxon baseando-se em cálculos que partem da composição de *k-mers* presente na montagem em questão que são comparados aos *k-mers* e seus respectivos LCAs de seu banco de dados (WOOD e SALZBERG, 2014).

Referente ao aspecto funcional dos dados metagenômicos, para a obtenção da predição gênica foi utilizado o programa Prokka v.1.11, um programa de linhas de comando cuja função é fazer a anotação de um *draft* de genoma bacteriano de maneira relativamente rápida e compatível com recursos computacionais simples como um computador pessoal (SEEMANN, 2014). Nesta etapa o programa gera informações sobre as localizações dos supostos genes presentes nas sequências, neste caso, sequências montadas. Subsequentemente à predição gênica, a anotação do perfil funcional da comunidade microbiana foi desempenhada através do programa InterProScan v.5.16-55.0 (JONES et al., 2014), o qual combina vários métodos de reconhecimento de assinaturas de proteínas a partir do banco de dados Inter Pro (MITCHELL et al., 2015), entre eles: PANTHER (10.0), SMART (6.2), PRINTS (42.0), Pfam (28.0), TIGRFAM (15.0) e outros. Nesta etapa este programa identifica e anota quais são os genes presentes nas sequências que supostamente eram genes, bem como quais são as funções e as demais possíveis informações que se possa alcançar sobre as mesmas. Aqueles genes que foram identificados como pertencendo às famílias de GHs são os tratados neste trabalho.

Para além da anotação através do InterProScan, os dados foram confrontados com o dbCAN v.4 (YIN et al., 2012), um servidor online que se trata de um banco de dados de *Hidden Markov Model* (HMM) construído a partir das informações presentes no banco de dados CAZy (LOMBARD et al., 2014), a fim de se obter maiores informações acerca das famílias enzimáticas que estão relacionadas ao metabolismo

de carboidratos juntamente às GHs, isto é, enzimas presentes nas famílias CBMs, AAs e CEs.

5 RESULTADOS

5.1 Sequenciamento, validação da biblioteca metagenômica e processamento das *reads*

A qualidade e integridade do DNA metagenômico oriundo da comunidade microbiana encontrada sob cultivo de cana-de-açúcar pode ser observada através das Figuras 6 e 7 obtidas através do Bioanalyzer v. 2.3. Na figura 7 observa-se o padrão de fragmentos com cerca de 300 pb (~80 segundos) originados para a construção da biblioteca para o sequenciamento.

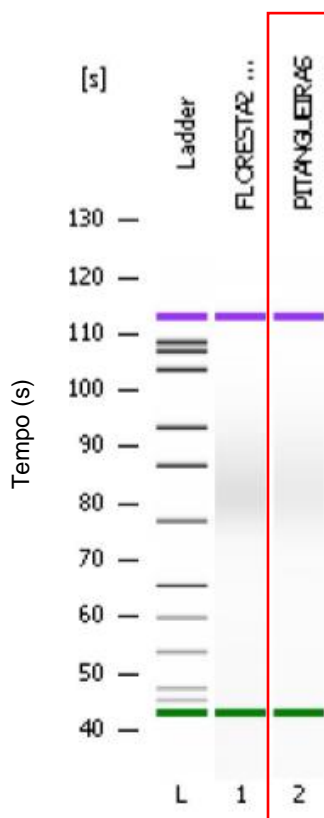


Figura 6. Eletroforese do DNA metagenômico da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar (canaleta 2) contendo o padrão de fragmentos com cerca de 300 pb (~80 segundos) originados para a construção da biblioteca para o sequenciamento.

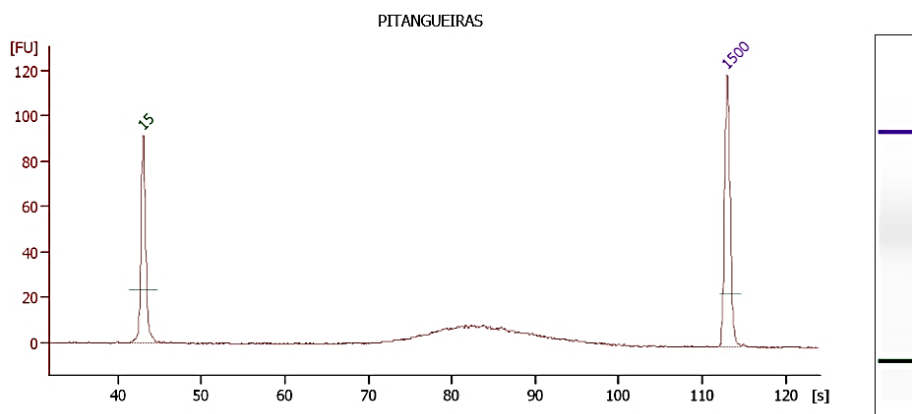


Figura 7. Validação da montagem da biblioteca para o sequenciamento obtida através do Bioanalyzer v. 2.3. Fragmentos com cerca de 300 pb (80 segundos) após a quebra mecânica do DNA metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

5.2 Quantidade de sequências (*reads*) resultantes do sequenciamento e comparação do perfil de qualidade das *reads* antes e após o processamento das mesmas

O total de sequências resultantes do sequenciamento do DNA metagenômico da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, bem como a quantidade de *reads* resultantes após o processamento das mesmas (R1 e R2), se encontram contemplados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação dos dados pré e pós processamento das *reads* agrupadas em R1 e R2. A coluna Pré Processamento contém a quantidade de *reads* resultantes do sequenciamento. A coluna Pós Processamento contém a quantidade de *reads* que seguiram para as análises.

<i>Reads</i>	PRÉ PROCESSAMENTO		PÓS PROCESSAMENTO	
	R1	R2	R1	R2
Total de sequências (<i>reads</i>)	33946405	33946405	32767986	32767986
Tamanho da sequência	100	100	15-100	15-100
%GC	63	64	63	63

Os gráficos pelos quais é possível observar a comparação acerca das qualidades *phred* dos dados sequenciados antes e após o processamento das *reads* podem ser vistos nas figuras de 8 a 11.

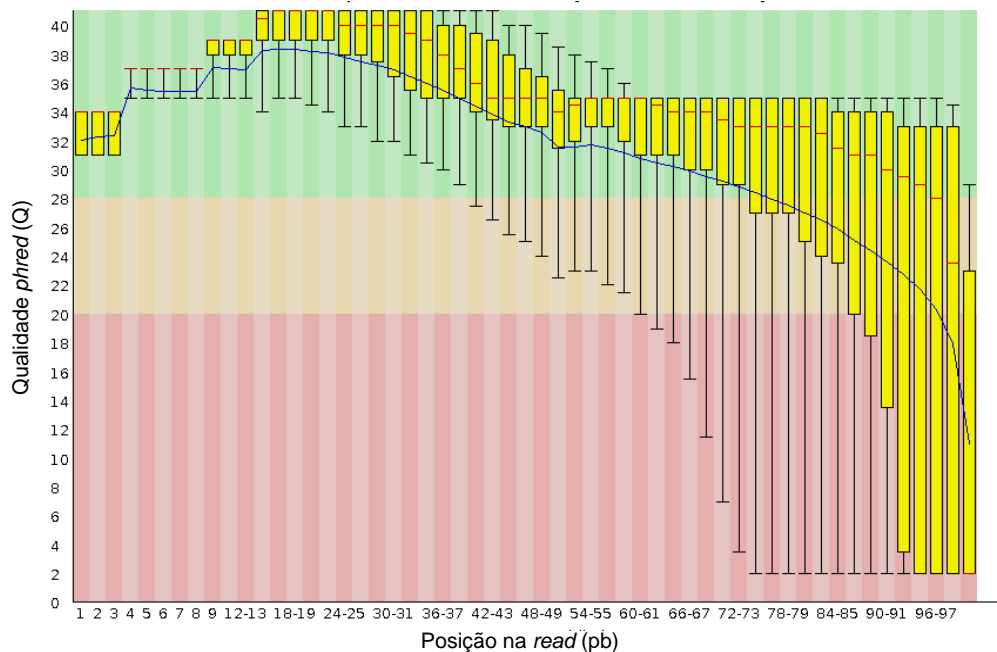


Figura 8. Perfil de qualidade *phred* das sequências R1 analisado antes o processamento das mesmas.

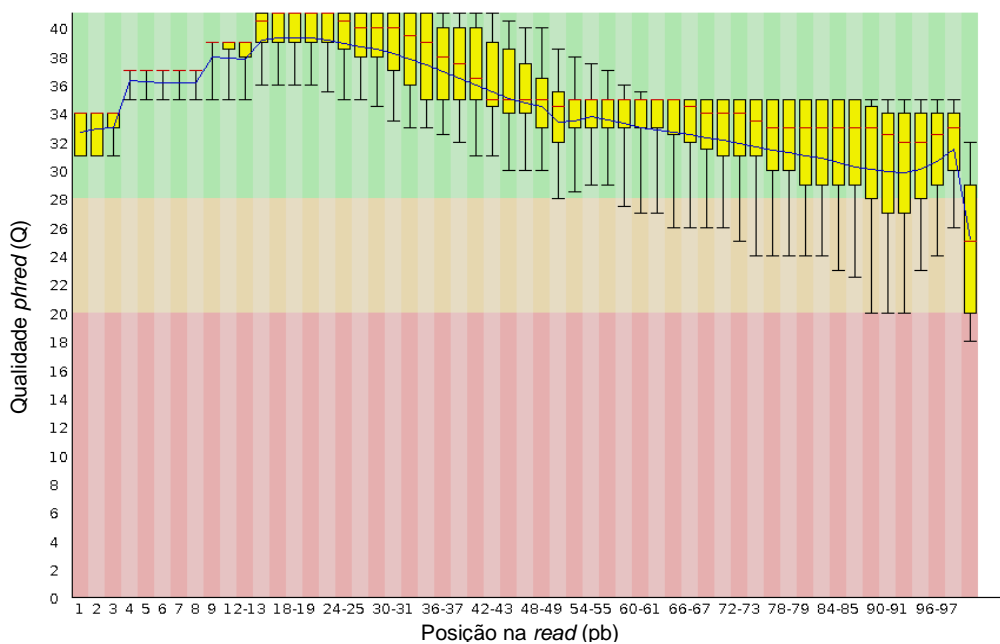


Figura 9. Perfil de qualidade *phred* das sequências R1 analisado após o processamento das mesmas.

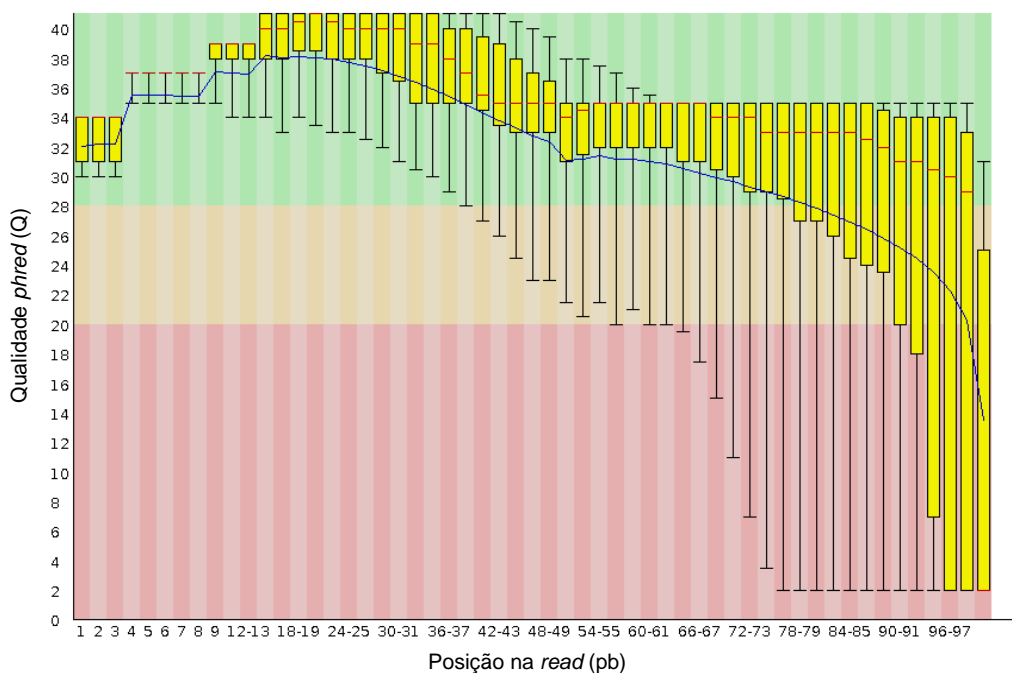


Figura 10. Perfil de qualidade *phred* das sequências R2 analisado antes o processamento das mesmas.

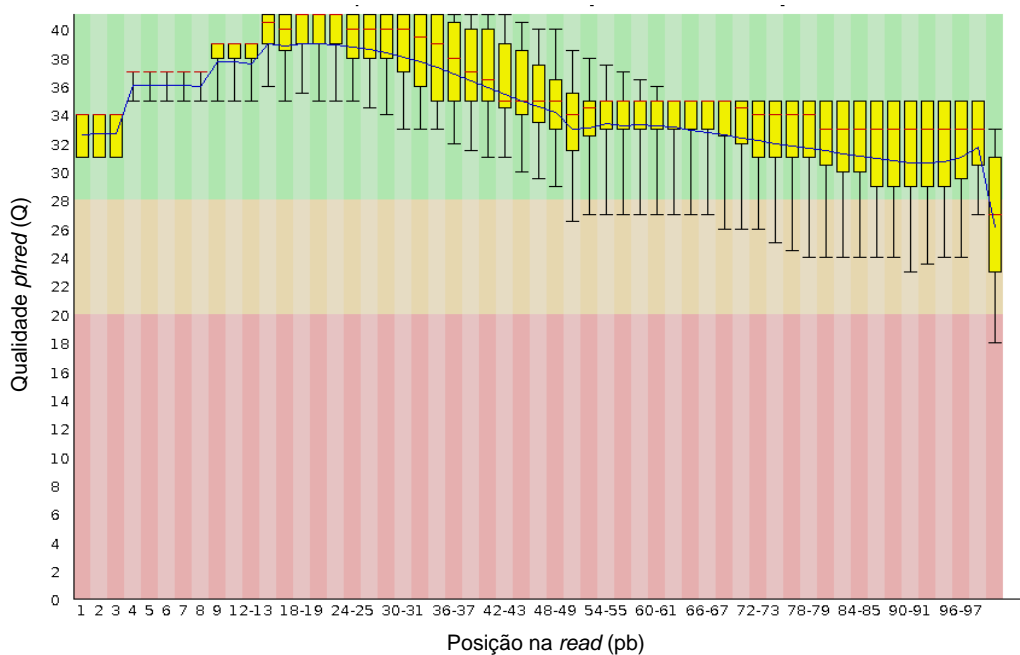


Figura 11. Perfil de qualidade *phred* das sequências R2 obtido após o processamento das mesmas.

5.3 Perfil metagenômico da distribuição taxonômica da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA) comparado ao metagenoma de Floresta Tropical (FT) através do MG-RAST

As amostras possuem perfis diferentes em relação à predominância dos filos. O metagenoma SA apresentou o filo Actinobacteria como o mais abundante, seguido dos filos Proteobacteria e Firmicutes. O filo Proteobacteria se apresenta expressivamente como o mais abundante na amostra metagenômica FT, seguido de Acidobacteria e Actinobacteria (Figura 12).

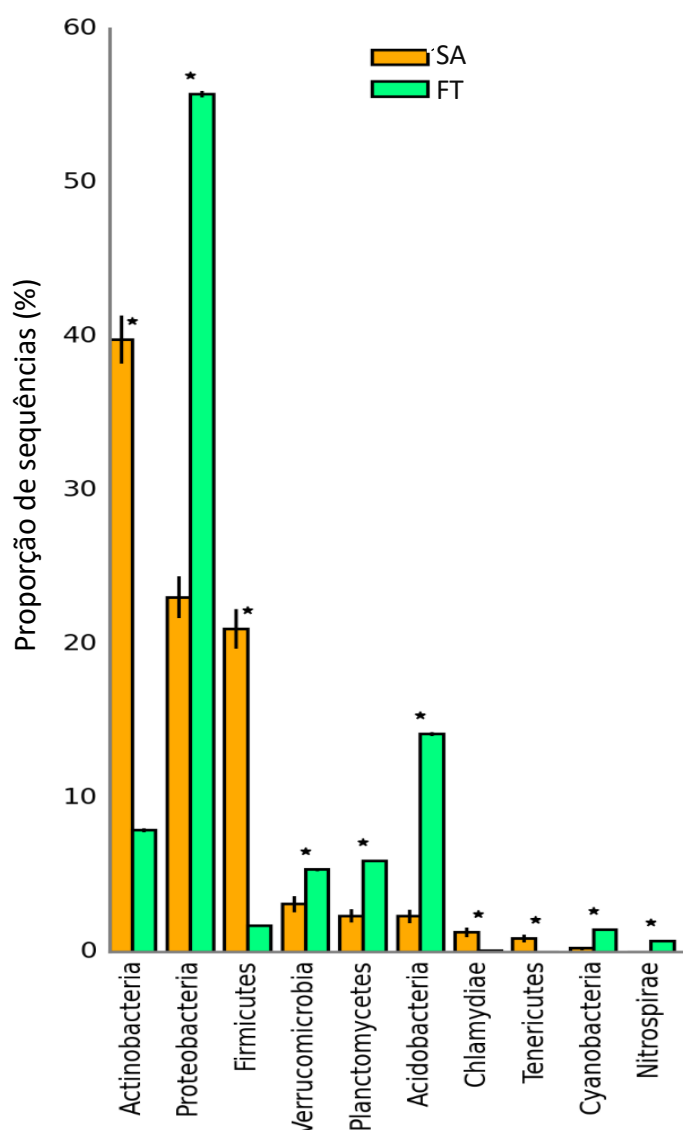


Figura 12. Perfis taxonômicos a nível de Filos das amostras dos metagenomas SA e FT, processados no servidor MG-RAST. Abundâncias com diferenças significativas ($P < 0.05$) calculadas no programa STAMP v. 2.1.3.

5.4 Perfil funcional metagenômico da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA) comparado ao metagenoma de Floresta Tropical (FT) através do MG-RAST

A fim de encontrar potenciais sequências codificadoras de genes relacionados à degradação de compostos lignocelulósicos, o DNA metagenômico do solo sob o cultivo canavieiro foi sequenciado e analisado através de ferramentas presentes no servidor MG-RAST por meio da classificação hierárquica (*Hierarchical Classification*)

para a análise funcional. Utilizando como fonte de informação o banco de dados SEED (BAO et al.; 2011), o perfil funcional no primeiro de três níveis de classificação dos subsistemas pode ser observado na Figura 13, contendo os subsistemas presentes nos ambientes e suas respectivas abundâncias. O subsistema explorado, metabolismo do carboidrato, foi o mais encontrado em ambas as amostras.

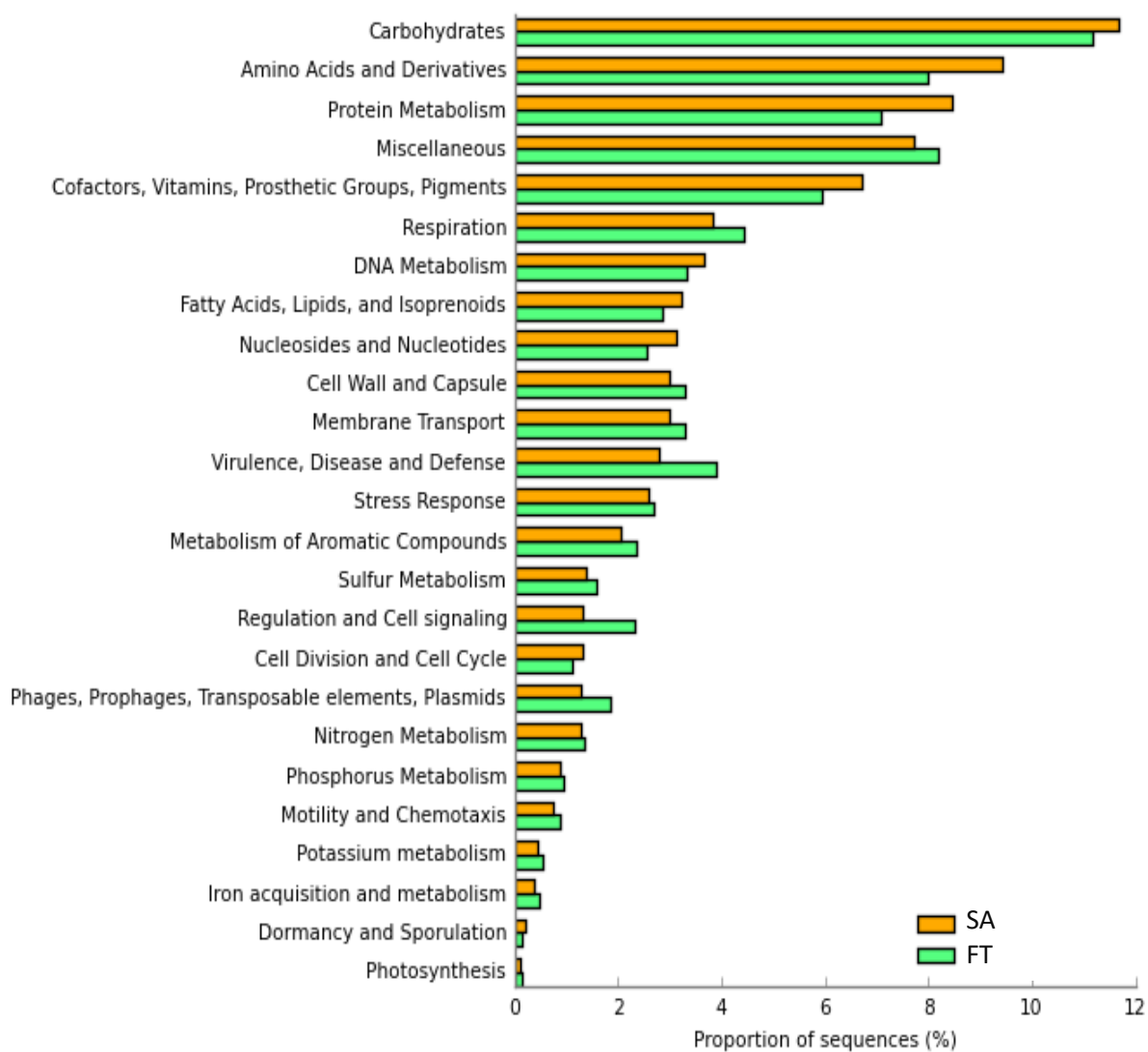


Figura 13. Perfil funcional no nível 1 dos metagenomas SA e FT, originado a partir do servidor MG-RAST e estatisticamente analisado pelo programa STAMP v.2.1.3. *($P < 0.05$).

5.5 Montagem dos dados metagenômicos

Após a análise prévia obtida através das reads, estas reads foram encaminhadas para a montagem dos dados metagenômicos. A partir da análise desempenhada através do programa Assemblathon 2 (BRADNAM et al., 2013) foi possível verificar os resultados sobre a montagem feita por meio do programa IDBA-UD v.1.1.1.2 (Tabela 3) (PENG et al., 2012) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado da montagem dos dados sequenciados através do *software* IDBA-UD v.1.1.1.2 (PENG et al., 2012).

Número de sequências montadas	671.441
Tamanho total (pb)	184.377.020
Maior sequência (pb)	24.978
Número de sequências > 1K nt	13.328
Número de sequências > 10K nt	46
Tamanho médio	275
N50	283
L50	166.184
%A	18,38%
%C	32,02%
%G	31,80%
%T	17,81%

5.6 Perfil taxonômico do metagenoma de solo após montagem dos dados

A partir da montagem dos dados do metagenoma SA, obteve-se as informações taxonômicas da comunidade microbiana a qual apresentou 24,5% de filiação ao domínio *Bacteria* e 74,5% de sequências não identificadas (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição taxonômica dos domínios do metagenoma da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA).

Domínio	%
<i>Bacteria</i>	24,536
<i>Eukaryota</i>	0,4218
<i>Archaea</i>	0,3152
<i>Viruses</i>	0,0018
<i>Raiz</i>	0,1371
Não classificadas	74,588

A distribuição taxonômica em nível de filios da comunidade microbiana referente ao domínio *Bacteria* presente no solo sob cultivo de cana-de-açúcar pode ser observada por meio do gráfico a seguir, com grande predominância do filo Proteobacteria e Actinobacteria (Figura 14).

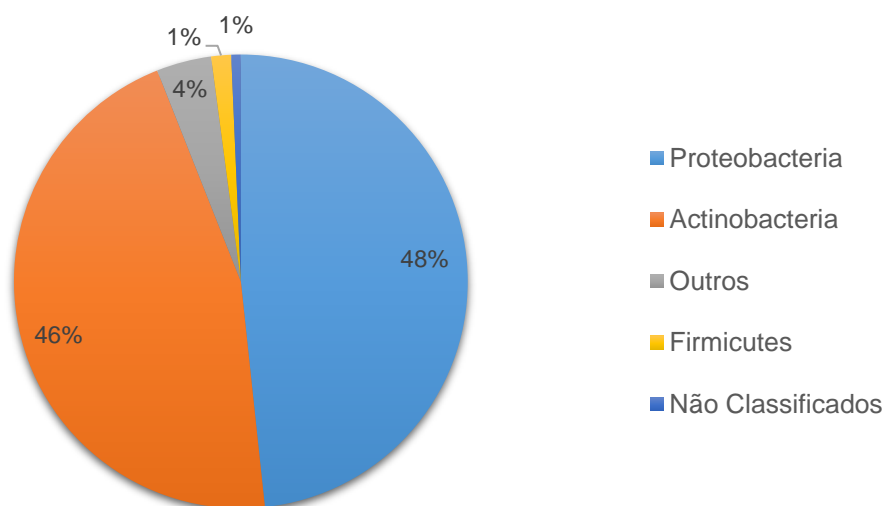


Figura 14. Distribuição taxonômica a nível de filo do metagenoma da comunidade microbiana em relação ao domínio *Bacteria* presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

A Tabela 5 a seguir contém os filios que apresentaram porcentagem menor que 1%.

Tabela 5. Composição de Filos que apresentaram frequência menor que 1% listados em ordem decrescente de abundância.

Outros	(%)
Acidobacteria	0,946
Deinococcus-Thermus	0,668
Chloroflexi	0,567
Planctomycetes	0,369
Cyanobacteria	0,316
Bacteroidetes	0,311
Verrucomicrobia	0,196
Gemmatimonadetes	0,101
Chlorobi	0,066
Spirochaetes	0,059
Nitrospirae	0,053
Synergistetes	0,049
Cloacimonetes	0,033
Thermodesulfobacteria	0,019
Thermotogae	0,019
Deferribacteres	0,017
Aquificae	0,013
Tenericutes	0,008
Armatimonadetes	0,007
Fusobacteria	0,006
Fibrobacteres	0,006
Elusimicrobia	0,005
Ignavibacteriae	0,004
Chlamydiae	0,004
Dictyoglomi	0,003
Candidatus_Saccharibacteria	0,002
Chrysiogenetes	0,001
Caldiserica	0,001

5.7 Enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica identificadas nos dados montados do metagenoma da comunidade microbiana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar

Para o perfil metabólico da comunidade microbiana de solo agrícola de cana-de-açúcar (SA) feito após a montagem dos dados, objetivou-se a identificação das

enzimas envolvidas na desconstrução do material lignocelulósico. Várias famílias de GHs foram encontradas em diferentes quantidades. Além disso, a distribuição taxonômica a nível de filo e classe das sequências montadas que continham as famílias GHs foi levantada, a partir da qual se observou a predominância do filo Actinobacteria seguido do filo Proteobacteria.

Foram identificadas 333 assinaturas de enzimas distribuídas em 27 famílias GHs (Tabela 6). Apenas uma parte das assinaturas foram alcançadas pela distribuição taxonômica. Do total de assinaturas enzimáticas, foi possível realizar atribuição taxonômica de 129 enzimas, entretanto estas se encontraram distribuídas em meio as 20 famílias de GHs das 27 encontradas (Tabela 6 e Figura 15).

A fim de agregar informações mais profundas acerca do metabolismo de carboidratos neste ambiente, para além das famílias, também buscou-se alcançar quais eram as funções enzimáticas presentes nas famílias GHs (Tabela 5).

A Tabela 6 traz estas informações de maneira sumarizada ao pontuar as classes taxonômicas que puderam ser identificadas dentre o total de enzimas, bem como as funções anotadas das mesmas. Em seguida, na Figura 16 se observa um diagrama ilustrando a via de degradação do material lignocelulósico associando quais são as famílias enzimáticas que se encontram atreladas a cada etapa desta via.

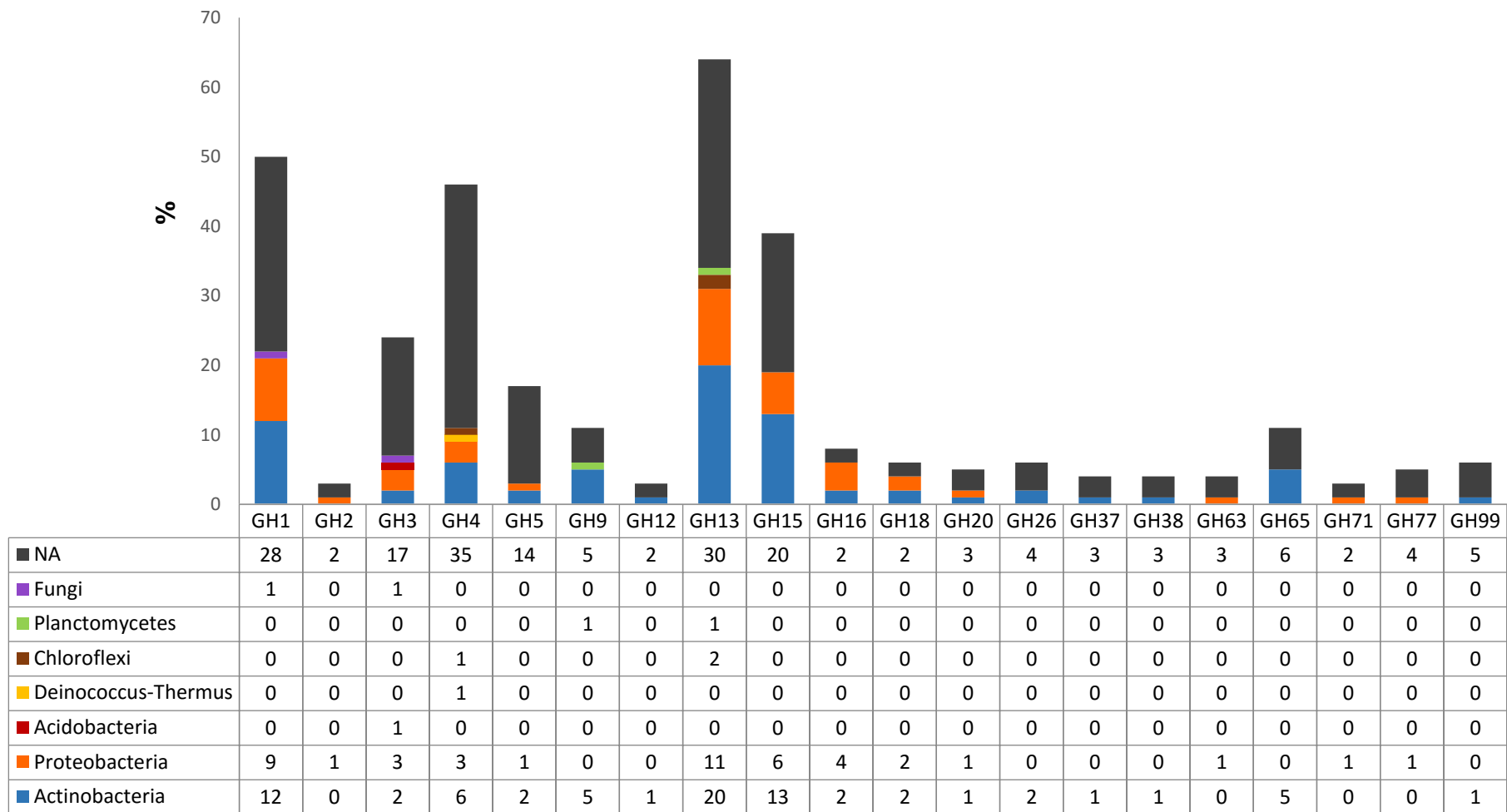
A distribuição taxonômica a nível de filo das GHs encontradas neste ambiente pode ser visualizada na Figura 15, na qual se observa a predominância do Filo Actinobacteria. Com relação às enzimas que estão relacionadas às atividades das GHs, das 72 famílias existentes de CBM, 21 estão presentes nesta comunidade, enquanto que das 12 famílias de AA, 5 foram observadas para este ambiente, e das 16 famílias de CE, 11 foram identificadas.

Tabela 6. Famílias de GHs e suas respectivas funções encontradas no metagenoma da comunidade microbiana presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, a partir do *software* InterProScan v.5.16-55.0 (JONES et al., 2014), bem como as atribuições taxonômicas das mesmas a nível de Filo (negrito) e Classe (itálico), através do *software* Kraken v.0.10.5-beta (WOOD e SALZBERG, 2014). As seqüências das quais não foi possível se obter a filiação taxonômica foram agrupadas no conjunto Não-Atribuída (NA).

Família (GH)	Quantidade	Actino-bacteria	Proteobacteria			Acido-bacteria	Deinococcus-Thermus	Chloroflexi	Plancto-mycetes	Fungi*	NA	Função
		<i>Actino-bacteria</i>	<i>Alpha</i>	<i>Beta</i>	<i>Delta</i>	<i>Acido-bacteria</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Thermomicrobia</i>	<i>Plancto-mycetia</i>	<i>Asco-Mycota*</i>	NA	
GH1	50	12	6	2	1	0	0	0	0	1	28	3.2.1.21 β- galactosidase e β- glicosidase
GH2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3.2.1.23 β-galactosidases
GH3	24	2	3	0	0	1	0	0	0	1	17	-
GH4	46	6	3	0	0	0	1	1	0	0	35	-
GH5	17	2	1	0	0	0	0	0	0	0	14	Celulases
GH9	11	5	0	0	0	0	0	0	1	0	5	3.2.1.4 Endo-β-glucanases
GH11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Celulase e hemicelulase
GH12	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-
GH13	64	20	9	2	0	0	0	2	1	0	30	3.2.1.1 α-amilase
GH15	39	13	3	1	2	0	0	0	0	0	20	-
GH16	8	2	3	0	1	0	0	0	0	0	2	-
GH18	6	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	-
GH20	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	3.2.1.52 β-hexomidase
GH26	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3.2.1.78 β-mananase Endo-mananase
GH27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3.2.1.22 α-galactosidase
GH30	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	O-glicosídicas
GH36	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	EC 3.2.1.22 Melibiase

GH37	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	EC 3.2.1.28 Trehalase
GH38	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	EC 3.2.1.24 α -mannosidase
GH44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3.2.1.4 Endo- β -glucanase
GH57	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
GH63	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	3.2.1.106 Manosil oligo. glicosidase
GH65	11	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	-
GH71	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-
GH77	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2.4.1.25 Desramif. glicosil transferase
GH99	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	-
GH127	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	EC 3.2.1.55 β -L- arabinofuranosidase

*Não pertencentes ao domínio Bacteria.



NA – não atribuído.

Figura 15. Atribuição taxonômica a nível de filo das sequências montadas que apresentaram as famílias de GHs.

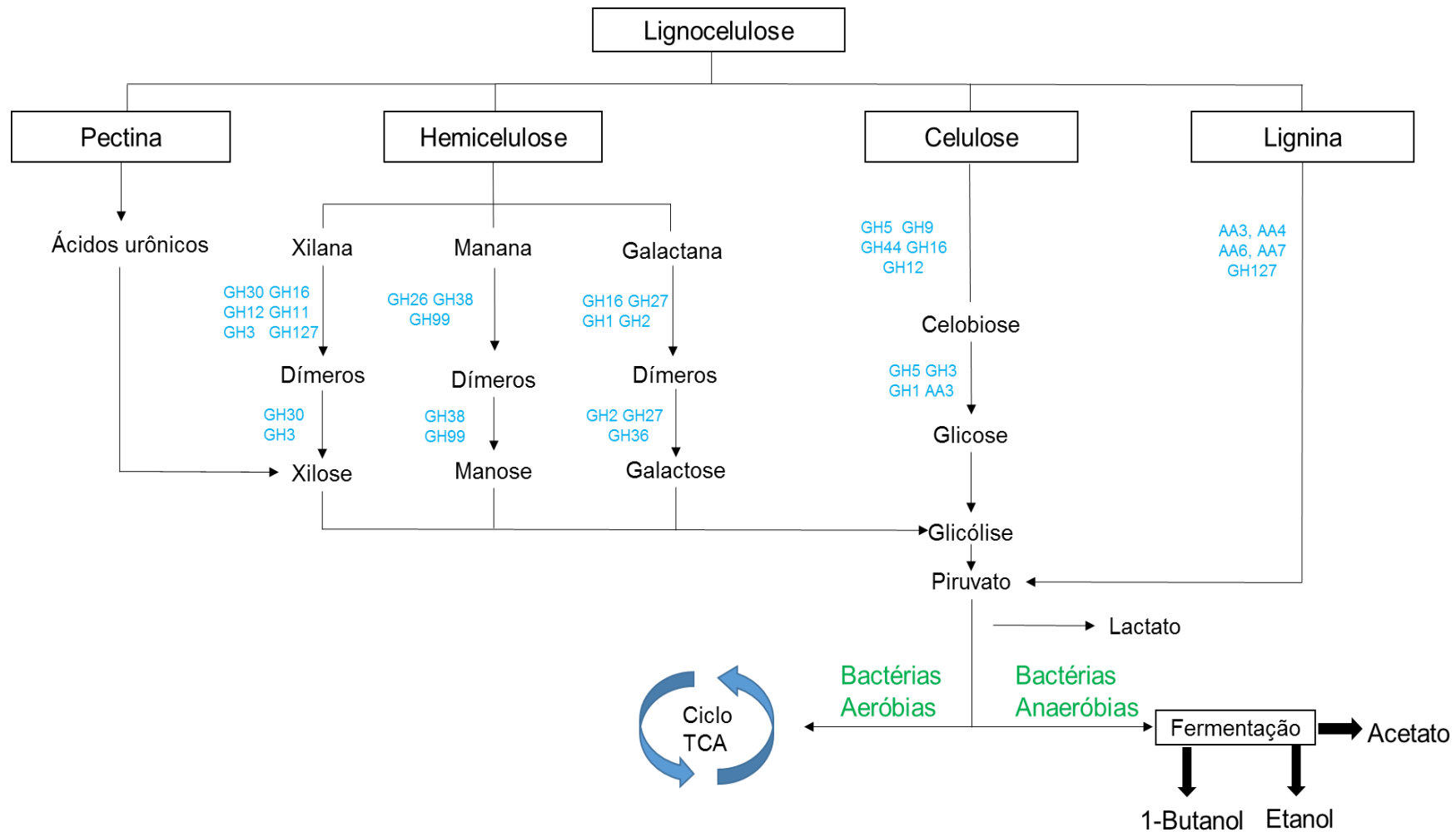


Figura 16. Via da degradação lignocelulósica e da pectina associadas às enzimas relacionadas encontradas no metagenoma de solo sob cultivo de cana-de-açúcar através dos dados montados. As famílias de enzimas presentes na biblioteca metagenômica do solo sob cultivo de cana-de-açúcar são destacadas no texto em azul (Adaptado de: MHUANTONG et al., 2015).

6 DISCUSSÃO

6.1 Distribuição taxonômica do metagenoma das comunidades microbianas presentes em solo sob cultivo de cana-de-açúcar (SA) e floresta tropical (FT)

Antes da montagem dos dados, através das análises realizadas a partir do servidor MG-RAST referente aos dados metagenômicos da comunidade presente em SA, foi possível se obter um panorama prévio com relação à distribuição taxonômica encontrada nesta comunidade, bem como compará-la a uma comunidade de floresta tropical (FT).

Nesta análise prévia foi observada no ambiente SA maior abundância para o filo Actinobacteria seguido dos filios Proteobacteria e Firmicutes, enquanto que no ambiente FT o filo Proteobacteria foi o mais abundante seguido dos filios Acidobacteria e Actinobacteria.

Após a montagem dos dados metagenômicos do ambiente SA e a subsequente análise taxonômica realizada através do programa Kraken v.0.10.5-beta, observou-se uma inversão de posições, na qual o filo Proteobacteria passou a ser o filo mais abundante neste ambiente. Todavia, o filo Actinobacteria permaneceu apresentando grande abundância referente à composição da comunidade (Figura 14).

Estes dois filios mais abundantes em SA (Proteobacteria e Actinobacteria) geralmente estão entre os principais componentes encontrados em estudos metagenômicos de comunidade microbianas presente em solos (VENTURA et al., 2007; JANSSEN, 2006; QUIRINO et al. 2009; DINI-ANDREOTE et al., 2010; ORR et al., 2015).

Proteobacteria é um dos filios mais vastos dentro dos procariotos, e responsável pela porção majoritária das bactérias gram-negativas, envolvendo um conjunto complexo de atributos fenotípicos e fisiológicos que inclui indivíduos fototróficos, heterotróficos e quimiolitotróficos (GUPTA, 2000). Por conta desta grande variedade metabólica, fisiológica e morfológica, este grupo de bactérias

desempenha um importante papel para o ciclo biogeoquímico do solo, sendo predominantemente encontrado em bibliotecas genômicas oriundas de solo (KERSTERS, 2006). Este papel é potencializado quando há rotação de cultura com plantas da família Fabaceae, às quais micro-organismos endofíticos diazotróficos – que se associam à planta e realizam a fixação biológica de nitrogênio – presentes neste filo se associam. No entanto, as proteobactérias possuem um papel especial com relação à cultura da cana-de-açúcar, pois esta cultura é composta por uma das espécies da família Poaceae a qual também apresenta interação com bactérias endofíticas diazotróficas, como por exemplo, as bactérias do gênero *Burkholderia* sp., *Herbaspirillum* sp. (β -Proteobacteria), *Azospirillum* sp. (α - Proteobacteria) e *Azotobacter* sp. (γ -Proteobacteria). Além da fixação de nitrogênio, como produto de seus metabolismos tem-se o ácido indol acético (AIA) o qual está relacionado à promoção do crescimento da planta, logo, estas são consideradas bactérias promotoras do crescimento vegetal (CENTELLAS et al., 1999; BASHAN et al., 2004; TEJERA et al., 2005; LUVIZZOTO, 2008; PISA et al, 2011; PEREIRA et al., 2012).

O filo Proteobacteria, predominante em ambos os ambientes, pode ser subdividido em quatro grupos de acordo com os perfis fisiológicos de cada grupo: (i) acidófilas, oxidantes aeróbicas de ferro; (ii) neutrófilas, oxidantes aeróbicas de ferro; (iii) neutrófilas, anaeróbicas (dependentes de nitrato) oxidantes de ferro; e (iv) oxidantes fotossintéticas anaeróbicas de ferro (HEDRICH et al, 2011). Apesar desta subdivisão apontando as preferências de pH destes determinados grupos, o filo Proteobacteria não é tão influenciado pelo pH como os outros grupos (LAUBER et al., 2009). Em contrapartida, a umidade parece ter sido um fator preponderante na abundância deste filo para os ambientes analisados, principalmente para o ambiente FT no qual este filo apresenta uma diferença de abundância superior a três vezes a abundância do segundo filo, Acidobacteria. Van Horn et al., (2014) observaram correlação positiva entre a umidade e a abundância do filo Proteobacteria no solo. Sendo assim, possivelmente a queda na umidade, em decorrência do período de seca característico do inverno brasileiro, seleciona negativamente os micro-organismos deste filo no ambiente SA, favorecendo, por outro lado, aqueles encontrados no úmido ambiente de FT.

A classe α -Proteobacteria se destacou entre as demais classes de seu filo nos dois ambientes, corroborando os dados da literatura (SPAIN et al. 2009; KURAMAE et al., 2012), com destaque para o ambiente FT, a qual é a classe mais abundantes. Trata-se de uma diversa classe, com espécies de importantes papéis biológicos, apresentando uma ampla variedade metabólica, incluindo fotossíntese, fixação biológica de nitrogênio, oxidação da amônia e redução de compostos carbônicos (WILLIAMS et al., 2007), desempenhando deste modo um importante papel na cultura da cana-de-açúcar.

Os micro-organismos pertencentes ao filo Actinobacteria são conhecidos por serem importantes degradadores da matéria orgânica, como material lignocelulósico e quitina (GAVA et. al., 2002; DA VINHA et al., 2011; BRITO-CUNHA et al., 2015), estando conseqüentemente associados à presença de genes glicosil hidrolases (GH) (SUKHARNIKOV et al., 2012; MOHANTA, 2014; MENEZES et al., 2015; (WANG e LU, 2016), como encontradas neste ambiente.

Grande parte dos micro-organismos presentes no filo Actinobacteria são também caracterizados por serem mais resistentes a variações de pH e temperatura, inclusive em relação aos fungos (TUOMELA et al., 2000). É sabido que manejos agrícolas, como o uso da terra e a adição de fertilizantes, promovem modificações no ambiente que alteram significativamente a composição microbiológica do solo (JANGID et al., 2008). Tais resistências (a alterações de pH e temperatura) somadas ao fato de que micro-organismos deste filo produzem esporos de resistência (JEFFREY, 2008), provavelmente podem estar relacionadas à grande abundância do mesmo na comunidade presente em SA, uma vez que naquela presente no ambiente FT os micro-organismos predominantes com grande margem foram aqueles pertencentes ao filo Proteobacteria. A palhada remanescente que havia sobre o solo em que se encontrava tal comunidade microbiana provavelmente favoreceu a presença de organismos portadores de genes relacionados à degradação dos carboidratos, o subsistema mais abundante encontrado (Figura 12). Dadas as características metabólicas do filo Actinobacteria, outro fator que pode ter favorecido a grande abundância do mesmo é a palhada de cana-de-açúcar encontrada sobre o SA (WANG e LU, 2016).

Em função da variabilidade de seu metabolismo, características fisiológicas e capacidade de se desenvolverem em ambientes hostis, o filo Actinobacteria possui importante papel no setor industrial (RAJU, 2010; AZUMA, 2011; ADEGBOYE e BABALOLA, 2012; SHIVLATA et al., 2015). Há ainda um crescente interesse das indústrias de etanol por enzimas termoestáveis e seu emprego na geração de etanol celulósico (GONÇALVES et al., 2015) agregando cada vez mais destaque no setor energético (SAINI et al., 2015; WATANABE et al., 2015). Suela-Silva et al. (2013), apontam para a quantidade e variedade de espécies nos solos tropicais, os quais são uma potencial fonte de produtos biotecnológicos.

O filo Firmicutes, terceiro em abundância no SA, é caracteristicamente encontrado em solos sob cultivo de cana-de-açúcar (DINI-ANDREOTE et al., 2010; PISA et al., 2011). Rachid et al. (2013), ao compararem os perfis das comunidades microbianas existentes em solo do bioma Cerrado e em solos sob cultivo de cana-de-açúcar em diferentes manejos, reportam que há um aumento significativo na abundância deste filo em solos cujo manejo da cana-de-açúcar é feito sem a queima da mesma, como no caso de SA. Desta forma, é sugerido que a expressiva representatividade deste filo encontrada no SA seja influenciada pelas condições que este filo encontra neste específico ambiente, diferentemente do que ocorre no ambiente FT.

Entre as classes mais abundantes encontradas em SA estão *Bacilli* e *Clostridia*, duas importantes classes dentro de Firmicutes. Os micro-organismos destas classes são caracterizados por comporem um diverso grupo de bactérias gram-positivas relacionadas, a partir da fermentação à produção de ácido lático, acetona, butanol e etanol (GU et al., 2010). Entre eles há linhagens que utilizam uma ampla gama de monossacarídeos, dissacarídeos, amido e outros substratos como a própria xilana (LEE et al., 1885), possuindo, desta forma, potencial biotecnológico a ser explorado (GU et al., 2010). Dado que muitos destes indivíduos são capazes de degradar compostos presentes na biomassa vegetal, também é sugerida a relação entre a presença de palhada remanescente no solo à expressiva abundância destas duas classes, bem como às enzimas ligadas à degradação de xilose, encontradas neste ambiente. Sharmin et al. (2013) observaram a dominância deste filo ao analisar

a estrutura microbiana de resíduos em contato com o processamento da cana-de-açúcar, o que vem ressaltar estas relações.

A grande abundância destes micro-organismos aqui relatados, somada às enzimas encontradas neste estudo determinam um grande avanço nesse sentido, haja vista que identifica o potencial deste solo e seus constituintes, bem como provê coordenadas para os estudos consequentes. Uma vez encontradas enzimas ligadas à degradação do material lignocelulósico e que entre os micro-organismos mais abundantes estão aqueles pertencentes ao filo *Actinobacteria*, a probabilidade de que tais enzimas sejam termoestáveis e resistentes a variações de pH aumenta em relação a outros ambientes, sugerindo estudos mais aprofundados neste ambiente.

6.2 Perfil funcional do metagenoma da comunidade microbiana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar voltado à degradação do material lignocelulósico

A reconhecida diversidade encontrada nas comunidades microbianas dos solos, principalmente aquela relativa aos solos sob manejos agrícolas (UPCHURCH et al., 2008), foi também notada ao se observar o panorama funcional desta comunidade presente em solo sob cultivo de cana-de-açúcar. A variedade de famílias enzimáticas encontradas nesta comunidade microbiana compõe um conjunto enzimático cujo amplo espectro de atividades é suficiente para levar à desconstrução do complexo lignocelulósico, levando à liberação dos monômeros fermentescíveis.

Através das buscas realizadas após a montagem dos dados, tornou-se possível identificar uma ampla diversidade de famílias de GHs, as quais, como já citado são compostas por variadas enzimas com funções diversificadas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. Para além de encontrar quais eram as famílias de GHs presentes, se conseguiu alcançar as funções específicas de algumas enzimas que compõem tais famílias (Tabela 5). Por meio destas informações mais profundas, isto é, do conhecimento de quais prováveis funções as enzimas anotadas estão desempenhando naquele ambiente, melhor se dá a compreensão sobre as potencialidades e funcionalidades das mesmas.

As famílias aqui reportadas abrangem as chamadas verdadeiras celulasas, pois contêm enzimas de atividades endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidases

(MHUANTONG et al., 2015) como GH5 e GH9, por exemplo, que estão entre as principais famílias relacionadas à degradação de celulose. De maneira mais específica, nos *contigs* associados às famílias GH9 e GH44 foi identificada a presença de enzimas endo- β -glucanases (E.C. 3.2.1.4) (Tabela 5) que dão início ao processo de hidrólise da celulose liberando terminais redutores, não redutores e oligossacarídeos através da atuação arbitrária nas ligações β -1-4-glicosídicas presentes no interior da cadeia celulósica. Enzimas presentes na família GH12 possivelmente também estão envolvidas nesta etapa inicial da hidrólise, pois, por mais que neste estudo não se alcançou as atividades específicas das enzimas encontradas nesta família, a mesma é caracterizada como contendo esta atividade (MHUANTONG et al., 2015).

A família GH 5, encontrada neste ambiente, se trata de uma das famílias que possui maior variedade de enzimas dentre as GHs (LOMBARD et al., 2014), contando com considerável representatividade entre as GHs (Tabela 5). Além de também possuir enzimas de atividade endo- β -glucanase (E.C. 3.2.1.4), principal função apresentada na literatura por esta família, é também portadora de enzimas exoglucanases CBH II (3.2.1.91). Estas enzimas participam da degradação do material lignocelulósico atuando nos terminais não redutores das extremidades da cadeia celulósica liberando oligossacarídeos como celotetraoses, celotrioses, celobioses ou até mesmo levando à liberação direta de monômeros de D-glicose (BHAT et al., 1997).

A família GH 1 trata-se de uma das maiores famílias dentre as GHs (LOMBARD et al., 2014) e foi a segunda família mais encontrada neste ambiente (Tabela 5). Traduz-se numa diversificada família relacionada à atuação sobre diversos substratos, sendo as enzimas mais encontradas β -galactosidase e a β -glicosidase (WITHERS, 1997). Ao observar as funções atribuídas às sequências montadas associadas às enzimas compreendidas na família GH 1, a enzima β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21) foi identificada. Estando entre as mais abundantes nos meios enzimáticos celulolíticos, seja natural ou industrialmente, estas enzimas são alvos de muitos estudos (HORN et al., 2012). Apesar de não se ter alcançado as funções específicas das enzimas presentes nas famílias GH3 e GH30 encontradas neste ambiente, se sabe que enzimas com tal atividade β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21) são encontradas nas mesmas

(CAIRNS e ESEN, 2010). A atividade exercida por estas enzimas é crucial na finalização da desconstrução do material lignocelulósico, pois atuam sobre as celobioses levando à liberação de monômeros de D-glicose, sendo por isso também conhecidas como celobiases.

Com relação à porção de hemicelulose da biomassa lignocelulósica, várias famílias levantadas neste estudo possuem enzimas que irão contribuir para a degradação da mesma. É o caso da família GH11, a qual é composta por duas endo-xilanases, a endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) e endo- β -1,3-xilanase (EC 3.2.1.32), que iniciam a hidrólise da hemicelulose atuando aleatoriamente no interior da cadeia de xilana liberando xilo-oligossacarídeos. Dado que atuam aleatoriamente na hidrólise da xilana, componente mais abundante da hemicelulose, e que a hemicelulose, por sua vez, se trata do componente mais abundante das gramíneas como a cana-de-açúcar (DE SOUZA et al, 2013), estas enzimas desempenham um papel fundamental no processo de hidrólise enzimática do material lignocelulósico (WATANABE et al., 2015). Já possuem ampla aplicação em vários setores industriais como alimentação, polpas, detergentes, papel, entre outros (BEG et al., 2001). Contudo, com a atual busca por biocombustíveis gerados a partir de biomassa vegetal, este grupo enzimático tem atraído os olhares da pesquisa e das indústrias (GAO et al., 2011; HU et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). HU et al. (2011) aponta que o sinergismo entre celulases e endo-xilanases proporcionou o aumento da eficiência na hidrólise de compostos lignocelulósicos pré-tratados, ressaltando a importância destas enzimas e de suas interatividades.

Os xilo-oligossacarídeos resultantes da atuação das endo-xilanases serão subsequentemente hidrolisados por enzimas presentes nas famílias GH1 e GH3, as β -1,4-xilosidases (EC 3.2.1.37), as quais levarão à liberação dos monômeros de D-xilose como produto desta hidrólise (POLIZELI et al., 2005; WATANABE et al., 2015). Estas são peças fundamentais na degradação da hemicelulose realizando as etapas finais para a hidrólise completa da mesma (RAHMAN et al., 2003).

Relacionadas à degradação de outros constituintes da hemicelulose como as arabinanas, galactanas e mananas estão enzimas encontradas nas famílias GH1, GH2, GH3, GH26, GH27, GH38 e GH127.

A família GH3 também abrange enzimas α -L-arabinofuranosídeses, assim como a família GH127 na qual foi possível identificar tal função. Estas enzimas irão atuar em outro composto da hemicelulose, os resíduos de L-arabinose, atuando sobre compostos α -L-arabinofuranosídeos, α -L-arabinanas que possuam ligações α -(1-3) e/ou α -(1-5), arabinoxilanas e arabinogalactanas, realizando a hidrólise do terminal não-redutor α -L-arabinofuranosídeo a α -L-arabinosídeos (E.C. 3.2.1.55) (MARGOLLES-CLARK et al., 1996). Em suma, levam à liberação de monômeros L-arabinoses das extremidades ligadas às cadeias principais de xilanas, xiloarabinoses e arabinanas. Ressalta-se também a importância destas enzimas, uma vez que as mesmas também contribuem na deslignificação, agindo na ruptura entre a hemicelulose e lignina através da atuação em pontes éter que podem ocorrer entre resíduos de L-arabinose e lignina (DA SILVA DELABONA et al., 2013).

As enzimas pertencentes à família GH27, de acordo com as funções específicas encontradas para estas enzimas neste ambiente, são α -galactosídeses (EC 3.2.1.22) (Tabela 5). Tais enzimas estão relacionadas à degradação de galactanas, podendo também fazer parte das enzimas presentes na família GH4. Atuam em terminais não redutores de α -D-galactose, incluindo galacto-oligossacarídeos e em resíduos de galactose que estão ligados às cadeias principais de manana via alfa-1,6, desramificando as galctomananas. Por outro lado, a família GH2 abrange enzimas β -galactosídeses (EC 3.2.1.23), as quais atuam nos terminais não redutores de β -galactose gerando β -galactosídeos.

As enzimas associadas às famílias GH26 e GH38 tiveram suas funções identificadas neste ambiente (Tabela 5), estando ambas relacionadas ao metabolismo de manana. Aquelas presentes na família GH26 são β -mananases (EC 3.2.1.78), as quais atuam de forma aleatória hidrolisando as cadeias de manana nas ligações internas β -1,4 da estrutura, liberando oligossacarídeos. Já as enzimas α -manosídeses (EC 3.2.1.24) da família GH38, relacionadas às fases finais da degradação deste composto, atuam nos terminais não redutores α -D-manose liberando resíduos de D-manose.

A família mais abundante foi a GH 13, cujas enzimas foram identificadas como α -amilases (3.2.1.1) (Tabela 5). Estas não estão relacionadas diretamente à degradação do material lignocelulósico, entretanto tratam-se de enzimas amplamente

aplicadas no ramo industrial por conta de sua ação fundamental na hidrólise do amido. Frente a outras fontes a síntese por micro-organismos é a via preferencial de produção desta enzima por ser uma forma mais limpa e natural (SUNDARRAM e MURTHY, 2014). Além de serem empregadas em indústrias de detergente, papel e têxtil, por exemplo, participam na geração de etanol a partir de amido sendo utilizadas nas etapas de liquefação e sacarificação, nas quais o amido é hidrolisado a açúcares fermentescíveis às leveduras (MUSSATTO et al., 2010). Sendo assim, a anotação destas enzimas neste trabalho tem sua importância dado que estas carregam interesses de aplicação biotecnológica, uma vez que seu estudo está relacionado a vias alternativas de combustíveis (PERVEZ et al., 2014) e que prosseguem as buscas por enzimas de melhor desempenho ou de micro-organismos que possam ser utilizados como produtores dadas suas aplicabilidades (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

6.2.1 Relação das classes de micro-organismos e suas atuações no processo de degradação da biomassa lignocelulósica

No tocante às filiações taxonômicas das GHs encontradas neste ambiente, observou-se a predominância do filo Actinobacteria. Este mesmo padrão foi reportado por Mhuantong et al. (2014), ao estudarem o metagenoma de bagaço de cana-de-açúcar. Dadas as características deste filo no tocante às suas resistências de pH e temperatura, estas enzimas ganham interesse por possíveis características diferenciais interessantes às necessidades biotecnológicas.

Este filo foi encontrado em 16 das 20 famílias de GHs, somando 59% das filiações taxonômicas das enzimas classificadas. Em seguida, observou-se aproximadamente 34% no filo Proteobacteria distribuídas em três classes, α -Proteobacteria (75%), β -proteobacteria (13,6%) e δ -proteobacteria (11,3%) (Tabela 5). O restante ficou dividido entre as classes: Planctomycetes, Deinococci e Thermomicrobia, as quais estão relacionadas a específicas famílias em comparação às quatro principais classes.

Através da associação entre as atribuições taxonômicas e as GHs encontradas acompanhadas de suas respectivas funções na via hidrolítica do material

lignocelulósico infere-se sobre quais as classes estarão envolvidas em cada etapa deste processo.

Dentre os micro-organismos desta comunidade microbiana, aqueles atuantes na etapa de desconstrução da cadeia celulósica são α -Proteobacteria, β -proteobacteria, δ -proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Planctomycetes, sendo que a classe Actinobacteria é encontrada em todas as etapas.

As classes Actinobacteria e Planctomycetes estão associadas às enzimas presentes na família GH9, uma das principais famílias envolvidas na degradação do material lignocelulósico (MHUANTONG et al., 2015). Uma vez que estão relacionadas às atividades das enzimas endo- β -glucanases (3.2.1.4), participam, pois, do início da degradação da cadeia celulósica. Tais enzimas se encontram também presentes nas famílias GH5 e GH12, relacionadas à classe Actinobacteria.

Atuando na continuação da hidrólise do material celulósico, estão micro-organismos relacionados às classes Actinobacteria e α -Proteobacteria, que levam à liberação de celo-oligossacarídeos ou mesmo D-glicoses livres, uma vez que estão associadas à família GH5 portadoras de enzimas CBH II (3.2.1.91).

Participando das etapas finais do metabolismo da cadeia celulósica, liberando monômeros de D-glicose a partir das celobioses, estão as classes α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, δ -Proteobacteria e Actinobacteria, associadas à família GH1, a qual possui enzimas β -glicosidasas (E.C. 3.2.1.21). Além destas classes, também se encontrou associada a esta família a classe *Ascomycota*, pertencente ao reino Fungi do domínio *Eukarya*. É sabida a grande abundância e aplicabilidade de enzimas GH produzidas por fungos, entretanto a filiação taxonômica das sequências montadas foi feito através de um programa de alta acurácia, o qual se baseia em genomas completos para fazer a filiação (RANJENDRAN, RAJOLI e TAHERZADEH, 2016). Sendo assim, o provável motivo pela baixa filiação a fungos pode ter sido, porque a quantidade de genomas completos destes micro-organismos é extremamente menor em relação às bactérias.

Participando na hidrólise da fração mais abundante do material lignocelulósico da cana-de-açúcar (DE SOUZA et al., 2013), a hemicelulose, as classes envolvidas são α -proteobacteria, β -proteobacteria, δ -proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Deinococci e Thermomicrobia.

Envolvidas na desconstrução da fração mais abundante da hemicelulose, a xilana, foram observadas as classes α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, δ -Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria, além da classe de Eukaria, Ascomycota, associadas às enzimas xilosidases (EC 3.2.1.37) das famílias GH1 e GH3 (Tabela 5) e às α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) presentes na família GH3. Além disso, na classe α -Proteobacteria são encontradas enzimas relacionadas à degradação da lignina (TAYLOR et al., 2012) como é o caso das α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), também presentes na família GH3.

Na hidrólise de galactana foram encontradas as classes α -Proteobacteria, Actinobacteria, Deinococci e Thermomicrobia, associadas a atividade α -galactosidase (EC 3.2.1.22) associada a família GH4. Enquanto que a classe α -Proteobacteria se associa à β -galactosidases (EC 3.2.1.23), família GH2.

Na hidrólise da manana encontrou-se apenas o filo Actinobacteria, o qual está associado a presença de β -mananases (EC 3.2.1.78) e α -manosidases (EC 3.2.1.24) presentes respectivamente nas famílias GH26 e GH38 (Tabela 5).

6.2.2 Outras classes de enzimáticas envolvidas na degradação da biomassa vegetal

A princípio objetivou-se alcançar o levantamento das principais famílias envolvidas no processo de desramificação da biomassa, voltando as pesquisas inicialmente às famílias de GHs. Contudo, a fim de enriquecer as informações acerca das enzimas envolvidas no processo de desconstrução da biomassa vegetal, para além destas famílias também foram procuradas e identificadas neste ambiente outras famílias que também estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, atuando indiretamente neste processo, realizando um papel muitas vezes importante à ação das GHs, as famílias de CBM, CE e AA.

Associadas às ligações das hidrolases principalmente a carboidratos insolúveis e ao aumento do rendimento das mesmas (CANTAREL et al., 2009), uma vasta variedade de CBMs foram aqui reportadas. Das 74 famílias existentes, 21 estão presentes nesta comunidade. Referente à degradação do material lignocelulósico são descritas como possuindo afinidade por celulases as famílias CBM4, CBM6, CBM16, CBM30, CBM44, CBM64, sendo que CBM4 e CBM6 estão relacionadas à associação

da fração amorfa da matriz celulósica e a CBM16 também está relacionada a estruturas de glicomanana. Associadas à ligação às xilanas estão as famílias CBM2, CBM4, CBM13 e CBM44, enquanto que as famílias CBM32, CBM51 e CBM61 estão associadas à galactana. A família CBM20 está relacionada à ligação ao amido, domínio também chamado de *Starch Binding Domain* (SBD) (LOMBARD et al., 2014).

Referente à classe de enzimas CE, das 16 famílias existentes, 11 foram encontradas neste ambiente. Destas, aquelas encontradas neste ambiente que estão envolvidas no metabolismo das hemiceluloses presente nos vegetais são as famílias CE1, CE3, CE4, CE5 e CE7 (BIELY, 2012). Todas estas famílias se encontram ligadas à desacetilação do composto mais abundantes da hemicelulose, a xilana. Deste modo, uma vez que os polissacarídeos presentes na cana-de-açúcar, uma angiosperma, possuem ao longo das cadeias principais de xilana grupamentos O-acetil éster (KOUTANIEMI et al., 2013), estas enzimas estarão envolvidas em grande parte no processo de degradação.

Juntamente com as outras classes de enzimas, a presença da classe de AAs, a mais recente classe descrita, forma o conjunto dos principais grupos envolvidos na desconstrução da biomassa vegetal (LEVASSEUR et al., 2013). Das 12 famílias enzimáticas que compõem esta classe, 5 foram observadas neste ambiente, as quais atuam nos constituintes da lignina realizando atividades de oxirredução dos mesmos, como dos compostos aromáticos, por exemplo, ou mesmo dos sacarídeos, como a família AA3 que atua na oxidação de celobioses através da enzima celobiose desidrogenase (EC 1.1.99.18).

6.3 Perspectivas futuras

A formação de um coquetel enzimático, isto é, um conjunto composto por diferentes enzimas celulases e enzimas assessoras, as quais irão hidrolisar cada parte do material lignocelulósico, tem sido o foco de inúmeras pesquisas e apontado como parte crucial para aumentar o rendimento completo desta hidrólise (BERLIN et al., 2007; GAO et al., 2011; ALVIRA et al., 2011; HU et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). Este aumento de rendimento gerado pela formação do coquetel ainda não é bem definido, entretanto, é atribuído à sinergia entre as diferentes enzimas. Além disso, a formação do coquetel leva à redução na quantidade de enzimas necessárias

à hidrólise (HU et al., 2011). Vários estudos já foram conduzidos neste sentido, entretanto poucas são aquelas que foram voltadas à melhora no processo de hidrólise enzimática da biomassa oriunda da cana-de-açúcar (KOVACS et al., 2009; DELABONE et al., 2013).

HU et al. (2013), ao observar diferentes composições de coquetéis contendo enzimas celulolíticas e assessoras, observa a variação da especificidade de substrato dependente da composição enzimática do coquetel. Uma vez que estas enzimas se encontram em ambiente onde há a presença de palhada de cana-de-açúcar, é provável que a barreira da especificidade de substratos, se tratando de biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar, se torne menos desafiadora. Dada a complexidade e variedade de compostos e ligações presentes na estrutura lignocelulolítica, a partir da riqueza de enzimas encontradas no ambiente SA, com notável presença de hemicelulases, ressalta-se a importância do mesmo como fonte de pesquisas visando à obtenção de enzimas objetivando a formação de um coquetel enzimático eficiente na desramificação da biomassa vegetal de alta eficiência e baixo custo.

Indústrias e governos buscam pela obtenção de biocombustível celulósico (GONÇALVES et al., 2015), entretanto a desconstrução do arranjo lignocelulósicos para obtenção de açúcares livres de forma eficiente e economicamente viável ainda é um grande desafio (LYND et al., 2008). Estudo avaliando as implicações para a produção de etanol de segunda geração reporta que somente a hemicelulose compõe aproximadamente 50% do material lignocelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, apontando enzimas aqui reportadas como constituintes de um coquetel enzimático necessário para que a celulose se torne acessível às celulasas (DE SOUZA et al., 2013).

Deve-se ressaltar que, se tratando de dados metagenômicos, se trabalha com a possibilidade de que parte das enzimas aqui reportadas podem ser novidades, isto é, ainda não descritas, podendo desta forma, serem exploradas. Neste sentido, a variedade de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas levantadas e de suas respectivas contribuições na desramificação da estrutura lignocelulósica, bem como o levantamento de quais os possíveis micro-organismos envolvidos neste processo, contribuem de forma efetiva para o avanço na resolução deste desafio, elencando este ambiente como promissora fonte para investigações futuras e provendo

conhecimentos balizadores aos próximos passos em favor da obtenção de enzimas assessoras termoestáveis, a baixo custo e de alta eficiência.

7 CONCLUSÃO

A comunidade microbiana presente no solo sob cultivo de cana-de-açúcar apresentou um grande potencial como fonte de enzimas promissoras para a pesquisa na construção de coquetéis enzimáticos voltados à degradação do material lignocelulósico. Isto foi verificado, haja vista a variabilidade de enzimas presente nesta comunidade e suas respectivas associações taxonômicas, as quais revelaram significativa presença do filo Actinobacteria, o qual é sabido possuir enzimas interessantes relacionadas a processos de hidrólise enzimática. Desta forma, esta pesquisa abre perspectivas otimistas para investigações em busca de enzimas alternativas com características biotecnológicas aplicáveis para a hidrólise enzimática da biomassa vegetal.

8 REFERÊNCIAS

ADEGBOYE, MOBOLAJI FELICIA; BABALOLA, OLUBUKOLA OLURANTI. Taxonomy and ecology of antibiotic producing *actinomycetes*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 15, p. 2255-2261, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.5897/AJARX11.071>>.

ADEN, A.; FOUST, T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 535-545, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s10570-009-9327-8>>.

ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4552-4558, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2010.12.112>>.

ANDREWS, SIMON. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Reference Source**, 2010.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous *fungi*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>>.

BAO, E.; JIANG, T.; KALOSHIAN, I.; GIRKE, T. SEED: efficient clustering of next-generation sequences. **Bioinformatics**, v. 27, n. 18, p. 2502-2509, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/btr447>>.

BARRAL, P.; SUÁREZ, C.; BATANERO, E.; ALFONSO, C.; DE DIOS ALCHÉ, J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; VILLALBA, M.; RIVAS, G.; RODRÍGUEZ, R. An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. **Biochemical Journal**, v. 390, n. 1, p. 77-84, 2005. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1042/BJ20050456>>.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s002530100704>>.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s002530100704>>.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1002/bit.21238>>.

BHAT, M.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi:10.1016/S0734-9750\(97\)00006-2](http://dx.doi:10.1016/S0734-9750(97)00006-2)>.

BIELY, Peter. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1575-1588, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.010>>.

BNDES. **Bioetanol de Cana-de-açúcar. Energia para o Desenvolvimento Sustentável.** BNDES, Rio de Janeiro. 2008. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org>. Acesso: 15 mai. 2014.

BORASTON, A. B.; BOLAM, D. N.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 769-781, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1042/BJ20040892>>.

BRADNAM, K. R.; FASS, J. N.; ALEXANDROV, A.; BARANAY, P.; BECHNER, M.; BIROL, I.; BOISVERT, S.; CHAPMAN, J. A.; CHAPUIS, G.; CHIKHI, R.; CHITSAZ, H.; CHOU, W. C.; CORBEIL, J.; DEL FABBRO, C.; DOCKING, T. R.; DURBIN, R.; EARL, D.; EMRICH, S.; FEDOTOV, P.; FONSECA, N. A.; GANAPATHY, G.; GIBBS, R. A.; GNERRE, S.; GODZARIDIS, E.; GOLDSTEIN, S.; HAIMEL, M.; HALL, G.; HAUSSLER, D.; HIATT, J. B.; HO, I. Y.; HOWARD, J.; HUNT, M.; JACKMAN, S. D.; JAFFE, D. B.; JARVIS, E. D.; JIANG, H.; KAZAKOV, S.; KERSEY, P. J.; KITZMAN, J. O.; KNIGHT, J. R.; KOREN, S.; LAM, T. W.; LAVENIER, D.; LAVIOLETTE, F.; LI, Y.; LI, Z.; LIU, B.; LIU, Y.; LUO, R.; MACCALLUM, I.; MACMANES, M. D.; MAILLET, N.; MELNIKOV, S.; NAQUIN, D.; NING, Z.; OTTO, T. D.; PATEN, B.; PAULO, O. S.; PHILLIPPY, A. M.; PINA-MARTINS, F.; PLACE, M.; PRZYBYLSKI, D.; QIN, X.; QU, C.; RIBEIRO, F. J.; RICHARDS, S.; ROKHSAR, D. S.; RUBY, J. G.; SCALABRIN, S.; SCHATZ, M. C.; SCHWARTZ, D. C.; SERGUSHICHEV, A.; SHARPE, T.; SHAW, T. I.; SHENDURE, J.; SHI, Y.; SIMPSON, J. T.; SONG, H.; TSAREV, F.; VEZZI, F.; VICEDOMINI, R.; VIEIRA, B. M.; WANG, J.; WORLEY, K. C.; YIN, S.; YIU, S. M.; YUAN, J.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; ZHOU, S.; KORF, I. F. Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. **GigaScience**, v. 2, n. 1, p. 10, jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1186/2047-217X-2-10>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio** – Brasil 2014/2015 a 2024/2025. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf. Acesso em: 7 junho. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sapcana - Sistema de Acompanhamento de Produção Canavieira.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia>. Acesso: 16 mai. 2014.

BRITO-CUNHA, C. C.; GAMA, A. R.; JESUINO, R. S.; FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis* I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.15640/jaes.v4n1a12>>.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A.; SANTOS, H. P. D.; LIMA, D. U. D. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. esp, p. 137, 2000.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389-3405, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s00018-010-0399-2>>.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. D. A. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhiço e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 5, p. 935-944, 2003. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1590/S0100-06832003000500018>>.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, S. DOS S. T.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, L. C. W.; DAS GRAÇAS, A. F. M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1155/2012/989572>>..

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl 1, p. D233-D238, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/nar/gkn663>>.

CANTERI, M. H.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. D. P. Pectin: from raw material to the final product. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282012005000024>>.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2009.10.097>>.

CARROLL, Andrew; SOMERVILLE, Chris. Cellulosic biofuels. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 165-182, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092125>>.

CARVALHO, J. L. N.; BRAUNBECK, O. A.; CHAGAS, M. F. **Implantação do plantio direto de cana-de-açúcar: base para sustentabilidade do canavial**. Laboratório Nacional de Ciência Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEN), 2012. Disponível em: <http://abccapacitacao.files.wordpress.com/2012/11/cana_de_acucar_estudo-de-viabilidade-economica-abc_31out2012.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014.

CAUFRIER, F.; MARTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. **Carbohydrate research**, v. 338, n. 7, p. 687-692, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi:10.1016/S0008-6215\(03\)00002-8](http://dx.doi:10.1016/S0008-6215(03)00002-8)>.

CEPAGRI - **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_444.html. Acessado em: 10/11/2015.

ČEPELJNIK, T.; KRIŽAJ, I.; MARINŠEK-LOGAR, R. Isolation and characterization of the *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 T xylanase XynT—the first family 11 endoxylanase from rumen Butyrvibrio-related bacteria. **Enzyme and microbial technology**, v. 34, n. 3, p. 219-227, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.enzmictec.2003.10.012>>.

CHANDEL, A. K.; da SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1002/jctb.2742>>.

CHISTOSERDOVA, LUDMILA. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 10, p. 1351-1359, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1007/s10529-010-0306-9>>.

CHRISTENSEN, U.; ALONSO-SIMON, A.; SCHELLER, H. V.; WILLATS, W. G.; HARHOLT, J. Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon*—A potential model plant for temperate grasses. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 62-69, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.phytochem.2009.09.019>>.

CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; CONTRERAS, A. L.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 52, n.6, p. 741-755, 1999.

CONAB (2015) Companhia Nacional de Abastecimento Em: **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf. Acessado 15 dez 2015.

CONAB (2016) Companhia Nacional de Abastecimento Em: **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_18_14_27_15_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_16.pdf. Acessado 19 junho 2016.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, Geoffrey P. beta-1, 4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, n. 3, p. 259-289, 1993. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1470-8744.1993.tb00244.x/>>.

CRETOIU, M. S.; BERINI, F.; KIELAK, A. M.; MARINELLI, F.; VAN ELSAS, J. D. A novel salt-tolerant chitobiosidase discovered by genetic screening of a metagenomic library derived from chitin-amended agricultural soil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8199-8215, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1007/s00253-015-6639-5>>.

DA SILVA DA SILVA DELABONA, P.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; PAIXÃO, D. A. A.; FARINAS, C. S.; CAIRO, J. P. L. F.; LIMAA, D. J.; SQUINAA, F. M.; RULLERA, R.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. **Bioresource technology**, v. 131, p. 500-507, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2012.12.105>>.

DA VINHA, F. N. M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, M. N.; MACRAE, A.; DA SILVA BON, E. P.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 256-267, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1007/s12010-010-9132-8>>.

DANIEL, ROLF. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470-478, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1038/nrmicro1160>>.

DANIEL, ROLF. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.copbio.2004.04.005>>.

DAVIS, R.; TAO, L.; TAN, E.C.D.; BIDDY, M.J.; BECKHAM, G.T.; SCARLATA, C. **Process Design and Economics for the Conversion of Lignocellulosic Biomass to Hydrocarbons: Dilute-Acid and Enzymatic Deconstruction of Biomass to Sugars and Biological Conversion of Sugars to Hydrocarbons**. Relatório técnico - NREL, Golden, CO, Estados Unidos, 2015.

DE ANGELIS, K. M.; GLADDEN, J. M.; ALLGAIER, M.; D'HAESELEER, P.; FORTNEY, J. L.; REDDY, A.; HUGENHOLTZ, P.; SINGER, S. W.; GHEYNST, J. S. V.; SILVER, W. L.; SIMMONS, B. A.; Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomic-based enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. **Bioenergy Research**, v. 3, n. 2, p. 146-158, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1007/s12155-010-9089-z>>.

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

DE MENEZES, A. B.; PRENDERGAST-MILLER, M. T.; POONPATANA, P.; FARRELL, M.; BISSETT, A.; MACDONALD, L. M.; TOSCAD, P.; RICHARDSON, A. E.; THRALL, P. H. C/N Ratio Drives Soil Actinobacterial Cellobiohydrolase Gene Diversity. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 9, p. 3016-3028, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/AEM.00067-15>>.

DE SIQUEIRA, F. G.; DE SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAS, J.; COUTO, F. A.; BATISTAD, L. R.; FERREIRA FILHO, E. X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous *fungi*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20-26, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.ibiod.2009.10.002>>.

DE SOUZA NUNES, R.; DE CASTRO LOPES, A. A.; MARTINHÃO, D.; DE SOUSA, G.; DE CARVALHO MENDES, I. Sistemas de manejo e os estoques de carbono e nitrogênio em Latossolo de Cerrado com a sucessão soja-milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 4, p. 1407-1419, 2011.

DE SOUZA, A. P.; LEITE, D. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s12155-012-9268-1>>.

DE SOUZA, C. J.; COSTA, D. A.; RODRIGUES, M. Q.; DOS SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; ABRANTES, A. B.; COSTA, P. S.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L.; FIETTO, L. G. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 109, p. 63-69, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2012.01.024>>.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; VAN ELSAS, J. D.; ARAÚJO, W. L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and soil**, v. 336, n. 1-2, p. 337-349, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s11104-010-0486-z>>.

DUARTE JR, José B.; COELHO, Fábio C. A cana-de-açúcar em sistema de plantio direto comparado ao sistema convencional com e sem adubação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 6, p. 576-584, 2008.

EMAMI K, NAGY T, FONTES CMGA, et al. (2002) Evidence for temporal regulation of the two *Pseudomonas cellulosa* xylanases belonging to glycoside hydrolase family 11. **J Bacteriol**.doi:10.1128/JB.184.15.4124-4133.2002

EMAMI, K.; NAGY, T.; FONTES, C. M.; FERREIRA, L. M.; GILBERT, H. J. Evidence for temporal regulation of the two *Pseudomonas cellulosa* xylanases belonging to glycoside hydrolase family 11. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 15, p. 4124-4133, 2002. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/JB.184.15.4124-4133.2002>>.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997. 212p.

ENCARNAÇÃO, T. B. C. **Modulação da degradação enzimática de galactomanano por sua própria estrutura fina**. 2012. 211 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, na área de Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 1, p. 177-199, 1980.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; GOLYSHIN, P. N. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 588-593, 2005. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.copbio.2005.09.001>>.

FRANCO, H. C. J.; MAGALHÃES, P. S. G.; CAVALETT, O.; CARDOSO, T. F.; BRAUNBECK, O. A.; BONOMI, A.; TRIVELIN, P. C. O. How much trash to removal from sugarcane field to produce bioenergy?. **Proceedings Brazilian BioEnergy Science and Technology; Campos do Jordão**, 2011.

GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, S. P.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; BALAN, V.; DALE, B. E. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-4-5>>.

GAVA, C. A. T.; PEREIRA, J. C.; DO CARMO FERNANDES, M.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1373-1380, 2002. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1590/S0100-204X2002001000004>>.

GLASS, N. L.; SCHMOLL, M.; CATE, J. H. D.; CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 477-498, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1146/annurev-micro-092611-150044>>.

GONÇALVES, G. A.; TAKASUGI, Y.; JIA, L.; MORI, Y.; NODA, S.; TANAKA, T.; ICHINOSED, H.; KAMIYA, N. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. **Enzyme and microbial technology**, v. 72, p. 16-24, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.enzmictec.2015.01.007>>.

GOUVÊA, Paula Fagundes de. **Estudos genéticos e moleculares da produção de celulasas e hemicelulasas em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger***. 2013. 206 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

GU, Y.; DING, Y.; REN, C.; SUN, Z.; RODIONOV, D. A.; ZHANG, W.; YANG, S.; YANG, C.; JIANG, W. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in Firmicutes. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 255, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1471-2164-11-255>>.

GUILLÉN, D.; SÁNCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1241-1249, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s00253-009-2331-y>>.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/MMBR.69.1.195.2005>>.

HEDRICH, S.; SCHLÖMANN, M.; Barrie, J. D. The iron-oxidizing Proteobacteria. **Microbiology**, v. 157, n. 6, p. 1551-1564, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1099/mic.0.045344-0>>.

HELGASON, B. L.; WALLEY, F. L.; GERMIDA, J. J. Long-term no-till management affects microbial biomass but not community composition in Canadian prairie agroecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2192-2202, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.soilbio.2010.08.015>>.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. 3, p. 781-788, 1993. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1042/bj2930781>>.

HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS letters**, v. 425, n. 2, p. 352-354, 1998. Disponível em:<[http://dx.doi:10.1016/S0014-5793\(98\)00265-8](http://dx.doi:10.1016/S0014-5793(98)00265-8)>.

HENRISSAT, Bernard. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, p. 309-316, 1991. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1042/bj2800309>>.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T. W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; SHUJUN LUO, S.; DOUGLAS S. CLARK, D. S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R. I.; PENNACCHIO, L. A.; TRINGE, S. G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 463-467, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1126/science.1200387>>.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-5-45>>.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A.; SADDLER, J. N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-6-112>>.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-6-112>>.

HUMBERD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; SCHOEN, P.; LUKAS, J.; OLTHOF, B.; WORLEY, M.; SEXTON, D. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO., 2011.

ISIKGOR, FURKAN. H.; BECER, C. REMZI. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1039/C5PY00263J>>.

JANGID, K.; WILLIAMS, M. A.; FRANZLUEBBERS, A. J.; SANDERLIN, J. S.; REEVES, J. H.; JENKINS, M. B.; ENDALEC, D. M.; COLEMANE, D. C.; WHITMAN, W. B. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2843-2853, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.030>>.

JANSSEN, Peter H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/AEM.72.3.1719>>.

JEFFREY, L. S. H. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. **African Journal of biotechnology**, v. 7, n. 20, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi:10.5897/AJAR> >.

JEON, H. J.; KIM, J. T.; KIM, Y. J.; KIM, H. K.; LEE, H. S.; KANG, S. G.; KIM, S. J.; LEE J. H. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment Metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 865–874, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s00253-008-1656-2>>.

JIA, L.; GONÇALVES, G. A.; TAKASUGI, Y.; MORI, Y.; NODA, S.; TANAKA, T.; ICHINOSE, H.; KAMIYA, N. Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. **Bioresource technology**, v. 185, p. 158-164, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.041>>.

JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H. Y.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; QUINN, A. F.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; YONG, S.T.; LOPEZ, R.; HUNTER, S. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/btu031>>.

JORDAN, D. B.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J. D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E.; LEE, C. C.; MERTENS, J. A.; WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 2, p. 241-252, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1042/BJ20111922>>.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; ANTONOPOULOU, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 281, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00281>>.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and soil**, v. 170, n. 1, p. 75-86, 1995.

KOECK, D. E.; PECHTL, A.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Genomics of cellulolytic bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 29, p. 171-183, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.copbio.2014.07.002>>.

KOUTANIEMI, S.; VAN GOOL, M. P.; JUVONEN, M.; JOKELA, J.; HINZ, S. W.; SCHOLS, H. A.; TENKANEN, M. Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. **Journal of biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 684-692, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.jbiotec.2013.10.009>>.

KOVACS, K.; MACRELLI, S.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 1, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-2-14>>.

KUBICEK, C. P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 133-142, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.jbiotec.2012.05.020>>.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s10295-008-0327-8>>.

KURAMAE, E. E.; YERGEAU, E.; WONG, L. C.; PIJL, A. S.; VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 1, p. 12-24, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>>.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1038/nmeth.1923>>.

LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/AEM.00335-09>>.

LEE, S. F.; FORSBERG, C. W.; GIBBINS, L. N. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1068-1076, 1985.

LEVASSEUR, A.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-6-41>>.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; DA SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, n. 1-2, p. 127-145, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s11104-008-9855-2>>.

LOMBARD, V.; RAMULU, H. G.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D490-D495, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/nar/gkt1178>>.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific reports**, Wuhan, n. 6, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1038/srep25279>>.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific reports**, v. 6, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1038/srep25279>>.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1038/nbt0208-169>>.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>>.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2 nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-5-22>>.

MAHMOUDI, N.; SLATER, G. F.; FULTHORPE, R. R. Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. **Canadian journal of microbiology**, v. 57, n. 8, p. 623-628, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1139/W11-049>>

MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**, v. 7, n. 2, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.15536/thema.7.2010.%25p.29>>.

MARGOLLES-CLARK, E.; TENKANEN, M.; NAKARI-SETÄLÄ, T. I. I. N. A.; PENTTILÄ, M. E. R. J. A. Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3840-3846, 1996.

MARTIN, MARCEL. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet. journal**, v. 17, n. 1, p. pp. 10-12, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>>.

MCKIE, V. A.; GARY, W.; MILLWARD-SADLER, S. J.; HAZLEWOOD, G. P.; LAURIE J. I.; GILBERT, H. J. Arabinanase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa exhibits both an endo-and an exo-mode of action. **Biochemical Journal**, v. 323, n. 2, p. 547-555, 1997.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1471-2105-9-386>>.

MHUANTONG, W.; CHAROENSAWAN, V.; KANOKRATANA, P.; TANGPHATSORNRUANG, S.; CHAMPREDA, V. Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/s13068-015-0200-8>>.

MILLWARD-SADLER, S. J.; DAVIDSON, K.; HAZLEWOOD, G. P.; BLACK, G. W.; GILBERT, H. J.; CLARKE, J. H. Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa and *Cellvibrio mixtus*. **Biochemical journal**, v. 312, n. 1, p. 39-48, 1995. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1042/bj3120039>>.

MITCHELL, A.; CHANG, H. Y.; DAUGHERTY, L.; FRASER, M.; HUNTER, S.; LOPEZ, R.; MCANULLA, C.; MCMENAMIN, C.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; RATO, C.; YONG, S. Y.; BATEMAN, A.; PUNTA, M.; ATTWOOD, T. K.; SIGRIST, C. J. A.; REDASCHI, N.; RIVOIRE, C.; XENARIOS, I.; KAHN, D.; GUYOT, D.; BORK, P.; LETUNIC, I.; GOUGH, J.; OATES, M.; HAFT, D.; HUANG, H.; NATALE, D. A.; WU, C. H.; ORENGO, C.; SILLITOE, I.; MI, H.; PAUL D. THOMAS, P. D.; FINN, R. D. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D 1, p. D213-D221, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/nar/gku1243>>.

MOHANTA, YUGAL KISHORE. Isolation of cellulose-degrading actinomycetes and evaluation of their cellulolytic potential. **Bioengineering and Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.13189/bb.2014.020101>>.

MORIMOTO, S.; FUJII, T. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 389-396, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s00253-007-1066-x>>.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTEA, A.; DOMINGUESA, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>>.

NACKE, H.; WILL, C.; HERZOG, S.; NOWKA, B.; ENGELHAUPT, M.; DANIEL, R. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. **FEMS microbiology ecology**, v. 78, n. 1, p. 188-201, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01088.x>>.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x>>.

NIELSEN, U. N.; WALL, D. H.; SIX, J. Soil biodiversity and the environment. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 40, p. 63-90, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1146/annurev-environ-102014-021257>>.

OCHOA-VILLARREAL, M.; AISPURO-HERNÁNDEZ, E.; VARGAS-ARISPURO, I.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. Á. Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. **Polymerization**, v. 4, p. 63-86, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.5772/46094>>.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHMIYA, K.; SHIMIZU, M.; TAYA, M.; SHIMIZU, S. Purification and properties of cellobiosidase from *Ruminococcus albus*. **Journal of bacteriology**, v. 150, n. 1, p. 407, 1982.

ORR, C. H.; STEWART, C. J.; LEIFERT, C.; COOPER, J. M.; CUMMINGS, S. P. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 1, p. 208-214, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1111/jam.12822>>.

OVERBEEK, R., OLSON, R., PUSCH, G. D., OLSEN, G. J., DAVIS, J. J., DISZ, T., EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D206-D214, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/nar/gkt1226>>.

PAKARINEN, A.; HAVEN, M. Ø., DJAJADI, D. T.; VÁRNAI, A.; PURANEN, T.; VIIKARI, L. Cellulases without carbohydrate-binding modules in high consistency ethanol production process. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-7-27>>.

PARKS, D. H.; TYSON, G. W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/btu494>>.

PENG, Y.; LEUNG, H. C.; YIU, S. M.; CHIN, F. Y. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1420-1428, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/bts174>>.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia spp.* endofíticas de cana-de- açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.

PÉREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T. D. L. R.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s10123-002-0062-3>>.

PERVEZ, S.; AMAN, A.; IQBAL, S.; SIDDIQUI, N. N.; QADER, S. A. U. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1472-6750-14-49>>.

PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: current situation and environmental aspects. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s12649-010-9048-0>>.

PISA, G., MAGNANI, G. S., WEBER, H., SOUZA, E. M., FAORO, H., MONTEIRO, R. A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J. P.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1590/S0100-879X2011007500148>>.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s00253-005-1904-7>>.

QUINLAN, R. J.; SWEENEY, M. D.; LEGGIO, L. L.; OTTEN, H.; POULSEN, J. C. N.; JOHANSEN, K. S.; KRISTIAN B. R. M. KROGH, K. B. R. M.; JØRGENSEN, C. I.; TOVBORG, M.; ANNIKA ANTHONSENC, A.; TRYFONA, T.; WALTERC, C. P.; DUPREED, P.; XUA, F.; DAVIESE, G. J.; WALTONE, P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi/10.1073/pnas.1105776108>>.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; DA SILVA, M. R. S.; BUSTAMANTEB, M. M. C.; KRÜGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 59-70, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.micres.2006.12.001>>.

RACHID, C. T., SANTOS, A. L., PICCOLO, M. C., BALIEIRO, F. C., COUTINHO, H. L., PEIXOTO, R. S.; TIEDJE, J. M.; ROSADO, A. S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59342, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1371/journal.pone.0059342>>.

RAHMAN, A. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase, α -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 1, p. 58-64, 2003. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1139/w02-114>>.

RAJENDRAN, K.; RAJOLI, S.; TAHERZADEH, M. J. Techno-Economic Analysis of Integrating First and Second-Generation Ethanol Production Using Filamentous Fungi: An Industrial Case Study. **Energies**, v. 9, n. 5, p. 359, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi:10.3390/en9050359>>.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopeptides: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopepsis* sp. **Chemistry—A European Journal**, v. 16, n. 10, p. 3194-3200, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1002/chem.200902933>>.

REYES-ORTIZ, V.; HEINS, R. A.; CHENG, G.; KIM, E. Y.; VERNON, B. C.; ELANDT, R. B.; ADAMS, P. D.; SALE, K. L.; HADI, M. Z.; SIMMONS, B. A.; KENT, M. S.; TULLMAN-ERCEK, D. Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-6-93>>.

RÍPOLI, T. C. C.; MOLINA JR, W. F.; RÍPOLI, M. L. C. Energy potential of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 677-681, 2000. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162000000400013>>.

RODRIGUES, R. C.; MARIA DAS GRAÇAS, A. F.; E SILVA, J. B. A.; VITOLO, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003. Disponível em:<[http://dx.doi:10.1016/S0032-9592\(02\)00290-X](http://dx.doi:10.1016/S0032-9592(02)00290-X)>.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 164-177, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x>>.

SAINI, A.; AGGARWAL, N. K.; SHARMA, A.; YADAV, A. Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. **Enzyme research**, v. 2015, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1155/2015/279381>>.

SANTANA, M. L. **PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, APLICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CELULASE DE *Moniliophthora perniciosa***. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2010.

SANTOS, C. R.; POLO, C. C.; COSTA, M. C.; NASCIMENTO, A. F.; MEZA, A. N.; COTA, J.; ZAIRA B.; HONORATO, H. R. V.; OLIVEIRA, P. S. L.; GOLDMAN, G. H.; GILBERT, H. J.; PRADE, R. A.; RULLER, R.; SQUINA, F. M.; WONGII, D. W. S.; MURAKAMI, M. T. Mechanistic strategies for catalysis adopted by evolutionary distinct family 43 arabinanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7362-7373, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1074/jbc.M113.537167>>.

SANTOS, C. R.; POLO, C. C.; COSTA, M. C.; NASCIMENTO, A. F.; MEZA, A. N.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; RODRIGO V. HONORATO, R. V.; OLIVEIRA, P. S. L.; GOLDMAN, G. H.; GILBERT, H. J.; PRADE, R. A.; RULLER, R.; SQUINA, F. M.; WONGII, D. W. S.; MÁRIO T. MURAKAMI, M. T. Mechanistic strategies for catalysis adopted by evolutionary distinct family 43 arabinanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7362-7373, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1074/jbc.M113.537167>>.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. D.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHLOSS, Patrick D.; HANDELSMAN, Jo. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-310, 2003. Disponível em:<[http://dx.doi:10.1016/S0958-1669\(03\)00067-3](http://dx.doi:10.1016/S0958-1669(03)00067-3)>.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/btr026>>.

SCHNEIDER, W. D. H. **SECRETÔMICA E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA LINHAGEM SELVAGEM 2HH E DO MUTANTE S1M29 DE *Penicillium echinulatum***. 2014. 163 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2014.

SEEMANN, TORSTEN. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, p. btu153, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/btu153>>.

SHALLOM, DALIA; SHOHAM, YUVAL. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003. Disponível em:<[http://dx.doi:10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](http://dx.doi:10.1016/S1369-5274(03)00056-0)>.

SHARMIN, F.; WAKELIN, S.; HUYGENS, F.; HARGREAVES, M. Firmicutes dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. **Scientific reports**, v. 3, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1038/srep03107>>.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, TULASI. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.3389/fmicb.2015.01014>>.

SILVEIRA, É. L. D.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. D. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006001000008>>.

SIMON, Carola; DANIEL, Rolf. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. **Metagenomics: Methods and Protocols**, p. 39-50, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-823-2>>.

SLEATOR, R. D. C.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters Applied Microbiology**, v. 47, p. 361-366, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x>>.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>>.

SPAIN, A. M.; KRUMHOLZ, L. R.; ELSHAHED, M. S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. **The ISME journal**, v. 3, n. 8, p. 992-1000, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.43>>.

STEELE, H. L.; JAEGER, K-E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenome. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25-37, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1159/000142892>>.

SUELA SILVA, M.; NAVES SALES, A.; TEIXEIRA MAGALHÃES-GUEDES, K.; RIBEIRO DIAS, D.; SCHWAN, R. F. Brazilian cerrado soil Actinobacteria ecology. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1155/2013/503805>>.

SUKHARNIKOV, L. O.; ALAHUHTA, M.; BRUNECKY, R.; UPADHYAY, A.; HIMMEL, M. E.; LUNIN, V. V.; ZHULIN, I. B. Sequence, structure, and evolution of cellulases in glycoside hydrolase family 48. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 41068-41077, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.405720>>.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.12691/jaem-2-4-10>>.

TAYLOR, C. R.; HARDIMAN, E. M.; AHMAD, M.; SAINSBURY, P. D.; NORRIS, P. R.; BUGG, T. D. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 3, p. 521-530, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05352.x>>.

TIAN, W.; WANG, L.; LI, Y.; ZHUANG, K.; LI, G.; ZHANG, J.; XIAOA, X.; XI, Y. Responses of microbial activity, abundance, and community in wheat soil after three years of heavy fertilization with manure-based compost and inorganic nitrogen. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 213, p. 219-227, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2015.08.009>>.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1126/science.1071698>>.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000. Disponível em:<[http://dx.doi:10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](http://dx.doi:10.1016/S0960-8524(99)00104-2)>.

UPCHURCH, R.; CHIU, C. Y.; EVERETT, K.; DYSZYNSKI, G.; COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1294-1305, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.soilbio.2007.06.027>>.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>>.

VAN HORN, D. J.; OKIE, J. G.; BUELOW, H. N.; GOOSEFF, M. N.; BARRETT, J. E.; TAKACS-VESBACH, C. D. Soil microbial responses to increased moisture and organic resources along a salinity gradient in a polar desert. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 10, p. 3034-3043, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/AEM.03414-13>>.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1754-6834-6-30>>.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/MMBR.00005-07>>.

VON MERING, C.; HUGENHOLTZ, P.; RAES, J.; TRINGE, S. G.; DOERKS, T.; JENSEN, L. J.; Ward, N.; Bork, P. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science**, v. 315, p.1126-1130, 2007. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1126/science.1133420>>.

WANG, M.; LU, X. Exploring the Synergy between Cellobiose Dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and Cellulase from *Trichoderma reesei*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi:10.3389/fmicb.2016.00620>>.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 183-212, 1996. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1146/annurev.micro.50.1.183>>.

WATANABE, A.; HIRAGA, K.; SUDA, M.; YUKAWA, H.; INUI, M. Functional characterization of *Corynebacterium alkanolyticum* β -xylosidase and xyloside ABC transporter in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 12, p. 4173-4183, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/AEM.00792-15>>.

WILKE, A.; HARRISON, T.; WILKENING, J.; FIELD, D.; GLASS, E. M.; KYRPIDES, N.; MAVROMMATIS, K.; MEYER, F. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 141, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/1471-2105-13-141>>.

WILLIAMS, K. P.; SOBRAL, B. W.; DICKERMAN, A. W. A robust species tree for the *alpha*Proteobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4578-4586, 2007. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1128/JB.00269-07>>.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate polymers**, v. 44, n. 4, p. 325-337, 2001. Disponível em:<[http://dx.doi:10.1016/S01448617\(00\)00249-6](http://dx.doi:10.1016/S01448617(00)00249-6)>.

WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome biology**, v. 15, n. 3, p. 1, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46>>.

YIN, Y.; MAO, X.; YANG, J. C.; CHEN, X.; MAO, F.; XU, Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation, **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W 1, p. W445-W451, 2012. Disponível em :<<http://dx.doi:10.1093/nar/gks479>>.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2459-2465, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1016/j.apenergy.2009.03.012>>.

ZHOU, J., SHEN, J., ZHANG, R., TANG, X., LI, J., XU, B.; DING, J.; GAO, Y.; XU, D.; HUANG, Z. Molecular and biochemical characterization of a novel multidomain xylanase from *Arthrobacter* sp. GN16 isolated from the feces of *Grus nigricollis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 573-588, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi:10.1007/s12010-014-1295-2>>.